

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ch. P. Speer

**Analyse der ontogenetischen Veränderungen
in B-Zell-Subpopulationen
im Kindes- und Erwachsenenalter**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Eva-Maria Eichhorn
aus Sondershausen

Würzburg, Juli 2011

Referent: Prof. Dr. med. H. J. Girschick

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2012

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem als Beschützer der körperlichen Integrität	1
1.2	B-Lymphozyten sind die Abwehrzellen der humoralen Immunität	2
1.2.1	B-Zell-Reifung und Differenzierung im Knochenmark.....	2
1.2.2	B-Zell-Entwicklung außerhalb des Knochenmarks	3
1.3	Antikörper wirken als lösliche B-Zell-Rezeptoren	5
1.4	Durchflusszytometrische Charakterisierung von peripheren B-Zellen	6
1.4.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie	6
1.4.2	CD27- IgD+ Naive B-Zellen.....	7
1.4.3	CD24++ CD38++ Transitionalzellen	8
1.4.4	CD27+ IgD-, CD27+IgD+ und CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen	9
1.4.5	CD21 ^{low} CD38 ^{low} B-Zellen	10
1.4.6	CD24- CD38++ Plasmablasten	10
1.4.7	Reifestadien Bm1-Bm5	11
1.5	B-Zell-Veränderungen bei Immundefekten und Autoimmunkrankheiten.....	11
1.5.1	Variables Immundefektsyndrom (CVID).....	12
1.5.1.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zellen von CVID-Patienten: Die EUROClass-Klassifikation.....	13
1.5.2	Agammaglobulinämie.....	14
1.5.3	Systemischer Lupus Erythematoses.....	14
1.6	Fragestellungen	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Herkunft der Proben.....	16
2.2	Isolierung von mononukleären Zellen	16
2.3	Färbeprotokoll	17
2.4	Durchflusszytometrie.....	18
2.4.1	Technische Einstellungen	18

2.4.2	Auswertungs-Strategien	19
2.5	Statistische Auswertungen	20
2.6	Materialien und Geräte	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Probanden und Altersgruppen	22
3.2	Absolut- und Relativwerte der B-Zell-Subpopulationen	22
3.2.1	CD19+ B-Zellen	23
3.2.2	CD27- IgD+ Naive B-Zellen und CD24++ CD38++ Transitionalzellen	23
3.2.3	CD27+ IgD-, CD27+IgD+ und CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen	23
3.2.4	CD21 ^{low} CD38 ^{low} B-Zellen	24
3.2.5	CD24- CD38++ Plasmablasten	24
3.3	Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung von PBMC und Vollblut.....	31
4	Diskussion	34
4.1	Analysestrategie der B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes	34
4.2	Unterliegen die B-Zell-Subpopulationen ontogenetischen Veränderungen?....	36
4.3	Welche Störungen der B-Zell-Homöostase finden sich bei Immundefekten und Autoimmunkrankheiten?	38
4.4	Sind die Referenzwerte zur Klassifikation der CVID im Kindesalter anwendbar?	39
5	Zusammenfassung	43
6	Abkürzungen	44
7	Literatur	46
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	53

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem als Beschützer der körperlichen Integrität

Unter dem Immunsystem wird ein hochdifferenziertes Abwehrsystem verstanden, welches dem Menschen hilft, seine körperliche Integrität zu bewahren. Die essentielle Aufgabe des Immunsystems ist zwischen *fremd* und *eigen* sowie zwischen *gefährlich* und *ungefährlich* zu unterscheiden. Angriffe durch schädigende Mikroorganismen oder Toxine werden durch spezifische zelluläre und humorale Faktoren abgewehrt.

Es wird das entwicklungsgeschichtlich ältere, angeborene Immunsystem vom erworbenen Immunsystem unterschieden.

Zum Ersteren zählen neben dem Säuremantel der Haut oder der Magensaftproduktion auch die Granulozyten, das Monozyten-Makrophagen-System sowie die natürlichen Killerzellen. Das Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine, Interleukine und Interferone gehören zu den humoralen Faktoren. Die angeborene Immunabwehr nutzt folglich Entzündungsreaktionen und Phagozytose und stellt eine erste Hürde gegen eingedrungene Erreger dar. „Gefährliche“, im Wesentlichen körperfremde Bestandteile werden durch Rezeptoren erkannt, die wiederkehrende Muster (Pathogen Assoziierte Molekulare Muster, PAMP) erkennen. Die Gene dieser Rezeptoren sind in den Zellen eines Individuums konserviert [1].

Das erworbene Immunsystem hingegen arbeitet mit Rezeptoren, deren Gene adaptiv auf einen Fremdbestandteil geändert werden können und somit unterschiedlich in den einzelnen Zellen vorliegen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, um die gleichen Antigene später wiedererkennen und schneller auf sie reagieren zu können. Die dafür zuständigen Zellen sind die T- und die B-Lymphozyten (auch T- und B-Zellen genannt), die über Membran-Rezeptoren passende Antigene erkennen und daraufhin klonal expandieren können. B-Zellen können weiter zu Plasmazellen differenzieren, die Antikörper produzieren, während sich die T-Zellen zu Effektor-T-Zellen entwickeln und weitere Moleküle und Zellen beeinflussen können [2].

Bei der Unterscheidung zwischen eigen und fremd muss das Immunsystem körpereigene Strukturen identifizieren und schützen, autoreaktive Zellen allerdings entfernen. Dieser als Toleranz bezeichnete Prozess kann jedoch gestört sein, sodass autoreaktive Zellen und Autoantikörper überwiegen und Autoimmunopathien entstehen können [3,4].

1.2 B-Lymphozyten sind die Abwehrzellen der humoralen Immunität

B-Zellen stellen die Abwehrzellen des humoralen Immunsystems dar, indem sie zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren können. Mithilfe ihres spezifischen B-Zell-Rezeptors, einer membrangebundenen Variante der Immunglobuline, können sie eine äußerst große Fülle verschiedener Antigene erkennen.

Menschliche B-Zellen durchlaufen während der Entstehung und Reifung verschiedene Entwicklungsstadien, die durch intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflusst werden. Kennzeichnend für jedes einzelne Stadium ist dabei die spezifische Expression verschiedener Immunglobulinisotypen und Proteine auf der Zelloberfläche (CD-Moleküle, Cluster of Differentiation) [5].

1.2.1 B-Zell-Reifung und Differenzierung im Knochenmark

B-Lymphozyten entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Für die Entwicklung sind Signale der Stromazellen des Bindegewebes essentiell, die mithilfe von Zytokinen und Chemokinen die Differenzierung positiv beeinflussen. Über das Stadium der Progenitor-B-Zelle und der Pro-B-Zelle entwickeln sich die Lymphozyten zu Prä-B-Zellen, die durch einen ersten Prä-B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche charakterisiert sind. Die großen Prä-B-Zellen teilen sich anschließend und differenzieren in kleine Prä-B-Zellen. Nach der Expression von IgM auf der Zelloberfläche werden sie nun als unreife B-Zellen bezeichnet. Die Antigenrezeptoren werden jetzt erstmalig auf Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen kontrolliert (Abbildung 1) [6].

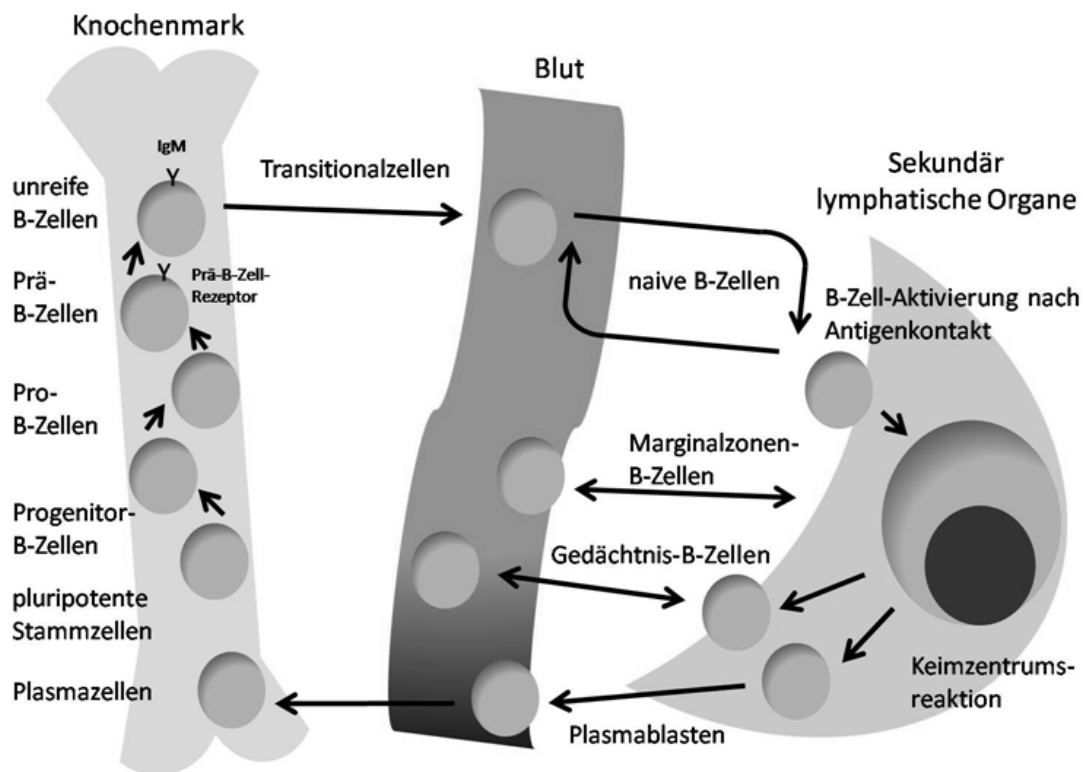


Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung (nach [7])

1.2.2 B-Zell-Entwicklung außerhalb des Knochenmarks

Der weitere Differenzierungsprozess geschieht nun außerhalb des Knochenmarks in den sekundär lymphatischen Organen wie den Lymphknoten, der Milz oder dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). Allerdings erreichen nur 10 bis 20% der unreifen B-Zellen die Milz, da ein großer Teil der Population aufgrund der Expression autoreaktiver B-Zell-Rezeptoren bereits deletiert wurde [8].

Die unreifsten B-Zellen in der peripheren B-Zell-Population werden Transitionalzellen genannt [9–11]. Sie unterliegen erneut positiver und negativer Selektion und differenzieren weiter zu reifen B-Zellen. Wahrscheinlich bilden die naiven B-Zellen den Hauptanteil dieser reifen B-Zell-Population. Auch sogenannte Marginalzonen-B-Zellen (MZ-B-Zellen) gehören womöglich den reifen B-Zellen an [12]. Sie alle zirkulieren anschließend zwischen peripherem Blut und der Milz (Abbildung 1).

Im Rahmen einer Immunantwort treten ortsständige Körperzellen, Dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen miteinander in Kontakt. Dendritische Zellen und B-Zellen präsentieren Antigene über MHC-II-Moleküle, welche von CD4+ T-Zellen erkannt werden. Über Liganden und Rezeptoren wie beispielsweise CD40 und CD154 (CD40L) sowie Interleukine nehmen die B- und die T-Zellen Verbindung auf. Diese Wechselwirkung scheint neben der Aktivierung der B-Zellen auch für den Immunglobulinklassenwechsel von Bedeutung zu sein (Abbildung 2) [13].

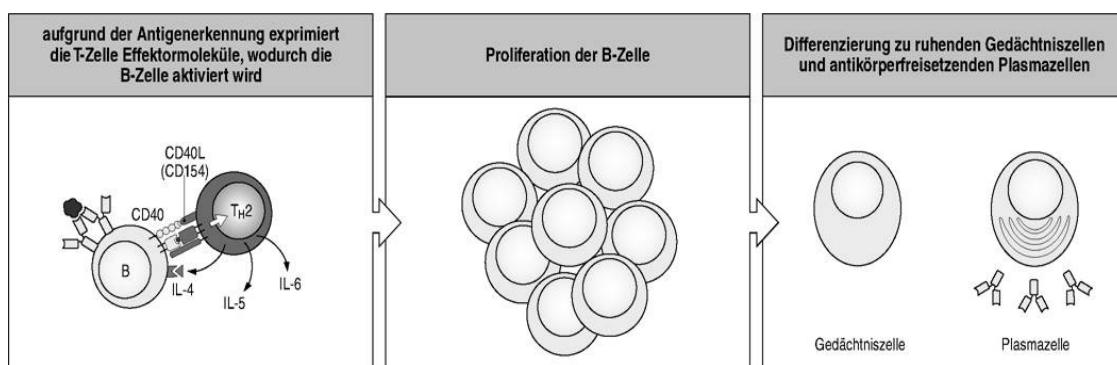


Abbildung 2: B-Zell-Aktivierung [6]

Einige der aktivierten B-Zellen entwickeln sich zu kurzlebigen Plasmazellen. Die anderen B-Zellen wandern in die B-Zell-Follikel der sekundär lymphatischen Organe. Dort unterliegen sie einer starken Proliferation, einer Affinitätsreifung, der Expansion von antigenspezifischen B-Zell-Klonen sowie der Differenzierung in langlebige Gedächtnis- und frühe Plasmazellen [14–16].

Die bei dieser Keimzentrumsreaktion entstehenden Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren durch die sekundär lymphatischen Organe. Die Plasmazellen migrieren in das Knochenmark oder verbleiben im MALT oder der roten Pulpa der Milz, wo sie unter dem Schutz von Zytokinen zu langlebigen Plasmazellen differenzieren [17]. Sie stellen weniger als ein Prozent der Zellen in den lymphatischen Organen. Ihre Vorstufen, sogenannte Plasmablasten, sind nur zu einem geringen Anteil im peripheren Blut nachzuweisen [18].

1.3 Antikörper wirken als lösliche B-Zell-Rezeptoren

Antikörper stellen die lösliche Form des B-Zell-Rezeptors dar. Sie sind tetramere Proteine, die aus zwei schweren (heavy, H-Ketten) und zwei leichten (light, L-Ketten) Polypeptidketten bestehen und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die beiden leichten und die beiden schweren Ketten sind jeweils in einem Immunglobulin identisch.

Der Aufbau eines Antikörpers ähnelt in der Form einem Y. Die beiden Schenkel des Y stellen die variablen Regionen des Antikörpers dar. Diese sogenannten V-Domänen binden das spezifische Antigen. Der Fuß des Y bildet die konstante Region, die mit weiteren Zellen und Molekülen interagiert und den Immunglobulin-Isotyp definiert. Die wichtigsten Immunglobulinklassen sind IgM, IgG, IgA, IgE und IgD [3].

Obwohl jede B-Zelle nur einen einzigen molekular gleichartigen Antikörper exprimiert, wird die Antikörpervielfalt des Menschen auf 10^6 Spezifitäten geschätzt. Um diese hohe Variabilität im Antikörper-Repertoire zu erreichen, werden verschiedene Methoden zur Diversitätserhöhung genutzt.

Die Gene der leichten und schweren Ketten liegen zunächst in Form multipler Gensegmente vor: einer V- (variable), einer D- (diversity), einer J- (joining) sowie einer C- (constant) Region. Der Genabschnitt, der bei der leichten Kette für die variable Region kodiert, setzt sich dabei aus einem V- und einem J- Segment zusammen, bei den schweren Immunglobulinketten aus einem V-, D- und J-Segment. Die einzelnen Segmente eines Gens werden dabei zufällig miteinander kombiniert, sodass eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten entsteht. Um die einzelnen Elemente miteinander in Kontakt zu bringen, müssen mithilfe der RAG-Enzyme (Recombination Activating Gene) dazwischen liegende Genabschnitte herausgeschnitten werden. Dieser Prozess auf DNA-Ebene wird auch als somatische Rekombination bezeichnet [3]. In reifen, aktivierten B-Zellen können durch Punktmutationen außerdem Veränderungen in den Genabschnitten eingefügt werden, welche die variablen Regionen des Antikörpers kodieren. Dieser Vorgang wird somatische Hypermutation genannt. Ferner kann durch zufällige Paarung der leichten und der schweren Ketten

die Variabilität weiter erhöht werden. Durch den Antikörperklassenwechsel (class-switch) kann die konstante Region des Antikörpers und damit auch die biologische Funktion verändert werden [3,4].

1.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung von peripheren B-Zellen

Um verschiedene Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten darstellen zu können, eignet sich die Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting). Dabei gelingt die durchflusszytometrische Phänotypisierung der einzelnen B-Zell-Subpopulationen durch die Kombination verschiedener Oberflächenmarker [5]. B-Zellen können beispielsweise aufgrund ihrer Expression von CD19, CD20 oder CD22 identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde zur Eingrenzung der gesamten B-Zell-Population der Oberflächenmarker CD19 in Kombination mit dem Marker CD45 für Lymphozyten verwendet.

1.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund unterschiedlicher Oberflächenmoleküle bzw. intrazellulärer Strukturen charakterisiert werden. Dafür müssen sie zuvor mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern angefärbt und in Einzelzellsuspension gebracht werden, um später im Durchflusszytometer von einem Laserstrahl erfasst zu werden. Durch die Anregung kommt es zur Emission von Licht einer für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlänge. Trifft der Laserstrahl auf die Zellen, wird das Licht zudem gestreut. Dabei werden das nach 90° gestreute Licht vom SSC-Detektor (Side Scatter, Seitwärtsstreulicht) und das nach 180° gestreute Licht vom FSC-Detektor (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) aufgenommen. Der SSC gibt so Hinweise auf die Granulierung und der FSC auf die Größe einer Zelle. Die emittierten Lichtimpulse werden durch ein System aus Spiegeln und Filtern gelenkt, bis sie auf einen Detektor stoßen. Dort können die ankommenden Signale verstärkt und in Spannungsimpulse umgewandelt werden, die wiederum an einem Computer abgebildet werden können (Abbildung 3). Von der Intensität der Lichtimpulse kann auf diese Weise auf die Bindungshäufigkeit der Zelle mit dem

Antikörper und somit auf die relative Menge des spezifischen Oberflächenmoleküls auf bzw. in der Zelle zurückgeschlossen werden.

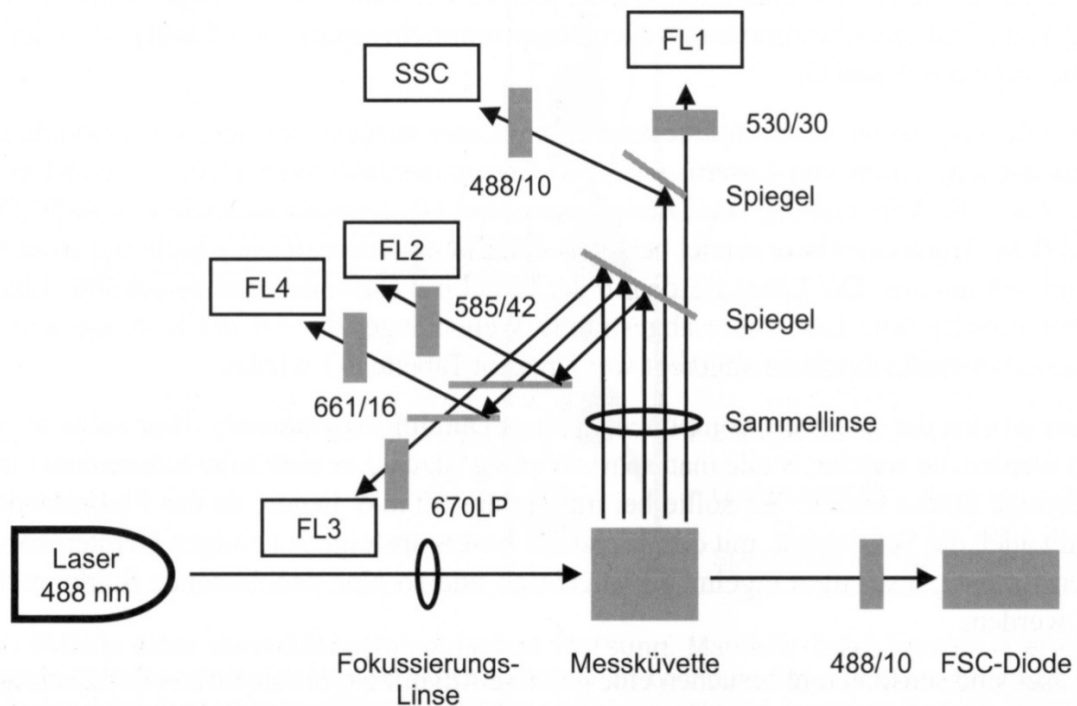


Abbildung 3: Das optische System [19]

1.4.2 CD27- IgD+ Naive B-Zellen

B-Zellen können an Hand des Oberflächenmarkers CD27 und des membranständigen Immunglobulin D in vier verschiedene Populationen eingeteilt werden: CD27+ IgD+, CD27+ IgD -, CD27- IgD+ sowie CD27- IgD- B-Zellen [20–22]. CD27 entspricht einem TNF- und CD70-Rezeptor und ist sowohl auf einigen B- als auch T-Zellen anzutreffen [4].

Die CD27- IgD+ B-Zellen repräsentieren wahrscheinlich die reifen naiven B-Zellen, die bisher keinen Antigenkontakt hatten. Aufgrund des fehlenden Oberflächenmarkers CD27 können die naiven B-Zellen (CD27-) von den Gedächtnis-B-Zellen (CD27+) unterschieden werden [21,23]. Zur Abgrenzung der reifen naiven B-Zellen zu den Transitionalzellen und den Gedächtnis-B-Zellen kann offenbar auch die Aktivität des ABCB1-Transporters (CD243) genutzt werden. Dieses Transmembranprotein scheint

typischerweise in naiven B-Zellen exprimiert zu sein, jedoch nur kaum in Transitionalzellen. Bei Gedächtnis-B-Zellen scheint der ABCB1-Transporter zu fehlen [24].

1.4.3 CD24++ CD38++ Transitionalzellen

Zur Charakterisierung der Transitionalzellen und der Plasmablasten wurden in dieser Arbeit die Oberflächenmarker CD24, ein Zelladhäsionsmolekül und Homolog zum murinen hitzestabilen Antigen, sowie CD38, ein transmembranes Glykoprotein als Differenzierungsmarker, genutzt [4].

Die Transitionalzellen zählen zur Population der naiven B-Zellen. Sie repräsentieren im Nabelschnurblut über die Hälfte aller B-Zellen [25]. Obgleich sie die Verbindung zwischen den Vorstufen des Knochenmarks und den reifen peripheren B-Zellen darstellen, bilden sie eine sowohl funktionell als auch phänotypisch sehr heterogene Gruppe [24].

Womöglich können die Transitionalzellen in weitere Subgruppen unterteilt werden. Das meiste dafür erlangte Wissen stammt bisher aus Untersuchungen am Mausmodell. So wurden aufgrund der Lokalisation und dem Verhalten bei Antigenkontakt verschiedene Transitionalzell-Subtypen bei Mäusen beschrieben. Die sogenannten Transitionalzellen 1 (T1) scheinen in der Milz zu Transitionalzellen 2 (T2) zu reifen. Die T1 scheinen auf die äußere periarterielle lymphatische Scheide (Periarteriolar Lymphoid Sheath, PALS) begrenzt zu sein, während die T2 auch in den Follikeln zu finden sind [26]. Die T2 sind womöglich die ersten Zellen, die den BAFF-Rezeptor (B Cell Activating Factor) als Schlüsselregulator zum Überleben ausbilden. Die Blockade dieses Rezeptors scheint die Differenzierung von T1 zu T2 zu verhindern und eine Weiterentwicklung zu den reifen naiven B-Zellen und den Marginalzonen-B-Zellen zu unterdrücken [27,28]. Transitionalzellen 1 scheinen bei einer Antigen-Aktivierung über den B-Zell-Rezeptor zur Apoptose zu neigen, wohingegen Transitionalzellen 2 vermutlich durch Signale der T-Zellen Überlebensvorteile erhalten und zur Proliferation angeregt werden [29,30]. Eine weitere Population sogenannter Transitionalzellen 3 wurde von Palanichamy et al (2009) beschrieben [10].

Zur Detektion dieser unreifsten B-Zell-Population des peripheren Blutes beim Menschen wurde die Kombination von CD24 und CD38 genutzt. Durch die starke Expression von CD24 und CD38 (CD24⁺⁺ CD38⁺⁺) können sie von naiven B-Zellen (CD24⁺ CD38⁺), Gedächtnis-B-Zellen (CD24⁺ CD38⁻) und Plasmazellen (CD24⁻ CD38⁺⁺) abgegrenzt werden. Die starke Expression von CD38 scheint bei Plasmazellen sowie bei unreifen B-Zellen charakteristisch, wie beispielsweise bei B-Zellen aus dem Knochenmark und der Nabelschnur [9]. In Analogie zu den T1- und T2-Populationen der Maus scheinen sich auch beim Menschen an Hand der Stärke der Expression von CD24 und CD38 innerhalb der Transitionalzellen zwei Populationen abgrenzen zu lassen [10]. Ferner kann aufgrund der unterschiedlich starken Expression von CD21 eine Einteilung in CD21⁻ und CD21⁺ Transitionalzellen erfolgen. Die CD21⁻ Transitionalzellen scheinen dabei unreifer als die CD21⁺ Transitionalzellen zu sein [31].

1.4.4 CD27⁺ IgD⁻, CD27⁺ IgD⁺ und CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen

Die Gedächtnis-B-Zellen werden im Keimzentrum generiert. Sie sind in der Lage, zügig zu Plasmazellen zu differenzieren, die wiederum große Mengen von Immunglobulinen produzieren. Durch die Expression des Oberflächenmarkers CD27 scheint sich womöglich beim Menschen eine große Gruppe an Gedächtnis-B-Zellen abbilden zu lassen, da diese CD27⁺ B-Zellen molekulare Zeichen von Gedächtnis-B-Zellen aufweisen (wie somatische Hypermutation und Immunglobulinklassenwechsel) [20]. Die CD27⁺ IgD⁻ B-Zellen des peripheren Blutes haben bereits einen Immunglobulinklassenwechsel zu IgA, IgG oder IgE vollzogen und scheinen einer Keimzentrumsreaktion aus den sekundär lymphatischen Organen zu entstammen. Neben den klassischen CD27⁺ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen lassen sich beim Menschen auch CD27⁺ IgD⁺ B-Zellen nachweisen, die keinen Klassenwechsel durchgeführt haben, jedoch das Oberflächenmolekül CD27 exprimieren. Die Immunglobulingene dieser Population weisen ebenso Merkmale von Gedächtnis-B-Zellen (somatische Hypermutation) auf [21]. Diese CD27⁺ IgD⁺ B-Zellen scheinen keine Übergangsform zwischen den CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen und den CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen zu bilden. Sie scheinen vielmehr eine eigene Zellpopulation mit Gedächtniszellfunktionen darzustellen [23,32,33]. Deshalb werden sie auch als nicht-

klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet. Möglicherweise vollzieht sich die somatische Hypermutation in diesen B-Zellen außerhalb einer Keimzentrumsreaktion [34]. Es wird vermutet, dass es sich bei dieser B-Zell-Subpopulation auch um zirkulierende Marginalzonen-B-Zellen handeln könnte [12]. Neben den CD27+ Gedächtnis-B-Zellen ist kürzlich eine CD27 negative B-Zell-Population beschrieben worden, die ebenfalls klassische Merkmale von Gedächtnis-B-Zellen aufweist (somatische Hypermutation, Immunglobulinklassenwechsel). Diese B-Zellen sind als CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen oder *doppelt-negative* (CD27- IgD-) Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet worden [35,36].

1.4.5 CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen

Bei einigen Autoimmunkrankheiten und Immundefekten sind erhöhte Frequenzen von B-Zellen beobachtet worden, die eine verminderte Expression des Komplementrezeptors CR2 bzw. C3d-R (CD21) sowie des Differenzierungsmarkers CD38 aufweisen (CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen) [4]. Die bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis und variablem Immundefektsyndrom (CVID) beobachteten CD19+ CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen gehören wahrscheinlich der Population der CD27 negativen naiven B-Zellen an. Der Phänotyp einer aktivierten B-Zelle mit verminderter Expression von CD21 und CD38 ist aber auch bei den CD27 negativen Gedächtnis-B-Zellen bei HIV-infizierten Patienten und in Tonsillen nachgewiesen worden [35,37]. Vermutlich stellen diese CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen einen unspezifischen Phänotyp chronisch aktivierter B-Zellen und weniger ein eigenes Differenzierungsstadium dar [38]. Die CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen scheinen vermehrt autoreaktive Immunglobuline zu exprimieren [39]. Zudem sind sie als gewebeständige B-Lymphozyten mit abgeschwächter Responsivität auf Stimulation über den B-Zell-Rezeptor und Charakteristika von Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben worden [39–42].

1.4.6 CD24- CD38++ Plasmablasten

Die Vorstufen der Plasmazellen, die Plasmablasten, sind bei Gesunden kaum im peripheren Blut zu detektieren. Plasmablasten sind proliferierende, Antikörper produzierende B-Zellen und besitzen durch die Expression der Chemokin-Rezeptoren

CXCR3 und CXCR4 das Potential, die Keimzentrumsreaktion zu verlassen und in das Knochenmark oder in entzündetes Gewebe zu migrieren [43]. Vor allem sechs bis sieben Tage nach einer Vakzinierung lassen sich größere Mengen der Plasmablasten und der Antikörper-produzierenden Plasmazellen im peripheren Blut nachweisen [43]. Plasmablasten können durch ihre stärkere Expression von CD38 und CD27 im Vergleich zu Gedächtnis-B-Zellen charakterisiert werden [44].

1.4.7 Reifestadien Bm1-Bm5

Eine andere Einteilung der B-Zell-Subpopulationen ist von Pascual et al (1994) beschrieben worden. Durch unterschiedlich starke Expressionen der Oberflächenantigene CD38 und IgD können verschiedene Entwicklungsstadien der B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion dargestellt werden: die Bm1- Bm5 (mature B-cells) [45]. Die Bm1 und die Bm2 bilden die Gruppe der naiven B-Zellen. Die prä-germinalen naiven B-Zellen (CD38- IgD+) werden dann den Bm1 zugeordnet. Die größte im peripheren Blut zu detektierende Population entspricht den Bm2, den aktivierten naiven B-Zellen (CD38+ IgD+). Als Bm5 werden die post-germinalen Gedächtnis-B-Zellen (CD38+/- IgD-) bezeichnet. In einer weiteren Arbeit ist dieses Konzept auf die B-Zellen des peripheren Blutes übertragen worden [45,46].

1.5 B-Zell-Veränderungen bei Immundefekten und Autoimmunkrankheiten

Bei Gesunden scheint die Verteilung der B-Lymphozyten einer geregelten Homöostase zu unterliegen. Im Rahmen von Immundefekten oder Autoimmunerkrankungen treten jedoch quantitative oder qualitative Veränderungen in einem oder mehreren Kompartimenten des Immunsystems auf.

Unter primären Immundefekten werden angeborene Störungen des Abwehrsystems verstanden, wobei die humoralen Defekte davon die größte Gruppe stellen. Im Vergleich zu T-Zell-Defekten oder kombinierten Immundefekten sind vorwiegend die B-Zellen betroffen und somit häufig die Antikörperproduktion gestört. Sekundäre Immundefekte treten im Rahmen anderer Grunderkrankungen auf [47].

Veränderungen in der B-Zell-Homöostase treten auch nach B-Zell-depletierender Therapie, zum Beispiel mit einem monoklonalen Antikörper gegen das B-Zell-spezifische Antigen CD20, auf. Studien von Lymphompatienten zeigen im Anschluss an eine solche Therapie einen drastischen Anstieg der Transitionalzellen 1 und 2. Die Population der Gedächtnis-B-Zellen ist im Vergleich dazu bei den betroffenen Patienten geringer ausgeprägt als bei Gesunden [48].

1.5.1 Variables Immundefektsyndrom (CVID)

Als Beispiel für eine gestörte B-Zell-Differenzierung kann das variable Immundefektsyndrom (Common Variable Immunodeficiency, CVID) genannt werden. Es zählt zu den humoralen Immundefekten und ist mit einer Häufigkeit von etwa 1:70 000 anzutreffen. CVID-Patienten fallen klinisch durch rekurrende bakterielle Infektionen, vor allem ungewöhnlich häufig und schwer verlaufende Pneumonien, meist zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade auf [49].

Laut der Europäischen Gesellschaft für Immundefizienzsyndrome (ESID) wird dieser Immundefekt durch die labordiagnostische Verminderung von mindestens zwei Immunglobulin-Isotypen (IgG, IgM, IgA) sowie einer abgeschwächten Immunantwort auf Vakzinierung charakterisiert. Spezifische Ursachen für die Hypogammaglobulinämie müssen ausgeschlossen sein. Außerdem liegt der Krankheitsbeginn dieser Erkrankung charakteristischer Weise bei einem Alter von mehr als zwei Lebensjahren [50].

Zur Klassifizierung der CVID bei erwachsenen Patienten kann die Durchflusszytometrie herangezogen werden. Dafür sind bisher mehrere Klassifizierungssysteme beschrieben worden. Warnatz et al (2002) erstellten die Freiburg-Klassifikation, in der die CVID-Patienten nach der Frequenz der CD27+ IgD- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen und der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen aufgeteilt wurden [51]. In der von Piqueras et al (2003) beschriebenen Paris-Klassifikation wurde neben der Frequenz der CD27+ IgD- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen zusätzlich ein Bezug zu den CD27+ IgD+ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen hergestellt [52].

1.5.1.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zellen von CVID-Patienten: Die EUROClass-Klassifikation

Bei der EUROClass-Klassifikation wurden die Aspekte der zuvor veröffentlichten Freiburg- und Paris-Klassifikationen [51,52] vereint und zudem neue Kriterien eingebracht. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, werden die Patienten zunächst in Hinblick auf die Frequenz von CD19+ B-Zellen untersucht. Patienten mit mehr als 1% B-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes werden nun nach der prozentualen Verteilung der CD27+ IgD- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen charakterisiert. Weiterhin wird der Anteil der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen an der gesamten CD19+ B-Zell-Population betrachtet (normwertig oder weniger als 10%).

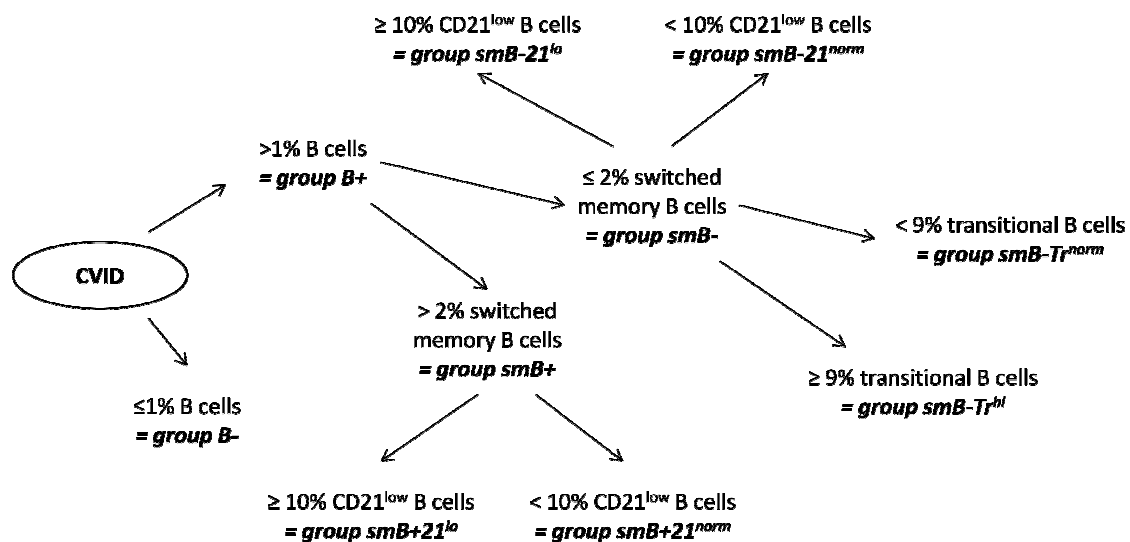


Abbildung 4: Die EuroClass-Klassifikation der CVID (modifiziert nach [41])

Durch die EuroClass-Klassifikation konnte ein Zusammenhang zwischen verminderten Frequenzen für CD27+ IgD- klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen und der Entstehung von Granulomen und einer Splenomegalie verdeutlicht werden [53]. Außerdem konnte eine Assoziation zwischen deutlich erhöhten Frequenzen von CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen und einer autoimmunbedingten Zytopenie nachgewiesen werden [54]. Erhöhte Frequenzen der Transitionalzellen scheinen ferner als Risikofaktor für das Auftreten einer Lymphadenopathie zu gelten [41].

1.5.2 Agammaglobulinämie

Als Beispiel für eine Erkrankung mit kaum nachweisbaren B-Zellen im peripheren Blut kann die Agammaglobulinämie aufgeführt werden. Diese durch Defekte in der frühen B-Zell-Entwicklung bedingte Krankheit ist durch einen schwer reduzierten Serumimmunglobulinspiegel sowie eine deutliche Reduktion oder gar dem Fehlen reifer B-Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet. Im Knochenmark kommt es zu einem Block in der B-Zell-Entwicklung kurz vor der Generierung des Antigenrezeptors [55].

85% der Patienten weisen Mutationen im Gen der Bruton Tyrosin Kinase (btk) auf. Diese Genmutationen sind für die x-chromosomale Agammaglobulinämie M. Bruton (X-Linked Agammaglobulinemia, XLA) verantwortlich [56,57].

Bei einstmals gesunden Neugeborenen fallen vor allem in den ersten fünf Lebensjahren rekurrende Infektionen unter anderem mit Haemophilus influenza, Streptococcus pneumoniae oder RSV (Respiratory Syncytial Virus) [58] sowie schwere Infektionen mit Pseudomonaden oder Staphylokokken auf [59].

1.5.3 Systemischer Lupus Erythematodes

Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) kann als Prototyp einer klassischen Autoimmunkrankheit mit einer B-Zell-Expansion verstanden werden. Er zählt zur Gruppe der Kollagenosen und ist mit dem Auftreten zahlreicher Autoantikörper im Serum assoziiert. Als systemische Erkrankung können alle Organsysteme betroffen sein. Die Patienten leiden insbesondere unter Entzündungen und Gewebsdestruktionen der Gelenke und Muskeln, der Nieren, der Lungen und der Haut. Typisch sind eine ausgeprägte Photosensibilität sowie schmetterlingsförmige Gesichtserythema [47].

Dörner et al (2002) beschrieben, dass Patienten mit SLE verminderte Absolutwerte und Frequenzen der naiven B-Zellen aufweisen. Die Population der Antikörperproduzierenden Plasmablasten sei jedoch deutlich erhöht [60]. Wei et al (2007) fanden heraus, dass SLE-Patienten eine höhere Fraktion der CD27 negativen Gedächtnis-B-Zellen aufweisen, welche bei gesunden Individuen nur geringfügig im peripheren Blut

zu detektieren sind. Diese CD27- IgD- B-Zellen sind überdies signifikant mit der Krankheitsaktivität, dem Auftreten einer Lupus-spezifischen Nephritis sowie dem Vorkommen krankheitsspezifischer Antikörper assoziiert [61]. Auch Transitionalzellen scheinen bei SLE-Patienten deutlich vermehrt im Blut nachweisbar [62], wobei die Höhe der Transitionalzellen nicht mit der Krankheitsaktivität oder anderen krankheitsassoziierten Faktoren zu korrelieren scheint [9,63].

1.6 Fragestellungen

Die Entwicklung und weitere Differenzierung der peripheren B-Zell-Subpopulationen des Menschen unterliegen altersabhängigen Änderungen. Da einige immunologische Krankheiten durch quantitative Veränderungen der B-Zell-Homöostase charakterisiert sind und auch hierüber diagnostiziert oder klassifiziert werden können, sind altersbezogene Normwerte verschiedener B-Zell-Subpopulationen essentiell für dieses Vorgehen. Die ontogenetischen Veränderungen der B-Zell-Homöostase sind bislang allerdings nur unzureichend beschrieben worden.

Es stellt sich die Frage, ob sich die Relativwerte als auch die Absolutzahlen der gesamten B-Zell-Population und der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen - insbesondere der CD27- IgD+ naiven B-Zellen, der CD27+ IgD+ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, der CD27+ IgD- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, der CD27 negativen Gedächtnis-B-Zellen, der CD24++ CD38++ Transitionalzellen, der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen sowie der Plasmablasten - in den verschiedenen Altersstufen im Kindes- und Jugendalter unterscheiden.

Zudem sollen Normwerte für verschiedene Altersgruppen generiert werden, um die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen besser verstehen und Störungen dieser - wie etwa bei Immundefekten und Autoimmunkrankheiten vorkommend - besser identifizieren zu können.

Weiterhin soll untersucht werden, ob die Immunfluoreszenzanfärbung von Zellen aus dem Vollblut in diesem Zusammenhang vergleichbare Ergebnisse erbringt wie die Färbung von Ficoll-separierten mononukleären Zellen. Es soll festgestellt werden, welche dieser beiden Methoden praktikabler bei Routineanalysen einzusetzen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Proben

Alle untersuchten Blutproben stammen von Patienten der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, die im Rahmen diagnostischer oder therapeutischer Zwecke gewonnen wurden. Hinweise auf immunologische, infektiöse oder hämato-onkologische Erkrankungen der Probanden fanden sich nicht. Eine Einverständniserklärung auf Grundlage einer ethischen Prüfung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät lag von den Patienten bzw. ihren Sorgeberechtigten vor.

2.2 Isolierung von mononukleären Zellen

Die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden mit Hilfe einer Ficoll-Hypaque-Zuckerlösung (FicoLiteH, Linaris, Wertheim-Bettingen) mit einer Dichte von 1,077g/ml durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Zunächst wurden 750µl heparinisiertes Blut mit 250µl 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Weiterhin wurden 500µl Ficoll-Paque-Lösung in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, welches dann mit der Blutzellen-Suspension überschichtet wurde. Anschließend wurde dies mit einer Geschwindigkeit von 1500U/min (ohne Bremse) 5min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene weißliche Ring aus PBMC zwischen Ficoll-Paque und Serum wurde daraufhin aufgenommen und mit 1ml FACS-Puffer (Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) + 1% Rinderserumalbumin (BSA), pH 7,4) in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß gegeben (Abbildung 5). Dieser Ansatz wurde erneut bei 1300U/min für 3min zentrifugiert, der Überstand abgeworfen und das entstandene Zellpellet in 500µl FACS-Puffer resuspendiert. Die mononukleären Zellen standen nun zur Anfärbung bereit.

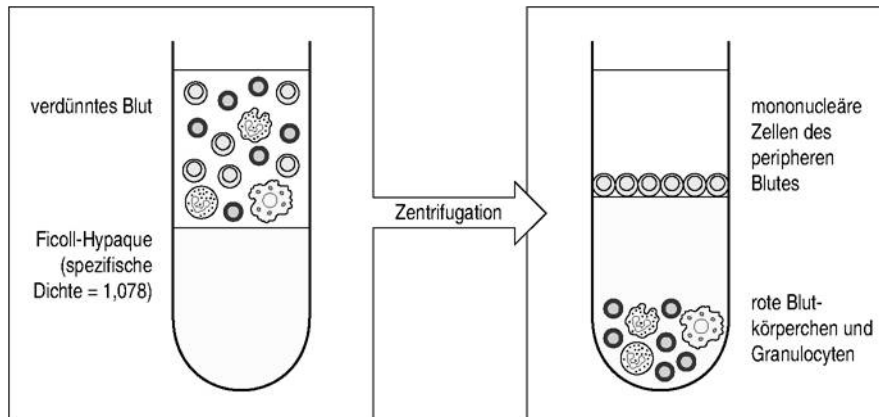


Abbildung 5: Gewinnung der PBMC mit Ficoll-Hypaque [6]

2.3 Färbeprotokoll

100µl der durch Dichtegradientenzentrifugation vorseparierten Zellen wurden jetzt mit je 2µl Antikörper (Tabelle 1) laut Färbeansatz (Tabelle 2) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 20min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 500µl FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Suspension wurde nun bei 1300U/min für 3min zentrifugiert, der Überstand abgeworfen und das Pellet noch einmal in 500µl FACS-Puffer aufgenommen.

Bei 21 Probanden wurde überdies eine Anfärbung des Vollblutes durchgeführt, um diese Methode anschließend mit dem oben genannten Verfahren vergleichen zu können. Das Vollblut wurde zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in PBS und 0,5% BSA resuspendiert und danach wie oben beschrieben gefärbt. Nach dem Anfärben wurden die Erythrozyten mit einer Lyselösung (FACSLysing Solution, BD Biosciences) entsprechend den Herstellerangaben lysiert.

Bindungsstelle	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD 19	APC	SJ25-C1	1:50	Caltag
CD21	FITC	1F8	1:50	Dako
CD24	FITC	SN3	1:50	Caltag
CD27	FITC	LT27	1:50	Caltag
CD38	PE	HIT2	1:50	Caltag
CD45	PerCP	TU116	1:50	BD Biosciences
IgD	PE	IA6-2	1:50	BD Biosciences

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper

Allophycocyanin (APC), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE)

Farbansatz 1	CD19 APC	CD27 FITC
	CD45 PerCP	IgD PE
Farbansatz 2	CD19 APC	CD24 FITC
	CD45 PerCP	CD38 PE
Farbansatz 3	CD19 APC	CD21 FITC
	CD45 PerCP	CD38 PE

Tabelle 2: Färbeansätze

Allophycocyanin (APC), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE)

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Technische Einstellungen

Um die Größe, Granulierung und die Intensität von vier verschiedenen Fluorochrom gekoppelten Antikörpern zu bestimmen, wurde eine 6-Kanal-Analyse (FSC, SSC, Fluoreszenzkanäle FL1-4) verwendet. Zur Erfassung sämtlicher durchflusszytometrischer Ergebnisse wurde ein FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) genutzt. Die Signale wurden linear (Streulicht) sowie logarithmisch (Fluoreszenz) verstärkt. Um den bestmöglichen Wert der Spannung an den jeweiligen

Detektoren zu ermitteln, wurden zuvor Gegenproben mit den einzelnen Fluoreszenz-Antikörpern und Isotypenkontrollen durchgeführt. Die Detektoren wurden daraufhin gegenseitig so kompensiert, dass die Emission eines bestimmten Antikörpers in den anderen Detektoren so gering wie möglich gehalten wurde, damit eindeutige Signale im Laufe der Messung erfasst werden konnten. Die ermittelten Daten wurden abschließend mit einer Software (Cellquest Version 3.1, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

2.4.2 Auswertungs-Strategien

Die Auswertungs-Strategien werden in Abbildung 6 gezeigt. Anhand des Side Scatters (SSC) und der Expression von CD45 wurde die Lymphozyten-Population innerhalb der PBMC charakterisiert (R1). Die CD19 exprimierenden Zellen der Lymphozyten-Population wurden als B-Zellen (R2) definiert. Die CD19+ B-Zellen wurden weiterhin nach CD27 und IgD, CD24 und CD38 sowie nach CD21 und CD38 aufgetrennt. Dabei wurden folgende B-Zell-Subpopulationen analysiert (Abbildung 6): CD27- IgD+ (R3, naive B-Zellen), CD27+ IgD+ (R4, nicht-klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen), CD27+ IgD- (R5, klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen), CD27- IgD- (R6, CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen), CD24++ CD38++ (R7, Transitionalzellen), CD24- CD38++ (R8, Plasmablasten) und CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen (R9).

Die absolute Anzahl der Zellen wurde durch Multiplikation der relativen B-Zell-Population mit der absoluten Anzahl der Lymphozyten errechnet, welche im Differenzialblutbild automatisch ausgewertet worden ist.

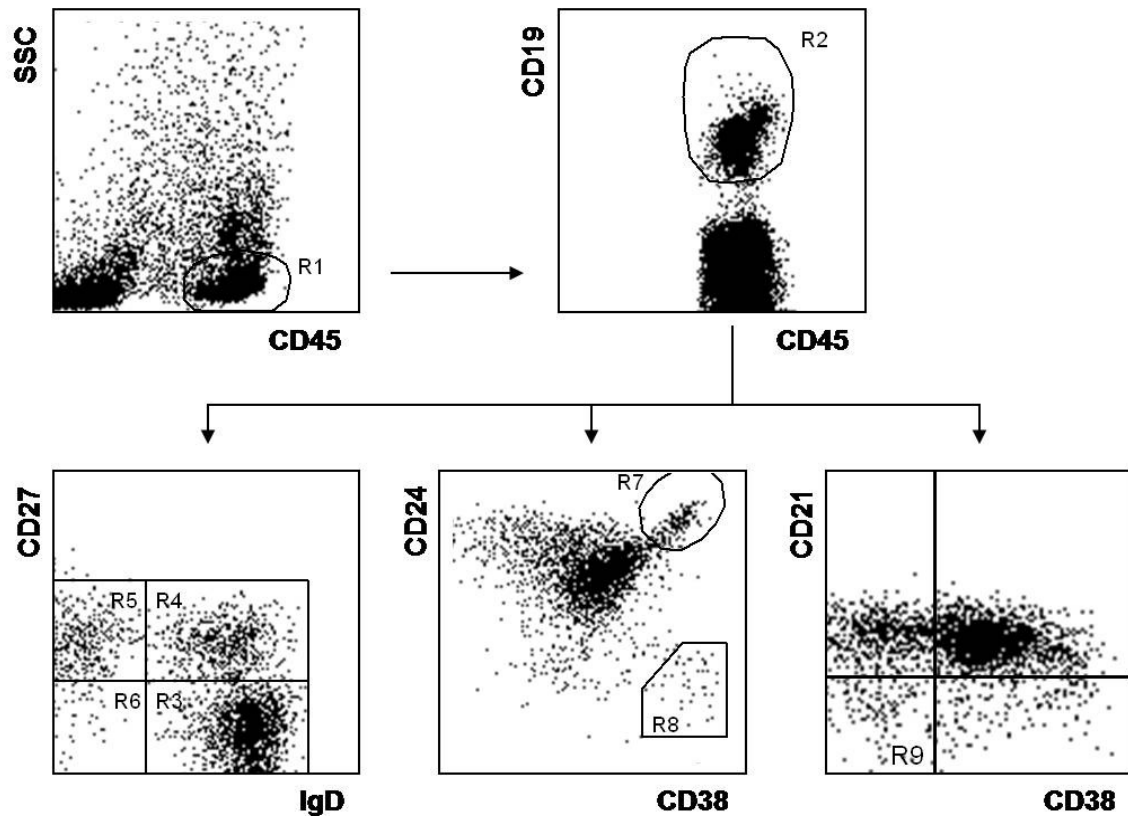


Abbildung 6: Auswertungs-Strategien zur Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen

Lymphozyten (R1), B-Zellen (R2), CD27- IgD+ (R3, naive B-Zellen), CD27+ IgD+ (R4, nicht-klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen), CD27+ IgD- (R5, klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen), CD27- IgD- (R6, CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen), CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ (R7, Transitionalzellen), CD24⁻ CD38⁺⁺ (R8, Plasmablasten), CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen (R9)

2.5 Statistische Auswertungen

Die Daten wurden mit GraphPad Prism, SAS/ STAT und Microsoft Office Excel analysiert. Altersabhängige Veränderungen der B-Zell-Populationen wurden durch ein generalisiertes additives Modell (GAM) dargestellt. Durch eine nicht-parametrische Regressionsanalyse wurde eine Spline-Kurve ermittelt. Es wurden Referenzwerte für sieben Altersgruppen generiert, für welche sowohl Mediane als auch die 25. und 75. Perzentile errechnet wurden. Statistische Abhängigkeiten zwischen zwei Variablen wurden mithilfe des Spearmans Rangkorrelationskoeffizient getestet. P-Werte < 0,05 wurden dabei als statistisch bedeutsam betrachtet.

2.6 Materialien und Geräte

Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ficoll-Paque-Zuckerlösung	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
FACSLysing Solution	BD Biosciences, Deutschland
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten verschiedener Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland

3 Ergebnisse

Die ontogenetischen Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen von der Kindheit bis zum Erwachsenen wurden bisher nur unzureichend charakterisiert. Um Normwerte für verschiedene Altersklassen zu generieren, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Populationen aus dem peripheren Blut von Kindern und Erwachsenen durchgeführt.

3.1 Probanden und Altersgruppen

221 Kinder und Erwachsene, vom Neugeborenen bis zu einem Alter von 50 Jahren (medianes Alter 10,1 Jahre), wurden in diese Arbeit einbezogen. Die Kohorte wurde in sieben Altersgruppen unterteilt, wobei die Alterseinschränkung im frühen Kindesalter enger und mit steigendem Alter etwas größer gefasst wurde: Altersgruppe von 0 bis < 1,0 Jahr (n=31), 1,0 bis < 3,0 Jahre (n=29), 3,0 bis < 5,0 Jahre (n=19), 5,0 bis < 10,0 Jahre (n=28), 10,0 bis < 18,0 Jahre (n=51), 18,0 bis < 25,0 Jahre (n= 31) und 25,0 bis < 50,0 Jahre (n=32). Die Geschlechtsverteilung war dabei in allen Altersgruppen annähernd gleich (Gesamtkohorte: m=107, w=114).

3.2 Relativ- und Absolutwerte der B-Zell-Subpopulationen

Die altersabhängigen Frequenzen und Absolutwerte der gesamten B-Zellen als auch ihrer Subpopulationen sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 grafisch dargestellt. Die Absolutwerte der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen sind dabei einerseits abhängig von der relativen Frequenz jeder B-Zell-Subpopulation, andererseits auch abhängig von den Veränderungen der gesamten B-Zell-Population.

In Tabelle 3 und Tabelle 4 werden die Frequenzen und Absolutwerte der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen sowohl als Mediane als auch mit der 25. und 75. Perzentile aufgeführt. Die Frequenzen und Absolutzahlen der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen wurden dabei in einer nach Alter stratifizierten Untergruppe von Patienten (n=64) analysiert.

Es wird deutlich, dass die B-Zell-Subpopulationen altersabhängige Veränderungen zeigen, die vor allem in den ersten fünf Lebensjahren am prägnantesten sind. Diese Veränderungen sollen nun im Detail erläutert werden.

3.2.1 CD19+ B-Zellen

Die Population der gesamten B-Zellen wurde anhand ihrer Expression von CD45 und CD19 erfasst (siehe Abbildung 6). Wie Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen, nahm sowohl die relative Häufigkeit der CD19+ B-Zellen innerhalb der CD45+ Lymphozytenpopulation als auch die absolute Anzahl der CD19+ B-Zellen mit zunehmendem Alter ab. Abbildung 8 verdeutlicht, dass die Absolutwerte der CD19+ B-Zellen insbesondere in den ersten zehn Lebensjahren auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes abfielen und sich danach stabil hielten. Diese Tendenz spiegelt sich auch in den generierten Medianen der verschiedenen Altersgruppen wieder.

3.2.2 CD27- IgD+ Naive B-Zellen und CD24++ CD38++ Transitionalzellen

Wie Abbildung 7 und Abbildung 8 verdeutlichen, zeigte sich in der untersuchten Kohorte mit zunehmendem Alter eine Verminderung sowohl der relativen Frequenzen als auch der Absolutwerte der CD24++ CD38++ Transitionalzellen und der CD27- IgD+ naiven B-Zellen.

Die Frequenz der CD24++ CD38++ Transitionalzellen von allen CD19+ B-Zellen fiel von 10,9% im ersten Lebensjahr auf 2% bei Erwachsenen älter als 25 Jahre (Altersgruppen bezogener Median, Tabelle 3). Die Altersgruppen mediane Anzahl der CD27- IgD+ naiven B-Zellen lag im ersten Lebensjahr bei 860 Zellen pro μ l Blut und fiel auf 131 Zellen pro μ l Blut bei Erwachsenen älter als 25 Jahre (Tabelle 4).

3.2.3 CD27+ IgD-, CD27+IgD+ und CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen

Abbildung 7 zeigt, dass die relative Häufigkeit der CD27+ IgD- klassengewechselten und der CD27+ IgD+ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen innerhalb der CD19+ B-Zellen mit zunehmendem Alter anstiegen. In Tabelle 3 ist erkennbar, dass der Altersgruppen bezogene Median der Frequenz CD27+ IgD- klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen an den CD19+ B-Zellen von 1% im ersten Lebensjahr auf 13,2% bei

> 25-Jährigen anstieg. Die mediane relative Häufigkeit CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen zeigte einen Anstieg von 2,5% im ersten Lebensjahr auf 15,2% bei > 25-Jährigen.

3.2.4 CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen

Sowohl die relative als auch die absolute Häufigkeit der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen waren in allen Altersgruppen gering. Beide Parameter schienen keine wesentlichen altersbezogenen Veränderungen aufzuweisen.

3.2.5 CD24⁻ CD38⁺⁺ Plasmablasten

Plasmablasten waren im peripheren Blut nachzuweisen und schienen keine altersbezogenen Veränderungen ihrer Häufigkeit aufzuweisen (Abbildung 7 und Abbildung 8). Die mediane relative Häufigkeit der Plasmablasten überstieg dabei nicht 1,5% der CD19⁺ B-Zellen (Tabelle 3).

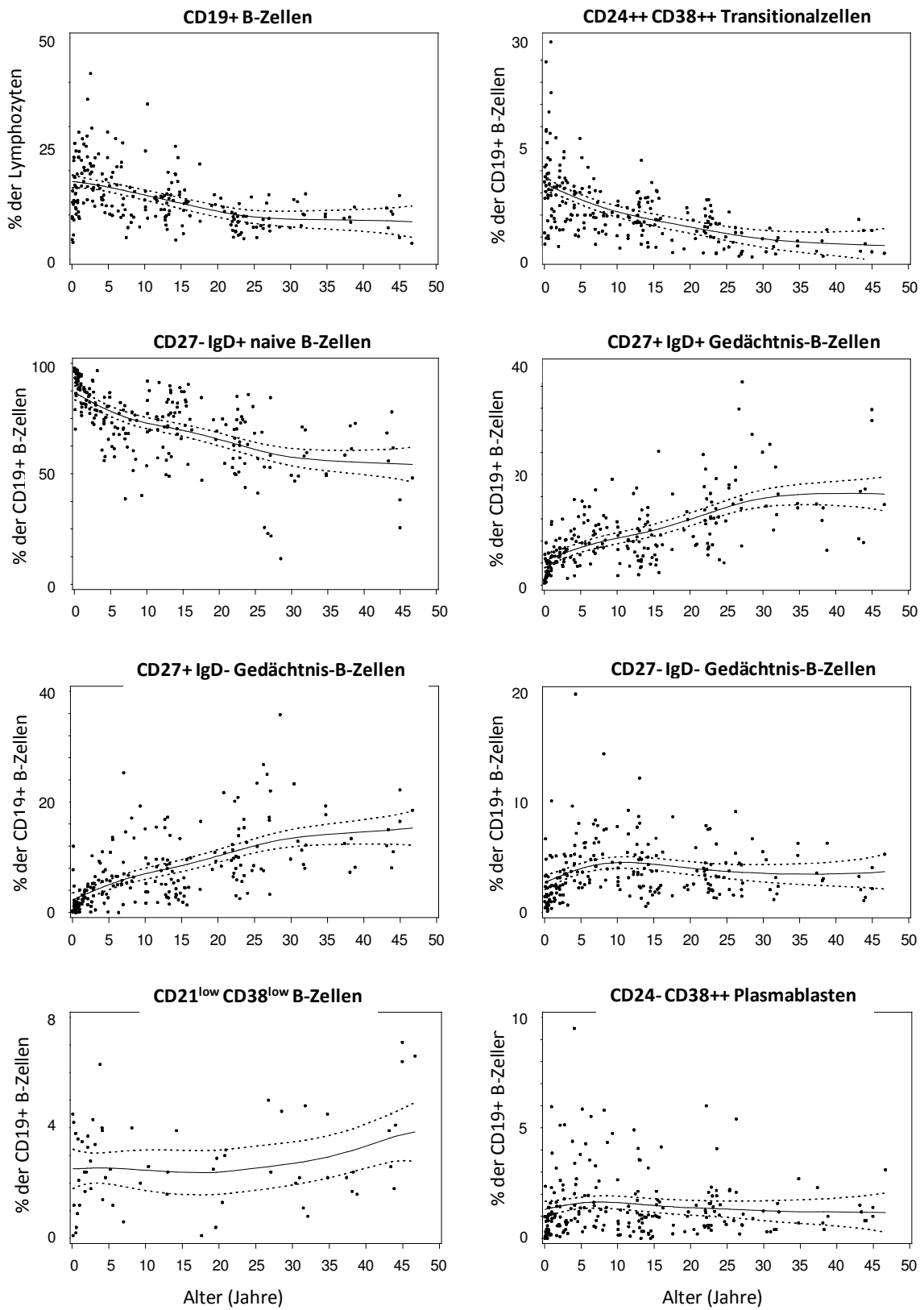


Abbildung 7: Relative Häufigkeit der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen über das Alter

Abbildung 7: Die relative Häufigkeit der gesamten B-Zellen wird als Prozentangabe der gesamten Lymphozytenpopulation wiedergegeben. Die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen werden als Prozentangabe der CD19+ B-Zellen von jedem Probanden in Abhängigkeit zum Alter gezeigt. Die durchgezogenen Linien stellen dabei die Spline-Kurve aus dem generalisierten additiven Modell dar und die gepunkteten Linien entsprechen dem 95%-Konfidenzintervall. Die B-Zell-Populationen wurden entsprechend der in Abbildung 6 abgebildeten Auswertungsstrategie analysiert.

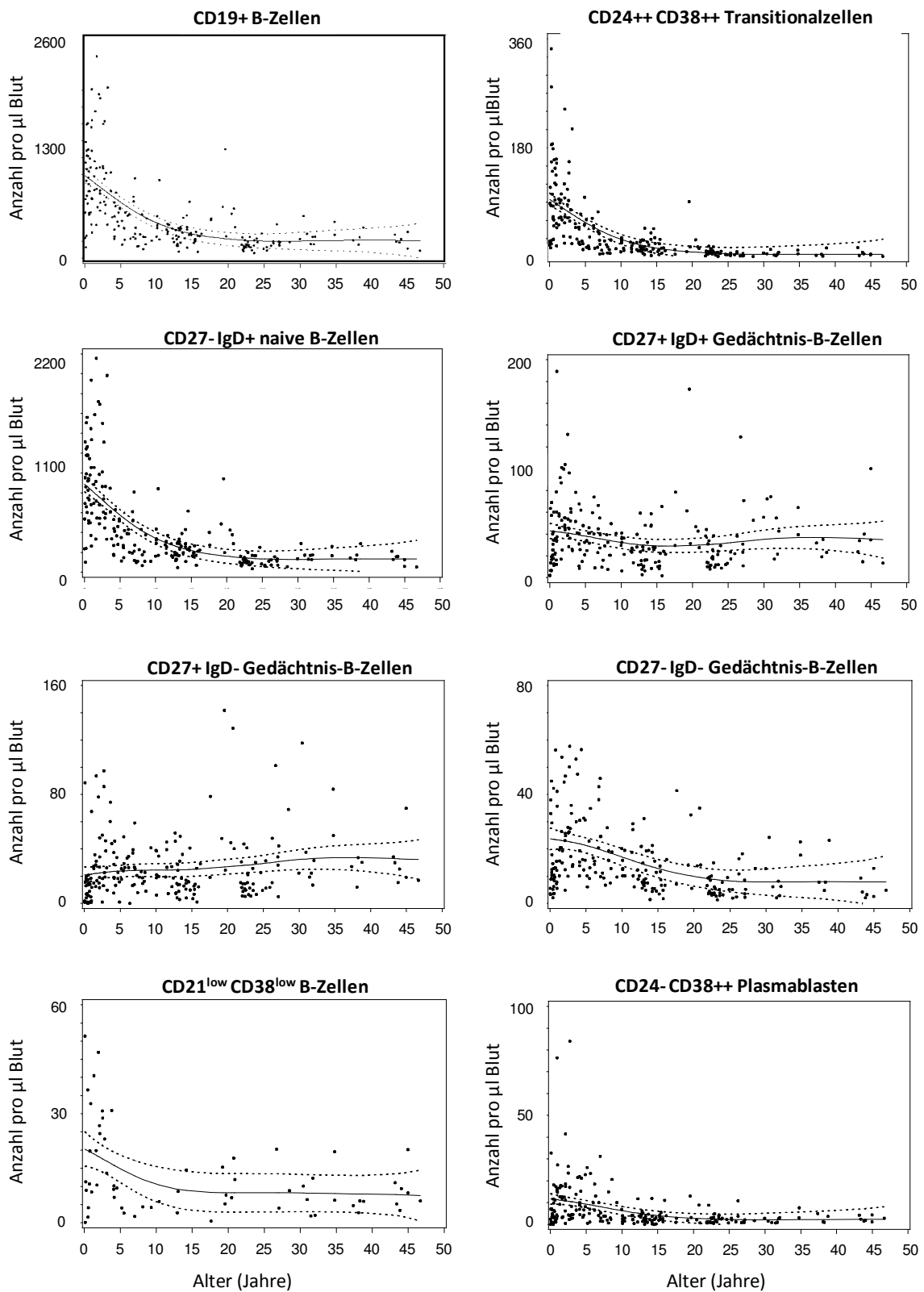


Abbildung 8: Absolutwerte der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen über das Alter

Abbildung 8: Die Absolutwerte der gesamten B-Zell-Population sowie der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen pro μl Blut von jedem analysiertem Individuum werden in Abhängigkeit zum Alter wiedergegeben. Die durchgezogenen Linien stellen dabei die Spline-Kurve aus dem generalisierten additiven Modell dar und die gepunkteten Linien entsprechen dem 95%-Konfidenzintervall. Die B-Zell-Populationen wurden entsprechend der in Abbildung 6 abgebildeten Auswertungsstrategie analysiert.

Alter (in Jahren)	0 - < 1,0	1,0 - <	3,0 - <	5,0 - <	10,0 - <	18,0 - <	25,0 - <
(Anzahl Individuen)	(n = 31)	(n = 29)	(n = 19)	(n = 28)	(n = 51)	(n = 31)	(n = 32)
CD45+	60.9	54.7	44.0	38.2	35.3	32.1	32.9
Lymphozyten	53.0-68.1	50.2-61.1	32.3-50.4	29.5-43.3	29.8-39.6	25.5-39.4	29.8-45.6
CD19+	13.3	20.8	16.1	12.2	13.3	9.1	9.2
B-Zellen	10.2-18.5	16.5-25.8	13.4-21.1	9.8-17.7	10.2-15.4	6.6-10.8	7.2-11.2
CD27- IgD+	93.7	85.9	81.3	75.4	80.8	74.7	65.1
Naive B-Zellen	90.9-96.2	83.4-90.1	76.3-84.9	69.4-80.4	75.2-86.7	65.6-79.6	58.0-72.1
CD27+ IgD+	2.5	5.4	6.5	10.0	7.3	11.7	15.2
Nicht- klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen	1.6-4.1	4.2-6.9	4.1-9.0	7.5-12.4	4.6-10.2	7.4-13.9	13.4-21.4
CD27+ IgD-	1.0	2.6	5.6	6.5	5.4	9.4	13.2
Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen	0.1-1.9	1.5-4.1	3.3-7.4	5.2-12.1	3.3-9.6	7.2-12.7	9.2-18.9
CD27- IgD-	1.5	2.5	4.5	5.0	3.7	3.2	3.3
CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen	0.9-2.4	1.6-3.6	3.4-6.1	3.5-6.6	2.3-5.5	2.1-4.4	2.1-5.3
CD24++ CD38++	10.9	8.7	7.3	6.0	5.6	4.7	2.0
Transitionalzellen	8.3-15.8	5.1-10.7	5.4-9.2	4.5-9.2	3.9-7.8	3.0-5.9	1.0-3.6
CD21 ^{low} CD38 ^{low}	1.7	2.6	3.7	2.3	2.4	2.7	2.4
	0.3-4.0	1.8-3.6	1.8-5.2	0.9-3.5	0.9-3.3	0.9-3.1	1.8-4.7
CD24- CD38++	0.4	1.1	1.4	1.5	1.0	1.2	1.0
Plasmablasten	0.2-1.0	0.6-2.3	0.8-2.7	0.7-3.5	0.3-1.7	0.6-1.6	0.6-1.6

Tabelle 3: Relative Häufigkeit der B-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Altersgruppen

Die Frequenz der CD45+ Lymphozyten wird prozentual von allen Leukozyten, die Frequenz der CD19+ B-Zellen wird prozentual von allen Lymphozyten und die Frequenz der B-Zell-Subpopulationen wird prozentual von allen CD19+ B-Zellen für die jeweiligen Altersgruppen angegeben. Dargestellt ist der altersbezogene Median sowie in der zweiten Reihe die 25. und 75. Perzentile.

Alter (in Jahren)	0 - < 1,0	1,0 - < 3,0	3,0 - < 5,0	5,0 - < 10,0	10,0 - < 18,0	18,0 - < 25,0	25,0 - < 50,0
(Anzahl Individuen)	(n = 31)	(n = 29)	(n = 19)	(n = 28)	(n = 51)	(n = 31)	(n = 32)
CD45+	6763	4895	3355	2617	2128	2182	2364
Lymphozyten	4947-8001	3852-6037	2594-4830	2058-3039	1849-2788	1614-2462	1943-2790
CD19+	924	978	590	289	304	165	199
B-Zellen	549-1225	670-1619	402-784	228-516	226-370	133-255	169-271
CD27- IgD+	860	863	461	220	230	119	131
Naive B-Zellen	537-1179	571-1323	334-611	133-389	171-293	92-199	112-169
CD27+ IgD+	21	53	40	37	24	19	35
Nicht- klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen	12-36	38-90	25-60	22-43	12-32	12-34	22-54
CD27+ IgD-	7	23	26	24	17	15	29
Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen	1-16	13-42	16-44	16-31	10-29	10-31	18-40
CD27- IgD-	10	25	30	15	10	5	7
CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen	6-15	16-39	14-36	10-24	7-19	4-10	4-13
CD24++ CD38++	94	80	46	17	14	8	4
Transitionalzellen	29-157	56-101	23-71	13-36	10-24	5-13	2-6
CD21 ^{low} CD38 ^{low}	11	26	10	4	6	10	6
	3-35	15-36	8-23	3-4	2-12	6-17	4-11
CD24- CD38++	4	13	8	5	3	2	2
Plasmablasten	1-7	4-19	5-15	2-12	1-4	1-3	1-3

Tabelle 4: Absolutwerte der B-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Altersgruppen

Die Absolutwerte der CD45+ Lymphozyten, der totalen CD19+ B-Zellen und die der B-Zell-Subpopulationen pro µl Blut werden mit dem altersbezogenen Median sowie in der zweiten Reihe mit der 25. und 75. Perzentile für jede Altersgruppe dargestellt.

3.3 Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung von PBMC und Vollblut

Die zuvor beschriebenen Daten der ontogenetischen Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen wurden durch durchflusszytometrische Bestimmung von durch Dichtegradientenzentrifugation separierten PBMC gewonnen. Weitaus praktikabler erscheint die Methode der Immunfluoreszenzfärbung im Vollblut mit anschließender Erythrozytenlyse. Deshalb wurde die Immunfluoreszenzfärbung der beschriebenen B-Zell-Subpopulationen bei 21 Individuen mit beiden Färbemethoden durchgeführt und die jeweiligen Werte bezüglich einer möglichen Korrelation analysiert. Die relative Häufigkeit jeder einzelnen B-Zell-Subpopulation zeigte eine statistisch relevante positive Korrelation zwischen beiden Verfahren (Abbildung 9).

Zusätzlich wurde analysiert, ob sich die relative Häufigkeit der CD19+ B-Zellen in Abhängigkeit zweier verschiedener Auswertungs-Strategien für das Lymphozytenfenster unterscheiden. Die Auswertungsstrategien waren: FSC/ SSC (Vorwärtsstreuung/ Seitwärtsstreuung) und CD45/ SSC (CD45/ Seitwärtsstreuung). Die relative Häufigkeit der B-Zellen zeigte dabei eine signifikante Korrelation zwischen beiden Auswertungsstrategien. Das galt sowohl für die Vollblutmethode ($r=0,98$, $p<0,001$) als auch für das Verfahren mit separierten PBMC ($r=0,99$, $p<0,001$).

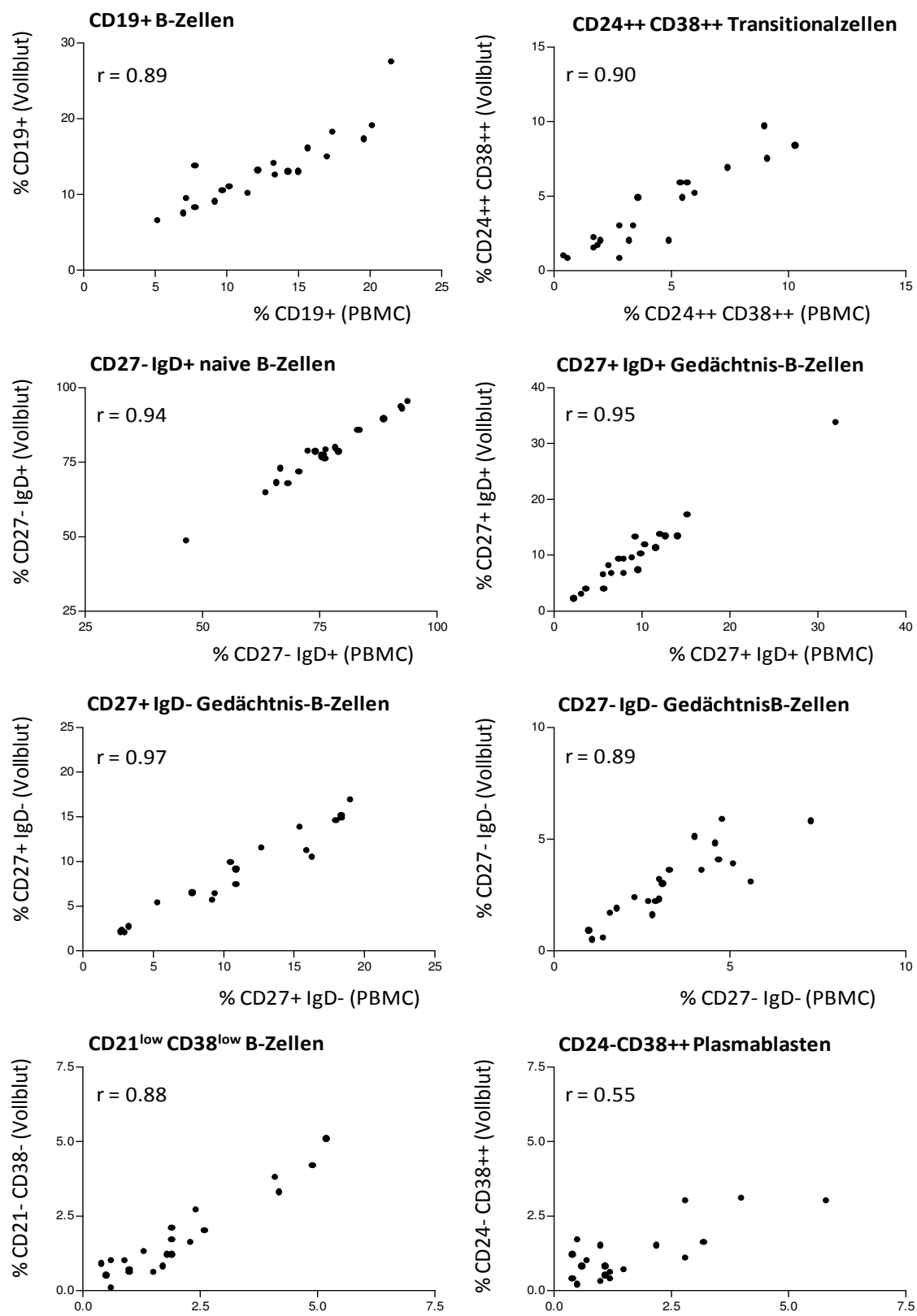


Abbildung 9: Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung von PBMC und Vollblut

Abbildung 9: Vergleich der durchflusszytometrischen Analyse der B-Zell-Subpopulationen mittels der Immunfluoreszenzfärbung im Vollblut und anschließender Erythrozytenlyse sowie der Immunfluoreszenzfärbung der durch Dichtegradientenzentrifugation separierten PBMC.

4 Diskussion

B-Lymphozyten sind die zellulären Träger der humoralen Immunität des adaptiven Immunsystems. Die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen unterliegen einer geregelten Homöostase. Störungen dieser Homöostase können die Grundlage von Immundefekten und Autoimmunerkrankungen darstellen.

In den letzten Jahren sind durch spezialisierte durchflusszytometrische und molekularbiologische Untersuchungstechniken bereits verschiedene B-Zell-Populationen charakterisiert worden, welche altersabhängigen Veränderungen unterliegen [9–12,21,24,33,35,36,42,45,61]. Gleichzeitig sind B-Zell-Entwicklungsstörungen und B-Zell-Verteilungsstörungen bei verschiedenen immunologischen Krankheiten beschrieben worden [41,64,65]. Von altersbezogenen Normwerten der unterschiedlichen B-Zell-Subpopulationen ist bisher allerdings nur unzureichend berichtet worden [66].

In dieser Arbeit sollen daher ontogenetische Veränderungen in den einzelnen peripheren B-Zell-Subpopulationen von der Kindheit bis ins Erwachsenenalter charakterisiert und altersabhängige Referenzwerte generiert werden.

4.1 Analysestrategie der B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes

Zur Darstellung der unterschiedlichen Subpopulationen der B-Lymphozyten des peripheren Blutes ist eine durchflusszytometrische Phänotypisierung von immunfluoreszenzgefärbten PBMC durchgeführt worden. Die B-Zellen sind dabei durch die Kombination der Oberflächenmarker CD19 und CD45 charakterisiert worden (siehe Abbildung 6). Durch die Expression weiterer Oberflächenmoleküle wie IgD, CD21, CD24, CD27 und CD38 können die CD19+ B-Zellen in unterschiedliche B-Zell-Subpopulationen eingeteilt werden.

Die frühesten B-Zellen, die in der peripheren Blutzirkulation zu detektieren sind, werden als Transitionalzellen bezeichnet [9–11]. Zur Charakterisierung dieser B-Zell-Population sind bereits verschiedene durchflusszytometrische Ansätze vorgeschlagen worden. Unter anderem können diese Zellen an Hand der Oberflächenmarker CD5 und

CD10, der starken Expression von CD24, CD38 und IgM sowie dem Fehlen von CD27 von anderen B-Zell-Subpopulationen abgegrenzt werden [9–11,41]. Zur Diskriminierung zwischen Transitionalzellen und reifen naiven B-Zellen kann auch die Aktivität des ABCB1-Transporters genutzt werden. Dabei handelt es sich um ein ATP-bindendes Transmembranprotein, welches typischerweise bei naiven B-Zellen exprimiert wird, jedoch bei Transitionalzellen nur wenig und bei Gedächtnis-B-Zellen gar nicht zu finden sein scheint [24].

Obwohl in der letzten CVID-Klassifikation die starke Expression von IgM und CD38 zur Bestimmung der Transitionalzellen vorgeschlagen worden ist [41], sind in dieser Arbeit die Marker CD24 und CD38 zur Detektion der CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen verwendet worden. Die CD24/ CD38- Methode scheint nämlich zur Differenzierung weiterer Reifestadien der Transitionalzellen vorteilhaft zu sein. Palanichamy et al (2009) berichten an Hand der unterschiedlich starken Expression von CD38 und CD24 von zwei unterschiedlichen Populationen der Transitionalzellen: T1 (CD24⁺⁺⁺ CD38⁺⁺⁺) und T2 (CD24⁺⁺ CD38⁺⁺). Eine weitere Population mit einer ähnlich den naiven B-Zellen geringen Expression von CD24 und CD38 jedoch fehlender ABCB1-Transporteraktivität wurde als sogenannte T3-Transitionalzelle bezeichnet [10]. Lee et al (2009) beschreiben eine CD5 positive unreife B-Zell-Population, die eine intermediäre Expression von CD38 aufweist und CD10 exprimiert. Diese B-Zellen werden als prä-naive B-Zellen bezeichnet, da sie ein Entwicklungsstadium zwischen den Transitionalzellen und den naiven B-Zellen darzustellen scheinen [11]. Neben der Charakterisierung der Transitionalzellen können an Hand der Färbung von CD24 und CD38 auch CD24⁻ CD38⁺⁺ Plasmablasten detektiert werden.

Menschliche Gedächtnis-B-Zellen können durch die Expression von CD27 von reifen naiven CD27⁻ IgD⁺ B-Zellen abgegrenzt werden [21]. Mithilfe des membranständigen IgD können weitere Subgruppen der Gedächtnis-B-Zellen unterschieden werden: die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten, die CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselten und die CD27⁻ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen. Vermutlich unterscheiden sich die Differenzierungswege der CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselten von denen der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen. Die CD27⁺ IgD⁻

klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen haben wahrscheinlich eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen. Die CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen scheinen sich hingegen unabhängig von der Keimzentrumsreaktion zu entwickeln [12,34]. Es wird angenommen, dass die CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen die zelluläre Grundlage für die T-Zell-unabhängige humorale Immunität darstellen. Die Immunität vor allem gegenüber bekapselten Bakterien könnte auf die Anwesenheit dieser Gedächtnis-B-Zellen zurückzuführen sein [67]. Neben den CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen können im peripheren Blut als auch in den Tonsillen CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen detektiert werden. Diese B-Zell-Population exprimiert nicht den Oberflächenmarker CD27, weist jedoch andere Merkmale von Gedächtnis-B-Zellen (wie somatische Hypermutation und Immunglobulinklassenwechsel) auf [35,36]. Die Rolle dieser B-Zell-Subpopulation im physiologischen Kontext ist bisher allerdings nur unzureichend aufgeklärt.

In dieser Arbeit sind folglich die Marker CD27/ IgD zur Charakterisierung der verschiedenen Gedächtniszellpopulationen genutzt worden. Auch bei der CVID-Klassifikation wird diese durchflusszytometrische Charakterisierung verwendet [41], die vor allem Wert auf die Frequenz der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen legt.

Bei verschiedenen Immundefekten und Autoimmunerkrankungen sind erhöhte Frequenzen von CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen beobachtet worden [39–42]. In der EuroClass-Klassifikation der CVID werden CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen miterfasst, da sie mit einer erhöhten Prävalenz einer Splenomegalie zu korrelieren scheinen [41]. Die Farbkombination der Oberflächenmarker CD21/ CD38 ist demgemäß auch in dieser Arbeit verwendet worden.

4.2 Unterliegen die B-Zell-Subpopulationen ontogenetischen Veränderungen?

Bezugnehmend auf die oben erwähnten immunphänotypischen Untersuchungsmethoden konnten ontogenetische Veränderungen in der Zusammensetzung der peripheren B-Zell-Population beobachtet werden. Diese sind

vor allem in den ersten fünf Lebensjahren am auffälligsten (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Die Gesamtanzahl der CD19+ B-Zellen fällt mit steigendem Alter ab. Eine Verschiebung von den in der Kindheit vorherrschenden CD24++ CD38++ Transitionalzellen und den CD27- IgD+ naiven B-Zellen zu den Gedächtnis-B-Zellen im Erwachsenenalter ist erkennbar. Während der relative Anteil der CD27+ IgD+ nicht-klassengewechselten und der CD27+ IgD- klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen mit dem Alter zunehmend ansteigt, verhält sich die absolute Anzahl dieser Gedächtnis-B-Zellen relativ stabil über das Alter hinweg (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Die relative Häufigkeit der CD27 negativen Gedächtnis-B-Zellen scheint dagegen nur in den ersten fünf Jahren des Lebens anzusteigen und bleibt danach stabil (siehe Abbildung 7).

Die Verminderung der CD19+ B-Zellen nach den ersten fünf Lebensjahren könnte mit der Reduktion der CD24++ CD38++ Transitionalzellen und der CD27- IgD+ naiven B-Zellen im Zusammenhang stehen. Ein Grund dafür könnte ein verminderter Ausstoß unreifer B-Zellen aus dem Knochenmark sein. Die Frequenzzunahme der Gedächtnis-B-Zellen innerhalb der B-Zell-Population kann mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses erklärt werden. Die Zunahme der Gedächtnis-B-Zellen mit dem Alter scheint mit der allgemein beobachteten Abnahme der Häufigkeit von Infektionen insbesondere ab dem Kleinkindesalter einherzugehen. Der Anteil der Gedächtnis-B-Zellen könnte dabei aufgrund des ständigen Antigenkontakts mit steigendem Alter zunehmen.

Die CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen sowie die CD24- CD38++ Plasmablasten können nur in geringer Anzahl im peripheren Blut nachgewiesen werden. Sie scheinen jedoch keinen signifikanten ontogenetischen Veränderungen zu unterliegen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Untersuchungen von Patienten mit einer B-Zell-Depletion einhergehenden Therapie zeigen ähnliche der in dieser Arbeit beschriebenen zeitlichen Veränderungen der B-Zell-Populationen und können die Hypothese der ontogenetischen Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen bestätigen. So zeigen sich hohe Frequenzen von CD27- IgD+

naiven B-Zellen und niedrige Frequenzen von CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut von stammzelltransplantierten Patienten [68]. Auch bei Patienten mit einem B-Zell-Lymphom ist nach einer Behandlung mit dem gegen CD20 gerichteten, monoklonalen Antikörper Rituximab unmittelbar nach der B-Zell-Depletion ein starker Anstieg der CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen beobachtet worden [48].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes ontogenetischen Veränderungen unterliegt. Dies betrifft vor allem die CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen, die CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen, die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, die CD27⁺ IgD⁺ nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen sowie die CD27⁻ IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen. Die Häufigkeit der Plasmablasten und CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen unterliegt nur geringen altersabhängigen Veränderungen.

4.3 Welche Störungen der B-Zell-Homöostase finden sich bei Immundefekten und Autoimmunkrankheiten?

Neben einer gestörten B-Zell-Homöostase bei Autoimmunkrankheiten scheinen auch die Entwicklung und die Differenzierung der B-Zellen bei verschiedenen Immundefekten beeinträchtigt zu sein [55]. So sind charakteristische Muster einer gestörten B-Zell-Homöostase bei verschiedenen Immundefekten und Autoimmunerkrankungen nachgewiesen worden. Die dabei betroffenen B-Zell-Subpopulationen sind eben solche, die nachweislich ontogenetischen Veränderungen unterliegen. Bei der Beurteilung einer gestörten B-Zell-Homöostase müssen daher altersbezogene Referenzwerte herangezogen werden. Im Folgenden sollen charakteristische Verteilungsmuster verschiedener B-Zell-Subpopulationen bei einzelnen immunologischen Erkrankungen diskutiert werden.

Als Beispiel für eine gestörte B-Zell-Differenzierung eignet sich das variable Immundefektsyndrom (CVID). Dieser Immundefekt zeichnet sich durch eine Panhypogammaglobulinämie und eine gestörte Immunantwort auf Vakzinierung aus [50]. Bei einigen CVID-Patienten stellt vermutlich eine verminderte Anzahl von Gedächtnis-B-Zellen ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf dar [65].

Diese Gedächtnis-B-Zellen scheinen auch ein prognostischer Marker für den Verlauf der Hypogammaglobulinämie im Säuglingsalter zu sein [69]. Es wird vermutet, dass sich durch die Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen die klinische Prognose bei der CVID genauer abschätzen ließe als durch die Konzentration der Immunglobuline im Serum [70]. Auch erhöhte Frequenzen von CD21^{low} B-Zellen und Transitionalzellen sind beim variablen Immundefektsyndrom beschrieben worden [41,54].

Bei Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise dem Systemischen Lupus Erythematoses aber auch bei anderen systemischen Autoimmunerkrankungen scheint die Expansion der Plasmablasten ein charakteristisches Bild darzustellen [62]. Die (erhöhte) Frequenz der Plasmablasten im Blut von Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses scheint mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren [64]. Transitionalzellen scheinen bei SLE-Patienten ebenso mit einer erhöhten Frequenz aufzutreten [62]. Die Höhe der Frequenz der Transitionalzellen scheint jedoch nicht mit der Krankheitsaktivität oder anderen krankheitsassoziierten Faktoren in Verbindung zu stehen [9,63]. Außerdem scheinen aktivierte CD27 negative Gedächtnis-B-Zellen vermehrt bei systemischen Autoimmunprozessen und chronischen Infektionskrankheiten wie HIV und Malaria vorzukommen [36,37,71].

Infolgedessen betreffen die Veränderungen der B-Zell-Homöostase bei Autoimmunerkrankungen und Immundefekten diejenigen B-Zell-Subpopulationen, die auch ontogenetischen Veränderungen unterworfen sind. Diese Beobachtungen betreffend scheint die Etablierung altersabhängiger Referenzwerte für verschiedene B-Zell-Subpopulationen von großer Bedeutung.

4.4 Sind die Referenzwerte zur Klassifikation der CVID im Kindesalter anwendbar?

Während der Entstehung dieser Arbeit sind von drei unabhängigen Gruppen altersabhängige Frequenzen peripherer B-Zell-Subpopulationen von Kindern ≤ 18 Jahre publiziert worden [66,72,73]. In dieser Arbeit sind zusätzlich zu den Referenzwerten verschiedener B-Zell-Subpopulationen für Kinder auch solche für Erwachsene bis zu einem Alter von 50 Jahren generiert worden. Vergleichend mit den bereits veröffentlichten Arbeiten bestätigen sich die Ergebnisse und damit auch die

Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Methode [66,72,73]. Wie bei Smet et al (2010) werden in dieser Arbeit zusätzlich altersabhängige Referenzwerte für CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen sowie für CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen repräsentiert [73]. Beide B-Zell-Subpopulationen sind, ebenso wie die CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen, in die neueste CVID-Klassifikation (EuroClass-Klassifikation) aufgenommen worden (siehe Abbildung 4) [41]. Die dort beschriebenen Ober- und Untergrenzen für bestimmte B-Zell-Populationen entstammen allerdings vor allem der Analyse erwachsener Individuen.

Laut der European Association for Immunodeficiencies (ESID) kann die Diagnose einer CVID bei einem signifikanten Immunglobulinmangel, einer abgeschwächten Impfantwort sowie bei Krankheitsbeginn nach dem zweiten Lebensjahr nach Ausschluss anderer Ursachen gestellt werden [50]. In dieser Arbeit soll folglich überprüft werden, ob die Grenzwerte für die in der EuroClass-Klassifikation aufgeführten B-Zell-Subpopulationen (CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen, CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen) insbesondere für Kinder älter als zwei Jahre geeignet erscheinen [41].

Entsprechend der erstellten Referenzwerte (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4) scheint es offensichtlich, dass Frequenzen von $\geq 2\%$ der CD27⁺ IgD⁻ klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (wie in der EuroClass-Klassifikation beschrieben) nicht für Kinder unter drei Jahren angewandt werden können. In der Arbeit von Smet et al (2010) wurde diese Altersgrenze auf ein Alter größer als ein Jahr ermittelt [73]. Die Obergrenze der CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen von 10% (wie bei EuroClass angegeben) scheint auch im Kindesalter anwendbar zu sein, da sich niedrigere Frequenzen altersunabhängig nachweisen lassen [41,73]. Die Obergrenze von 9% für die CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ Transitionalzellen (wie bei EuroClass vorgeschlagen) sind hingegen erst bei Erwachsenen ab einem Alter von 18 Jahren anwendbar, da sich gerade im Kleinkindesalter eine scheinbar physiologische Expansion der Transitionalzellen beobachten lässt (siehe Tabelle 3) [41].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die von der EuroClass vorgeschlagenen Referenzwerte der B-Zell-Subpopulationen nicht zwangsläufig auf das Kindesalter

übertragbar sind. Wie bereits erwähnt, unterliegen die CD27+ IgD-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen und die CD24++ CD38++ Transitionalzellen altersabhängigen Veränderungen. Die Grenzwerte der CD27+ IgD-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen scheinen ab einem Alter von drei Jahren wahrscheinlich anwendbar zu sein. Die CD24++ CD38++ Transitionalzellen zeigen hingegen im Kindesalter physiologisch Frequenzen über der vorgeschlagenen oberen Grenze, sodass die von der EuroClass-Klassifikation vorgegebenen Werte erst ab einem Alter von 18 Jahren genutzt werden können. Zusätzlich zu der Diskussion um die formelle Anwendbarkeit dieser Grenzwerte muss bedacht werden, dass die CVID im Kindesalter möglicherweise pathophysiologische und auch ätiologische Unterschiede zu der des Erwachsenenalters zeigt. Die auf der Beschreibung einer CVID-Kohorte mit überwiegend erwachsenen Patienten beruhende EuroClass-Klassifikation könnte somit *per se* nicht auf das Kindealter übertragbar sein.

Yong et al (2010) beschreiben bei der CVID im Kindesalter eine Subgruppe von Patienten mit einer verminderten Anzahl von CD27+ IgD-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (< 5 Zellen pro µl Blut). Die Reduktion dieser Gedächtnis-B-Zellen scheint mit einem erhöhtem Risiko für Autoimmunität und schweren Infektionen einherzugehen [65]. Da die Anzahl der CD27+ IgD-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen bei gesunden Individuen diesen Grenzwert normalerweise bereits nach dem ersten Lebensjahr übersteigt (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4), scheint der vorgeschlagene Grenzwert geeignet, auch im Kindesalter eine beeinträchtigte B-Zell-Differenzierung von einer normalen zu unterscheiden.

4.5 Gibt es Unterschiede in der Immunfluoreszenzfärbung von PBMC und Vollblut?

Die in dieser Arbeit erstellten Daten basieren auf einer durchflusszytometrischen Analyse von mittels Dichtegradientenzentrifugation separierten PBMC. Es wird gezeigt, dass das Anfärben im Vollblut vergleichbare Ergebnisse liefert und daher praktikabler für Routineanalysen eingesetzt werden kann (siehe Abbildung 9). Außerdem wird demonstriert, dass die Anwendung des Oberflächenmarkers CD45 bei der Abgrenzung der Lymphozyten von anderen Leukozyten nicht unbedingt notwendig erscheint. CD45

kann allerdings hilfreich zur Definition von Lymphozyten sein, wenn die Erythrozytenlyse oder die Separation von PBMC nur unvollständig durchgeführt werden konnte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass weitere Bemühungen unternommen werden sollten, um quantitative Veränderungen der peripheren B-Zell-Subpopulationen als Hinweise für Krankheitsprognosen von Autoimmunkrankheiten und Immundefekten mit Beginn im Kindesalter eindeutiger erkennen und bestätigen zu können. Obwohl die unterschiedlichen Arbeitsgruppen ähnliche Ergebnisse liefern und so für eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode der durchflusszytometrischen Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen sprechen, sollte eine weitere Standardisierung bei der Durchflusszytometrie und vor allem bei der Analyse der Zellen angestrebt werden [66,72,73].

5 Zusammenfassung

B-Lymphozyten sind die zellulären Träger der humoralen Immunität des adaptiven Immunsystems. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei Immundefekten und Autoimmunprozessen.

In den letzten Jahren wurde bereits über verschiedene sich abhängig vom Lebensalter entwickelnde B-Zell-Subpopulationen berichtet. Jedoch wurden altersbezogene Referenzwerte dieser B-Zellen, insbesondere für das Kindes- und Jugendalter, kaum beschrieben. In dieser Arbeit sollten daher Entwicklungsveränderungen der peripheren B-Zell-Subpopulationen von der Kindheit bis zum Erwachsenenalter charakterisiert und altersabhängige Referenzwerte generiert werden. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurden dafür sowohl relative als auch absolute Häufigkeiten für naive B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen, Transitionalzellen, Plasmablasten und CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen vom Neugeborenen bis zu einem Alter von 50 Jahren untersucht und eine Normwerttabelle erstellt.

Die meisten B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes zeigen spezifische ontogenetische Veränderungen. So nimmt die Frequenz der CD19⁺ B-Zellen mit dem Alter ab. Während die periphere B-Zell-Population im Kindesalter vor allem von Transitionalzellen und naiven Zellen dominiert wird, steigt mit zunehmendem Alter die Fraktion der Gedächtnis-B-Zellen graduell an. CD21^{low} CD38^{low} B-Zellen und Plasmablasten weisen keine wesentlichen altersbezogenen Veränderungen der Häufigkeit auf.

Ein Vergleich zwischen der Immunfluoreszenzfärbung von mittels Dichtegradientenzentrifugation separierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Vollblutes erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Die Färbung im Vollblut mit anschließender Erythrozytenlyse ist daher als praktikablere Methode zur Analyse der B-Zell-Subpopulationen zu empfehlen.

Die in dieser Arbeit erbrachten Referenzwerte der B-Zell-Subpopulationen ermöglichen eine bessere Interpretation von B-Zell-Entwicklungs- und Verteilungsstörungen.

6 Abkürzungen

ABCB1	ABC-Transporter, ATP-Bindendes Transmembranprotein der Gruppe B (CD243)
APC	Allophycocyanin
BAFF-R	B Cell Activating Factor- Rezeptor
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bm 1-5	Mature B-Cells
BSA	Bovine Serum Albumine
btk	Brutons Tyrosin Kinase
C3d-R	Komplementrezeptor 3d (CD21)
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
C-Region	Konstante Region
CR2	Komplementrezeptor 2 (CD21)
CVID	Common Variable Immunodeficiency
CXCR	Chemokinrezeptor
D-Region	Diversity Region
ESID	European Society for Immunodeficiencies
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
GAM	Generalisiertes Additives Modell
H-Kette	Schwere Kette (heavy)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J-Region	Joining Region
L-Kette	Leichte Kette (light)
m	Männlich

M	Mol
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MZ-B	Marginalzonen-B-Zelle
NaCl	Natriumchlorid
PALS	Periarteriolar Lymphoid Sheath
PAMP	Pathogen Assoziierte Molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Side Scatter
T1/2	Transitionalzelle 1/2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit
V-Region	Variable Region
w	Weiblich
XLA	X-Linked Agammaglobulinemia M. Bruton

7 Literatur

- 1 Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216 (2002).
- 2 Janeway CA. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(13), 7461–7468 (2001).
- 3 Schütt, Christine, Bröker, Barbara. Grundwissen Immunologie Spektrum, Heidelberg (2009).
- 4 Pezzutto, Antonio, Ulrichs, Timo, Burmester, Gerd-Rüdiger. Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik Thieme, Stuttgart (2007).
- 5 LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 112(5), 1570–1580 (2008).
- 6 Murphy, Kenneth P, Travers, Paul, Walport, Mark. Janeway Immunologie Spektrum Akad. Verl, Heidelberg (2009).
- 7 Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom.* 74(5), 261–271 (2008).
- 8 Rolink AG, Andersson J, Melchers F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J. Immunol.* 28(11), 3738–3748 (1998).
- 9 Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 105(11), 4390–4398 (2005).
- 10 Palanichamy A, Barnard J, Zheng B *et al.* Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol.* 182(10), 5982–5993 (2009).
- 11 Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J. Immunol.* 182(7), 4116–4126 (2009).
- 12 Weller S, Braun MC, Tan BK *et al.* Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 104(12), 3647–3654 (2004).

- 13 Lederman S, Yellin MJ, Cleary AM *et al.* T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J. Immunol.* 152(5), 2163–2171 (1994).
- 14 Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell.* 67(6), 1121–1129 (1991).
- 15 Jacob J, Przylepa J, Miller C, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 178(4), 1293–1307 (1993).
- 16 MacLennan IC. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139 (1994).
- 17 Cassese G, Arce S, Hauser AE *et al.* Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol.* 171(4), 1684–1690 (2003).
- 18 Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin. Immunol.* 20(1), 49–58 (2008).
- 19 Luttmann, Werner. *Der Experimentator Immunologie Spektrum Akad. Verl, Heidelberg* (2009).
- 20 Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today.* 21(5), 204–206 (2000).
- 21 Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188(9), 1679–1689 (1998).
- 22 Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.* 20(1), 67–82 (2008).
- 23 Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, Vries JE de. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188(9), 1691–1703 (1998).

- 24 Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur. J. Immunol.* 35(12), 3433–3441 (2005).
- 25 Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I *et al.* Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Immunol.* 127(1), 14–25 (2008).
- 26 Loder F, Mutschler B, Ray RJ *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190(1), 75–89 (1999).
- 27 Schiemann B, Gommerman JL, Vora K *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science.* 293(5537), 2111–2114 (2001).
- 28 Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, Rolink AG. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLoS ONE.* 4(5), e5456 (2009).
- 29 Su TT, Rawlings DJ. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol.* 168(5), 2101–2110 (2002).
- 30 Petro JB, Gerstein RM, Lowe J, Carter RS, Shinnars N, Khan WN. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 277(50), 48009–48019 (2002).
- 31 Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B *et al.* Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood.* 115(3), 519–529 (2010).
- 32 Shi Y, Agematsu K, Ochs HD, Sugane K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin. Immunol.* 108(2), 128–137 (2003).
- 33 Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J. Immunol.* 179(1), 13–19 (2007).

- 34 Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C *et al.* Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 205(6), 1331–1342 (2008).
- 35 Ehrhardt GRA, Hsu JT, Gartland L *et al.* Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J. Exp. Med.* 202(6), 783–791 (2005).
- 36 Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG⁺ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol.* 177(6), 3728–3736 (2006).
- 37 Moir S, Ho J, Malaspina A *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* 205(8), 1797–1805 (2008).
- 38 Andrews SF, Wilson PC. The anergic B cell. *Blood.* 115(24), 4976–4978 (2010).
- 39 Isnardi I, Ng Y, Menard L *et al.* Complement receptor 2/CD21⁻ human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood.* 115(24), 5026–5036 (2010).
- 40 Wehr C, Eibel H, Masilamani M *et al.* A new CD21^{low} B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin. Immunol.* 113(2), 161–171 (2004).
- 41 Wehr C, Kivioja T, Schmitt C *et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 111(1), 77–85 (2008).
- 42 Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S *et al.* Circulating CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(32), 13451–13456 (2009).
- 43 Odendahl M, Mei H, Hoyer BF *et al.* Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood.* 105(4), 1614–1621 (2005).
- 44 Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J. Immunol.* 174(7), 4034–4042 (2005).

- 45 Pascual V, Liu YJ, Magalski A, Bouteiller O de, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J. Exp. Med.* 180(1), 329–339 (1994).
- 46 Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 167(7), 3610–3618 (2001).
- 47 Harrison, Tinsley R, Fauci, Anthony S, Dietel, Manfred. *Harrisons Innere Medizin* McGraw-Hill [u.a.], Berlin.
- 48 Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B *et al.* B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin. Immunol.* 122(2), 139–145 (2007).
- 49 Sneller MC, Strober W, Eisenstein E, Jaffe JS, Cunningham-Rundles C. NIH conference. New insights into common variable immunodeficiency. *Ann. Intern. Med.* 118(9), 720–730 (1993).
- 50 ESID - European Society for Immunodeficiencies. ESID - European Society for Immunodeficiencies. <http://www.esid.org/>.
- 51 Warnatz K, Denz A, Dräger R *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 99(5), 1544–1551 (2002).
- 52 Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L *et al.* Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J. Clin. Immunol.* 23(5), 385–400 (2003).
- 53 Sánchez-Ramón S, Radigan L, Yu JE, Bard S, Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. *Clin. Immunol.* 128(3), 314–321 (2008).

- 54 Warnatz K, Wehr C, Dräger R *et al.* Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology.* 206(5), 502–513 (2002).
- 55 Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM *et al.* Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 199–227 (2009).
- 56 Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ *et al.* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell.* 72(2), 279–290 (1993).
- 57 Vetrie D. Isolation of the defective gene in X linked agammaglobulinaemia. *J. Med. Genet.* 30(6), 452–453 (1993).
- 58 Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *J. Pediatr.* 141(4), 566–571 (2002).
- 59 Howard MW, Strauss RG, Johnston RB. Infections in patients with neutropenia. *Am. J. Dis. Child.* 131(7), 788–790 (1977).
- 60 Dörner T, Odendahl M, Radbruch A. Zytometrische Analysen bei systemischen Autoimmunerkrankungen. *Z Rheumatol.* 61(4), 389–395 (2002).
- 61 Wei C, Anolik J, Cappione A *et al.* A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 178(10), 6624–6633 (2007).
- 62 Odendahl M, Jacobi A, Hansen A *et al.* Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 165(10), 5970–5979 (2000).
- 63 Jacobi AM, Reiter K, Mackay M *et al.* Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 58(6), 1762–1773 (2008).
- 64 Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K *et al.* Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48(5), 1332–1342 (2003).

- 65 Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol.* 21(5), 852–858 (2010).
- 66 Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin. Immunol.* 131(1), 50–59 (2009).
- 67 Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H *et al.* Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J. Exp. Med.* 197(7), 939–945 (2003).
- 68 Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C *et al.* B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp. Hematol.* 33(4), 480–486 (2005).
- 69 Moschese V, Graziani S, Avanzini MA *et al.* A prospective study on children with initial diagnosis of transient hypogammaglobulinemia of infancy: results from the Italian Primary Immunodeficiency Network. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 21(2), 343–352.
- 70 Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 120(3), 310–318 (2006).
- 71 Weiss GE, Crompton PD, Li S *et al.* Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J. Immunol.* 183(3), 2176–2182 (2009).
- 72 van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE *et al.* Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin. Immunol.* 133(1), 95–107 (2009).
- 73 Smet J, Mascart F, Schandené L. Are the reference values of B cell subpopulations used in adults for classification of common variable immunodeficiencies appropriate for children? *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* (2011).

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper.....	18
Tabelle 2: Färbeansätze.....	18
Tabelle 3: Relative Häufigkeit der B-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Altersgruppen.....	29
Tabelle 4: Absolutwerte der B-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Altersgruppen	30
Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung (nach [7])	3
Abbildung 2: B-Zell-Aktivierung [6]	4
Abbildung 3: Das optische System [19]	7
Abbildung 4: Die EuroClass-Klassifikation der CVID (modifiziert nach [41]).....	13
Abbildung 5: Gewinnung der PBMC mit Ficoll-Hypaque [6]	17
Abbildung 6: Auswertungs-Strategien zur Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen.....	20
Abbildung 7: Relative Häufigkeit der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen über das Alter	25
Abbildung 8: Absolutwerte der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen über das Alter	27
Abbildung 9: Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung von PBMC und Vollblut	32

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. J. Girschick für die Bereitstellung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

In besonderer Weise möchte ich Herrn Dr. med. H. Morbach für seine ausdauernde Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken. Seine Freude an der Kinderheilkunde und an der Wissenschaft sowie seine unermüdliche Ruhe bei der Beantwortung all meiner Fragen motivierten mich nicht nur beim Verfassen dieser Arbeit, sondern auch nachhaltig für mein weiteres Leben.

Herrn Prof. Dr. med. A. Rosenwald danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Dem Direktor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, Herrn Prof. Dr. med. Ch. P. Speer, danke ich für das Überlassen der Räumlichkeiten seines Hauses zur Durchführung der Experimente.

Ich bedanke mich bei allen Patienten der Universitätsklinik zur Bereitstellung der Proben.

Mein besonderer Dank gilt auch den technischen Assistentinnen und Mitarbeitern des Rheumatologischen Labors für die stetige Hilfe und die aufmunternden Worte während der Laborarbeit.

Ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Lutz und Maria, meinen Geschwistern Katharina und Benedikt sowie meinem Steffen, für die stete Unterstützung in meinem Leben.

