

Aus der  
Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Speer

---

**Charakterisierung von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-  
Variante hinsichtlich B-Zell Differenzierung, Immunglobulin-  
Repertoire Entwicklung und Entstehung eines  
Antikörpermangels**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Luisa Paul  
aus Fritzlar

Würzburg, Februar 2019



Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Henner Morbach

Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Hofmann

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2019

Die Promovendin ist Ärztin.

gewidmet meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Primäre Immundefekte mit vorwiegendem Antikörpermangel und ihre klinische Manifestation</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. B-Zell Entwicklung</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. Expression, Struktur und Funktion von IgD .....	8
1.2.2. Immundefekte der frühen B-Zell Entwicklung .....	11
1.2.3. Immundefekte der späten B-Zell Entwicklung.....	12
<b>1.3. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Herkunft der Proben</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.2.1. Isolation mononukleärer Zellen.....	17
2.2.2. Durchflusszytometrie .....	17
<b>2.2.2.1. Antikörper</b> .....	<b>18</b>
2.2.3. Immunglobulin-Repertoire Analyse aus Einzelzellen.....	19
<b>2.2.3.1. Reverse Transkription und PCR</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.3.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten und Aufreinigung des PCR-Produkts</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.3.3. Sanger-Sequenzierung</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.3.4. Auswertung der Sequenzierungsergebnisse</b> .....	<b>22</b>
2.2.4. Statistische Auswertung .....	22
<b>2.3. Materialien</b> .....	<b>23</b>
2.3.1. Labormaterialien.....	23
2.3.2. Reagenzien .....	24
2.3.3. Medien und Puffer .....	25
2.3.4. Primer .....	25
2.3.5. Geräte .....	26
2.3.6. Software .....	27

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Beschreibung der Indexpatientin</b> .....	<b>28</b>
3.1.1. Genetische Untersuchung der Indexpatientin sowie weiterer Familienmitglieder.....	29
3.1.2. Die Bedeutung der p.Pro6Leu <i>IGHD</i> -Variante für die Entstehung des Antikörpermangelsyndroms .....	30
<b>3.2. Analyse der B-Zell Differenzierung</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3. Immunglobulin-Repertoire Analyse</b> .....	<b>36</b>
3.3.1. CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup> transitionale B-Zellen .....	38
3.3.2. CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD10 <sup>-</sup> reife, naive B-Zellen .....	46
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1. Bedeutung der <i>IGHD</i>-Variante für die Erkrankung der Indexpatientin</b> .....	<b>56</b>
4.1.2. Wertung der Daten / kritische Reflexion .....	60
<b>4.2. Rolle von IgD auf naiven B-Zellen für die Immunglobulin-Repertoire Entwicklung</b> .....	<b>62</b>
4.2.1. Wertung der Daten / kritische Reflexion .....	64
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>10. Anhang</b> .....	<b>1</b>
10.1. Sequenzen II.3. ....	1
10.2. Sequenzen III.3. ....	7
<b>11. Danksagung</b> .....	
<b>12. Lebenslauf</b> .....	

## 1. Einleitung

### 1.1. Primäre Immundefekte mit vorwiegendem Antikörpermangel und ihre klinische Manifestation

Primäre Immundefekte mit vorwiegendem Antikörpermangel sind durch eine Verminderung der Serumimmunglobulin-Konzentration sowie fehlende oder abgeschwächte Impfantworten charakterisiert (1).

Je nach Schweregrad des Antikörpermangels können diese weiter in Hypogammaglobulinämien und Agammaglobulinämien unterteilt werden. Bei einem Teil der Patienten konnten ursächlich Mutationen in Genen beschrieben werden, welche für die B-Zell Entwicklung und Funktion eine wichtige Rolle spielen (2).

Antikörpermangelerkrankungen sind mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität assoziiert. Als häufige Infektionssymptome treten bakterielle Infektionen der Atemwege auf (z.B. Bronchitis, Pneumonie, Sinusitis, Otitis) (3).

Patienten mit Agammaglobulinämien können zudem an Meningoenzephalitiden durch Enteroviren erkranken (4). Zusätzlich können gastrointestinale Infektionen auftreten (z.B. Giardia lamblia) (5). Neben den Infektionen kommt es bei einigen Patienten auch zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen (z.B. Autoimmunzytopenie, chronisch entzündliche Darmerkrankung) (3;6).

Die Behandlung der Patienten erfolgt mit einer Substitution der fehlenden Immunglobuline und teils auch mit antibiotischer Prophylaxe, welche die Lebenserwartung erhöhen und die Häufigkeit und den Schweregrad von Infektionen erniedrigen (3).

Die Antikörpermangelerkrankungen werden in Erkrankungen der frühen B-Zell Entwicklung (Agammaglobulinämien) und der späten B-Zell Entwicklung (Hypogammaglobulinämie) unterteilt (2;7).

## 1.2. B-Zell Entwicklung

B-Zellen sind eine Subgruppe der Lymphozyten, welche zusammen mit den T-Zellen das adaptive Immunsystem bilden. Sie exprimieren als antigen-erkennenden Rezeptor den B-Zell-Rezeptor (BZR), welcher ein membranständiges Immunglobulin darstellt. Immunglobuline können entweder membranständig als BZR oder als von Plasmazellen sezernierte Antikörper vorkommen (8).

Die B-Zelle durchläuft bis zu ihrer vollständigen Ausreifung spezifische Entwicklungsstufen. Die Entwicklung der frühen B-Zelle findet beim Menschen bzw. beim Säugetier im Knochenmark und in der fetalen Leber statt. Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der B-Zelle ist die Generierung eines funktionsfähigen BZR. Der BZR spielt demnach eine entscheidende Rolle für die Entwicklung, Aktivierung, dem Überleben und der Apoptose von B-Zellen (8;9).

### **Struktureller Aufbau von Immunglobulinen**

Immunglobuline bestehen aus je zwei schweren und zwei leichten Ketten; letztere liegen entweder als Kappa- oder als Lambdaleichtkette vor (10).

Sowohl die schwere als auch die leichte Kette beinhalten N-terminale variable Regionen (V), welche wichtig für die Antigenerkennung sind und C-terminale konstante (C) Regionen, die vor allem eine Mediatorfunktion für die Vermittlung protektiver oder Effektorfunktionen von Antikörpern besitzen (11). In der schweren Kette wird die V-Region aus einer Ig Domäne und die C-Region aus drei (in IgG, IgA, IgD) bis vier (in IgM und IgE) Ig Domänen gebildet ( $V_H/C_{H1}/C_{H2}/C_{H3}$  und ggf.  $C_{H4}$ ). Die variable und konstante Region der leichten Kette besteht hingegen nur aus je einer Ig Domäne ( $V_L/C_L$ ) (10;12).

Zusätzlich finden sich in der V-Region der schweren und leichten Kette jeweils drei Abschnitte, welche sich vor allem durch ihre hohe Variabilität der Aminosäuresequenzen gegenüber anderen Immunglobulinen unterscheiden (=hypervariable Regionen). Die hypervariablen Regionen bestehen aus ungefähr 10 Aminosäuren und werden von sogenannten *framework* Regionen

begrenzt. In einem Immunglobulin werden jeweils die hypervariablen Regionen einer  $V_L$ -Domäne mit einer  $V_H$ -Domäne zusammengeführt. Diese Region bezeichnet man als *complementary-determining region* (CDR) Region. Unterschieden werden CDR1-, CDR2- und CDR3-Regionen, wobei letztere durch die höchste Variabilität charakterisiert sind (10;12;13).

Die Flexibilität eines Immunglobulins wird durch die sogenannte Scharnierregion (hinge region) zwischen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  definiert (10).

### **VDJ-Segmente**

Die Gene, welche den variablen Teil des Immunglobulins kodieren, entstehen durch ein somatisches Rearrangement unterschiedlicher Gensegmente (10). Der Locus der schweren Kette des Immunglobulins befindet sich auf Chromosom 14, der leichten Kette  $Igk$  auf Chromosom 2 und von  $Ig\lambda$  auf Chromosom 22 (14). Man unterscheidet V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Segmente (15).

Im Locus der schweren Kette sind in telomerer Richtung die V-Segmente und in zentromerer Richtung die J-Segmente lokalisiert. Zwischen den Gruppen der V- und J-Segmente befindet sich nur in der schweren Kette zusätzlich die Gruppe der D-Segmente. Am Zentromer des J-Segments sind die Gene für die konstanten Regionen (C-regions) des Immunglobulins lokalisiert (16).

### **V(D)J-Rekombination und molekulare Generierung der Antikörpervielfalt**

Durch die V(D)J-Rekombination wird ein vollständiges Gen für die variable Region des B-Zell Rezeptors gebildet, zudem führt das zufällige Rearrangement von jeweils einem V-, D- (*nur in der schweren Kette*) und J-Segment während der Pro-B- und Prä-B-Zell Reifung zu einer hohen Variabilität der V-Region der Immunglobuline (8;16).

Zunächst wird das Chromatin in spezifischen Regionen des Chromosoms geöffnet und sogenannte „Rekombinations-Enzyme“ können an den unterschiedlichen Gensegmenten binden. Die Enzyme erkennen bestimmte DNA-Sequenzen (*recombination signal sequences* =RSS). Diese sind am 3'-Ende

des V-Gensegments und am 5'-Ende des J-Gensegments lokalisiert und umgeben das D-Segment von beiden Seiten (16).

Die RSS-Sequenz besteht aus sieben Nukleotiden (meistens CACAGTG). In benachbarter Umgebung befindet sich zusätzlich die kodierende Sequenz, ein sogenannter Spacer (12 oder 23 Nukleotide) und ein Nonamer (9 Nukleotide). Zusätzlich werden Gensegmente, welche rekombiniert werden sollen, mit Histonen stabilisiert. Die Rekombinations-Aktivierungs-Gene (RAG1 und RAG2) bilden als Komplex die VDJ-Rekombinase (16;17).

Während der VDJ-Rekombination kommt es durch Schlaufenbildung zu einer örtlichen Zusammenlagerung der kodierenden V-, D- und J-Segmente, wobei zunächst die DJ-Segmente rekombiniert werden und anschließend die V-Segmente. Durch Doppelstrangbrüche an der RSS-Sequenz der Schlaufe werden die VDJ-Segmente zusammengeführt (16).

Für den Prozess der Rekombination wird jeweils ein Spacer mit 12 Basenpaaren (bp) mit einem Spacer mit 23 bp verbunden („12/23-Paar-Regel“). Hiermit wird sichergestellt, dass ein V-Gensegment mit einem D- bzw. J-Segment verbunden wird (16;17).

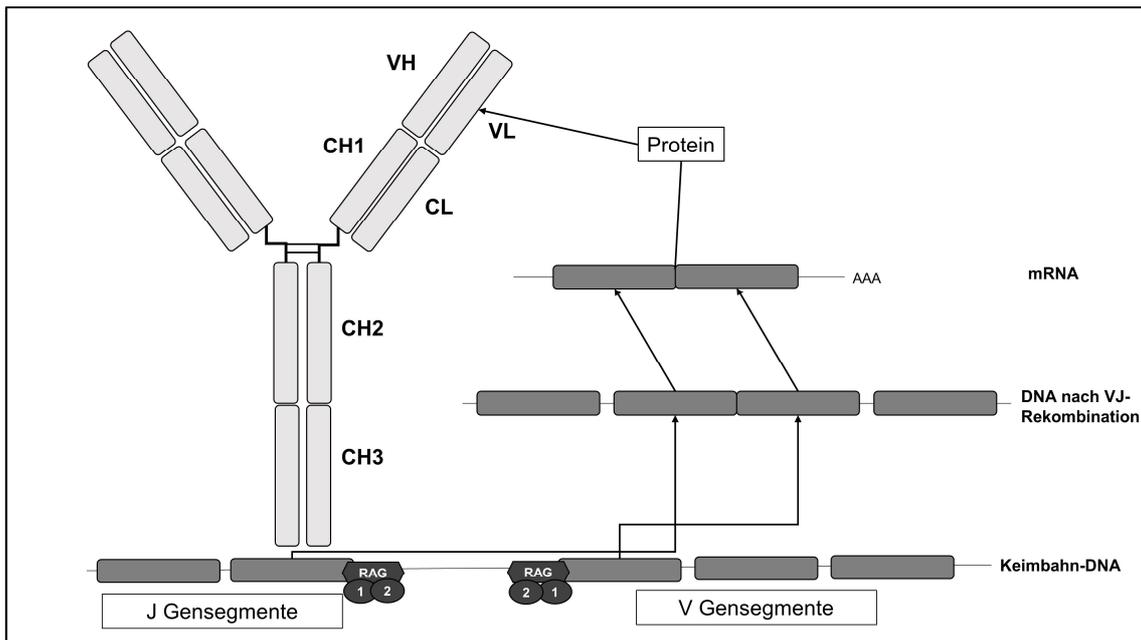
Am 5'- bzw. 3'-Ende des kodierenden Gensegments bildet sich eine Haarnadelschleife (hairpin loop) zwischen den DNA-Strängen aus. Die zwei unterschiedlich kodierenden Gensegmente mit Haarnadelschleife werden nun zusammengeführt und mit Hilfe von RAG1/2 stabilisiert (16).

Anschließend wird die Haarnadelschleife mit Hilfe von Artemis (=Endonuklease) geöffnet. Die Terminale-desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) kann zusätzlich Nukleotide an die defekten DNA-Enden hinzufügen. Es können nun die zwei kodierenden Genabschnitte mittels eines Reparaturprozesses und unterschiedlichen Enzymen (u.a. DNA-abhängige Proteinkinase, Reparaturenzyme) zusammengefügt werden. Die Ligation wird abschließend durch die DNA-Ligase IV und XRCC4 initiiert (16).

Bei der Transkription des DNA-Strangs wird die prä-mRNA gebildet. Durch anschließendes alternatives Splicing entsteht das VDJ-Exon, welches letztendlich mit der C-Region (C $\mu$  oder C $\delta$ ) fusioniert und zur schweren Kette des BZR translatiert wird (18).

Das Immunglobulin-Repertoire kann durch unterschiedliche Mechanismen eine große Vielfalt erreichen: zum einen die Kombinationsvielfalt durch die oben genannte Rekombination von VDJ-Segmenten und zum anderen durch die Kombination einer schweren mit zwei möglichen leichten Ketten (Kap-pa/Lambda) (16).

Ergänzend gibt es eine junktionale Diversität, welche charakterisiert ist durch Hinzufügen und Weglassen von Nukleotiden an der V(D)J-Schnittstelle. Dem kürzeren DNA-Strang werden Nukleotide durch TdT hinzugefügt, sodass dadurch eine weitere Vielfalt erreicht wird (16).



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Immunglobulins und die somatische Rekombination. Modifiziert nach (19)**

Dargestellt ist die VJ-Rekombination von einzelnen Gensegmenten am Beispiel der leichten Kette. Ein Antikörpermolekül besteht aus unterschiedlichen Regionen – die variablen Regionen mit der schweren und leichten Kette (V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>) sowie die konstanten Regionen der schweren Kette (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> und ggf. C<sub>H4</sub>) und die konstante Region der leichten Kette (C<sub>L</sub>) (10).

Wenn es zu einer erfolgreichen Rekombination der Gensegmente gekommen ist, kann die B-Zelle den nächsten Entwicklungsschritt einleiten (8). Wird während der Entwicklungsphasen ein autoreaktiver BZR exprimiert, erfolgt in den meisten Fällen die apoptotische Vernichtung (klonale Deletion) der B-Zelle und der Entwicklungsvorgang wird gestoppt (20).

Des Weiteren gibt es einen Toleranzmechanismus der autoreaktiven B-Zelle, welcher zu einem erneuten Rearrangement der leichten Kette führt, die dann mit der vorhandenen schweren Kette kombiniert wird – dadurch entsteht eine neue Spezifität (rezeptor editing) (21;22). Außerdem können autoreaktive B-Zellen in ein Anergie-Stadium versetzt werden, welches phänotypisch durch die verminderte Expression von IgM charakterisiert ist (23).

### **B-Zell Entwicklung**

Bei erwachsenen Menschen entwickeln sich B-Zellen im Knochenmark - ausgehend von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (8).

Die Stadien der frühen B-Zell Entwicklung sind durch Umlagerungsprozesse der Immunglobulin-Gensegmente definiert (8).

Zunächst sind die Immunglobulin-Gensegmente in der Vorläuferzelle der Pro-B-Zelle (Prä-Pro-B-Zelle) noch in der Keimbahnkonfiguration angeordnet.

Anschließend erfolgt während der Differenzierung zur Pro-B-Zelle die  $V_H$ ,  $D_H$  und  $J_H$  Umlagerung (VDJ-Rekombination) zunächst der schweren Kette. Zusätzlich können zwei verschiedene Stadien der Pro-B-Zell Entwicklung unterschieden werden. Im ersten Stadium erfolgt zunächst das Rearrangement der D- und J-Segmente der schweren Ketten. Das nächste Stadium ist charakterisiert durch das Zusammenfügen des V-Segments mit dem bereits neu angeordneten D-/J-Segment (8).

Frühe Pro-B-Zellen beginnen initial mit der gezielten Umlagerung der Gene für die schweren Ketten der Immunglobuline. Diese erfolgt zunächst beschränkt auf ein einziges Allel. Man bezeichnet diese Umlagerung als produktiv, wenn ein Rearrangement im funktionsfähigen Leserahmen (Rearrangement in frame)

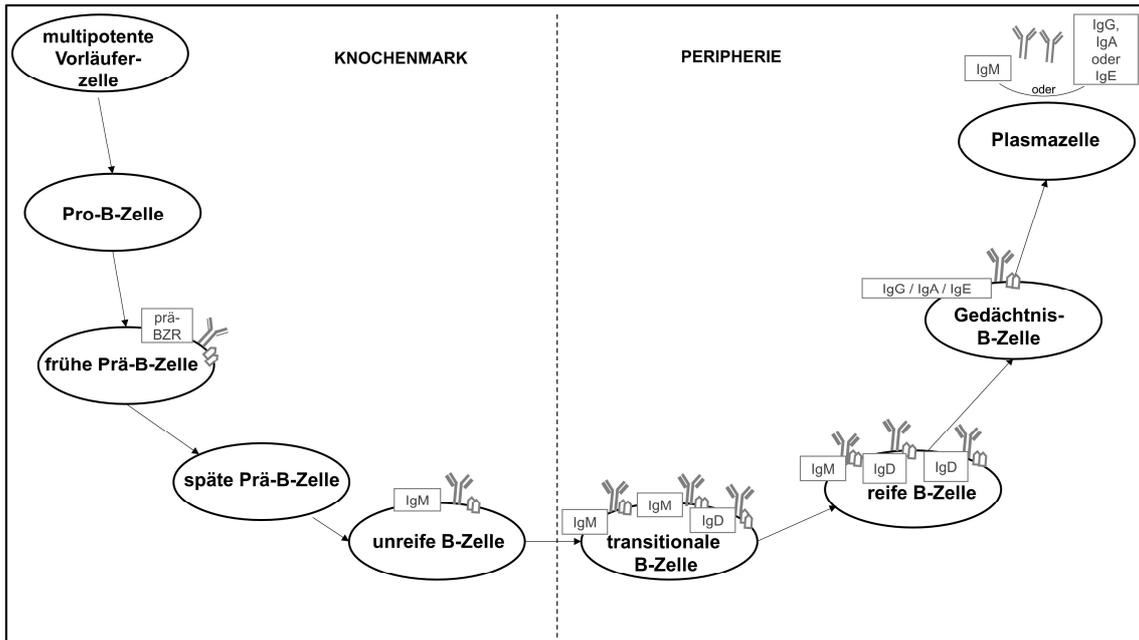
entstanden ist und somit ein funktionsfähiges Protein entsteht. Gleichzeitig wird die VDJ-Umlagerung des zweiten Allels verhindert (=Allelische Exklusion). Falls dieser Prozess erfolglos ist und eine nicht-produktive Rekombination entsteht, erfolgt die Umlagerung des zweiten Allels. Entsteht auch bei der zweiten Umlagerung keine funktionsfähige schwere Kette, sterben diese B-Zellen innerhalb kürzester Zeit mangels weiterer Differenzierungssignale ab (8;24).

Nach einer erfolgreichen Umlagerung der V(D)J-Segmente der schweren Kette entwickelt sich die B-Zelle zur Prä-B-Zelle und der Prä-B-Zell Rezeptor wird exprimiert. Prä-B-Zellen differenzieren sich weiter durch Teilungsprozesse (8).

Zu einem späteren Zeitpunkt des Prä-B-Zell Stadiums findet der Rekombinationsvorgang für die leichte Kette statt, wobei meist zunächst der  $\kappa$ -Locus rearrangiert wird. Das Rekombinationsprinzip entspricht dem der schweren Kette. Auch hier erfolgt die Rekombination erst auf einem Allel – falls diese erfolglos bleibt, wechselt der Prozess zum zweiten Allel. Falls die Rekombination beim zweiten Allel ebenfalls erfolglos bleibt, wird der  $\lambda$ -Lokus rekombiniert. Sobald ein funktionsfähiger BZR auf der B-Zell Oberfläche exprimiert wird, handelt es sich um ein erfolgreiches Rearrangement und die B-Zelle wird als unreife B-Zelle bezeichnet. Eine weitere V(D)J-Rekombination wird verhindert (8;25).

Wenn eine erfolgreiche Generierung einer schweren und leichten Immunglobulinkette fehlerfrei erfolgt ist, handelt es sich um eine unreife B-Zelle mit der charakteristischen Oberflächenexpression von IgM. Nach einigen Tagen wandern die unreifen B-Zellen vom Knochenmark als transitionale B-Zellen in das sekundäre lymphatische Gewebe (vornehmlich der Milz) ein (8).

Reife B-Zellen sind charakterisiert durch die zunehmende Herunterregulation von membranständigem IgM sowie die vermehrte Expression von IgD und re-zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe (8).



**Abbildung 2: Die unterschiedlichen Reifungsgrade der B-Zelle und ihre Antikörperpräsentation. Modifiziert nach (8).**

Dargestellt sind die unterschiedlichen Differenzierungsschritte der B-Zelle von der multipotenten Vorläuferzelle bis zur Plasmazelle sowie die Expression von membrangebundenen und sezernierten Immunglobulinen (8).

### 1.2.1. Expression, Struktur und Funktion von IgD

Immunglobuline lassen sich in fünf Isotypen unterteilen: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Sie können entweder membranständig als BZR oder sezerniert als Antikörper im Organismus vorliegen. IgD ist im Vergleich zu den anderen Isotypen im Serum unterrepräsentiert (10).

Während der B-Zell Reifung werden der IgM-BZR und IgD-BZR differenziell exprimiert (8).

Unreife B-Zellen exprimieren nur IgM auf der B-Zell Oberfläche im Knochenmark. Sobald die unreife B-Zelle zur reifen B-Zelle differenziert, wird zusätzlich IgD auf der B-Zell Oberfläche in der Peripherie exprimiert (8). Die Koexpression von IgM und IgD entsteht durch alternatives Spleißen der C $\mu$ - und C $\delta$ -kodierenden Exone (18;26).

Charakterisiert sind die unterschiedlichen B-Zell Stadien mit einer zunächst vermehrten Expression von IgM-BZR und vermindertem IgD-BZR (transitionale B-Zelle) und anschließend die Differenzierung zur reifen B-Zelle mit vermehrter Expression von IgD-BZR und vermindertem IgM-BZR (8).

Zusätzlich gibt es wenige B-Zellen, welche nur IgD-BZR exprimieren (IgM-IgD<sup>+</sup> B-Zellen). Bedingt ist dieser Mechanismus durch einen Immunglobulin-Klassenwechsel auf genomischer Ebene (switch) (27).

Mit Hilfe unterschiedlicher Modelle wurde die Bedeutung von IgD auf B-Zellen hinsichtlich der B-Zell Entwicklung, Aktivierung, Differenzierung und Antikörperproduktion analysiert:

IgD<sup>-</sup> B-Zellen von IgD-knock-out Mäusen zeigten eine reguläre B-Zell Differenzierung, jedoch ein numerisch reduziertes B-Zell Kompartiment in der Peripherie (28). Interessanterweise gab es keine quantitativen Einschränkungen in einer antigenspezifischen Antikörperproduktion (sowohl gegenüber thymusabhängigen als auch -unabhängigen Antigenen). Die Serumkonzentrationen aller Immunglobuline lagen grenzwertig im Normbereich, woraus man schließen könne, dass der IgD-BZR nicht essentiell für den Immunglobulin-Klassenwechsel und die Immunglobulin-Produktion ist (28).

Es zeigte sich jedoch bei IgD-knock-out Mäusen eine Verzögerung der Affinitätsreifung in der primären Immunantwort mit der Folge einer verzögerten Produktion hochaffiner Antikörper. IgD-knockout-Mäuse können hierdurch ggf. einen Nachteil in der Pathogenbekämpfung haben. Demnach habe IgD möglicherweise eine „Hilfsfunktion“ in der spezifischen Immunantwort (29).

Bei Mäusen, in denen das für den konstanten Teil von IgM kodierende Exon deletiert war, das für den konstanten Teil von IgD kodierende Exon jedoch zur Verfügung stand, kann IgD die Funktion von IgM übernehmen (30).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl IgM- als auch IgD-BZR in vitro in der Lage sind, B-Zellen zu aktivieren, deletieren oder in den Anergie-Status zu versetzen (31). Wenn in Zellkulturmodellen eine Aktivierung

von B-Zellen über den IgD-BZR erfolgt, zeigt sich im Vergleich zum IgM-BZR sowohl eine frühere als auch eine ausgeprägtere und protrahierte Phosphorylierung von BZR-Signalmolekülen (32).

Wenn eine reife, naive B-Zelle ein Autoantigen bindet, kann ein anergischer Funktionszustand induziert werden. Diese anergen B-Zellen scheinen phänotypisch durch eine erniedrigte Expression von IgM-BZR bei gleichbleibenden IgD-BZR charakterisiert zu sein (23). Untersuchungen aus transgenen/knock-out Mausmodellen legten die Vermutung nahe, dass die gleichzeitige Expression eines IgD-BZR zu einem Überlebensvorteil der kurzlebigen, anergen B-Zellen in der Milz führt (33).

Somit scheint die differentielle Expression von IgM und IgD auf B-Zellen möglicherweise eine Bedeutung für die Regulation von peripherer B-Zell-Toleranz zu haben. Interessanterweise scheinen B-Zellen im Menschen, welche durch einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgD gewechselt sind und kein IgM exprimieren, vermehrt autoreaktiv zu sein (27).

IgM und IgD besitzen zwei identische antigenbindende Regionen; dennoch scheinen sie je nach Struktur des gebundenen Antigens unterschiedliche Effekte in B-Zellen auszulösen (26). Der IgM-BZR kann möglicherweise sowohl nach Bindung von niedrigvalenten Antigenen als auch von polyvalenten Antigenen eine B-Zell-Aktivierung auslösen. Erklären lassen könnte sich dieses Phänomen, durch die vermutlich unterschiedliche Struktur der Scharnierregion im Winkelbereich des Immunglobulins. Die Scharnierregion von IgD ist sowohl flexibler als auch länger im Vergleich zur starren Scharnierregion von IgM (34;35).

Wahrscheinlich erklärt die rigide Scharnierregion von IgM eine sensitivere Aktivierungsfähigkeit bereits durch die Bindung monovalenter Antigene, währenddessen eine Aktivierung des IgD-BZR durch die flexible und längere Scharnierregion erschwert wird und die Bindung von polyvalenten Antigenen benötigt (35).

### 1.2.2. Immundefekte der frühen B-Zell Entwicklung

Immundefekte mit vorwiegendem Antikörpermangel können unterteilt werden in Defekte aufgrund einer fehlerhaften B-Zell Entwicklung, B-Zell Aktivierung und/oder Antikörpersynthese (7).

Die Agammaglobulinämien zeichnen sich durch deutlich reduzierte oder nicht nachweisbare Serumspiegel aller Immunglobulin-Isotypen und fehlende oder deutlich erniedrigte B-Zellen im Blut aus (3).

Die häufigste Form der Agammaglobulinämien ist die X-chromosomal rezessiv vererbte Agammaglobulinämie (XLA/Agammaglobulinämie vom Bruton-Typ) (36).

Die B-Zellen im Blut sind hierbei meist auf Werte unter 1% der Lymphozyten vermindert. Ursächlich ist eine Mutation in dem Gen, welches die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) kodiert. Durch das Fehlen einer funktionsfähigen BTK und der damit assoziierten defekten Signalübertragung im BZR unterbleibt die Ausreifung der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle und somit auch die weiteren Reifungsstufen der B-Zelle (2).

Eine weitere Gruppe der Agammaglobulinämien stellt die autosomal-rezessive Form dar. Sie kommt mit ca. 5% aller Agammaglobulinämien seltener vor als die o.g. XLA und manifestiert sich in früheren Lebensabschnitten (im Vergleich zur XLA) (2).

Die molekularen Ursachen sind Mutationen in folgenden Genen: *IGHM*, *IGLLI*, *CD79A*, *CD79B*, *BLNK*, *PIK3R1* und *TCF3* (siehe Tabelle 1; (37)).

Bei 5-8% der Agammaglobulinämien lässt sich bislang keine genetische Ursache finden (38).

Erkrankung	Gendefekt	Erbgang	OMIM
X-chromosomale Agammaglobulinämie; BTK Mangel (XLA)	BTK	XL	300300
μ-Schwereketten Mangel	IGHM	AR	147020
λ5 Mangel	IGLL1	AR	146770
Igα Mangel	CD79A	AR	112205
Igβ Mangel	CD79B	AR	107265
BLNK Mangel	BLNK	AR	604515
PIK3R1 Mangel	PIK3R1	AR	171833
Defekt des E47-Transkriptionsfaktors	TCF3	AD	147141

**Tabelle 1: Genetische Ursachen von Agammaglobulinämien**

Dargestellt sind die bekannten genetischen Ursachen einer Agammaglobulinämie. Modifiziert nach (37).

### 1.2.3. Immundefekte der späten B-Zell Entwicklung

CVID (*common variable immunodeficiency*) bezeichnet eine heterogene Gruppe von Immundefekten mit einer fehlerhaften B-Zell Differenzierung (39). Charakterisiert ist der Defekt durch eine reduzierte Konzentration von  $\geq$  zwei Immunglobulinklassen (hauptsächlich IgG, IgM und/oder IgA), verminderte Impfantworten und eine vermehrte Infektionsanfälligkeit (1).

Da es sich um eine Ausschlussdiagnose handelt, sollten sekundäre Immundefekte als Ursache diagnostisch ausgeschlossen werden (40).

In der immunologischen Spezialuntersuchung (Durchflusszytometrie) lassen sich im Gegensatz zu den Agammaglobulinämien reife B-Zellen in normaler Anzahl im Blut nachweisen, jedoch ist der Anteil von Gedächtnis-B-Zellen meist

stark vermindert bis komplett fehlend. Des Weiteren fehlen Plasmazellen im lymphatischen Gewebe, weshalb eine Differenzierungsstörung der B-Zelle vermutet wird (39).

Das mittlere Manifestationsalter ist im Gegensatz zu den Immundefekten der frühen B- Zell Entwicklung wesentlich später (zwei Altersgipfel: Kindesalter und frühes Erwachsenenalter) (7).

Die führende Symptomatik der Immundefekte mit vorwiegendem Immunglobulinmangel sind Infektionen des Respirationstraktes durch meist bekapselte Bakterien (v.a. durch *H. influenzae* und *S. pneumoniae*). Zusätzlich können Autoimmunerkrankungen assoziiert sein, z.B. perniziöse Anämie, hämolytische Anämie, Immunthrombozytopenien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und rheumatoide Arthritis. Für Patienten mit CVID besteht generell ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Tumore (v.a. Lymphome) (3).

Bekannte molekulare Ursachen des CVID sind Mutationen in folgenden Genen: *PIK3CD* (GOF), *PIK3R1*, *PTEN*, *CD19*, *CD81*, *MS4A1*, *NFKB1*, *CR2*, *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C*, *TNFSF12*, *IKZF1* und *IRF2BP2* (siehe Tabelle 2; (37)).

In den meisten Fällen lässt sich jedoch keine genetische Ursache finden (38).

Unter diesen genetischen Ursachen ist die homo- oder heterozygote TACI-Variante die häufigste bekannte Ursache eines CVID (38). Allerdings führt diese Variante nicht zwangsläufig zum Phänotyp des CVID, sondern zeigt eher eine krankheitsauslösende Disposition, da sie auch bei gesunden Individuen vorkommt (41). TACI gehört zu einem Zytokin-Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie, welcher auf B-Zellen exprimiert wird (42;43). CVID Patienten mit heterozygoten TACI-Varianten haben eine höhere Wahrscheinlichkeit an einer Autoimmunerkrankung zu erkranken und eine Splenomegalie zu entwickeln (38).

Des Weiteren gibt es Mutationen in dem Gen, welches CD19 kodiert, als Ursache eines CVID. Es handelt sich um Leserastermutationen in Exon 6 und 11. Die meisten Patienten erkranken vor dem 10. Lebensjahr (38).

Der sogenannte CD19-Komplex beinhaltet CD19, CD21, CD81 und CD225, welche als Ko-Rezeptoren für die kalziumabhängige BZR-Stimulation entscheidend sind. Eine Mutation in CD19, CD21 oder CD81 verursacht durch eine fehlerhafte B-Zell Aktivierung das Krankheitsbild eines CVID (7).

Mutationen von CD20 beeinflussen zwar nicht die kalziumabhängige BZR Aktivierung, führen aber trotzdem zu einer Hypogammaglobulinämie und verminderter T-Zell Antwort auf Polysaccharide (7).

Erkrankung	Gendefekt	Erbgang	OMIM
Common variable immune deficiency (CVID) ohne Gendefektnachweis	unbekannt	variabel	
PIK3CD Mutation	PKI3CD GOF	AD	602839
PIK3R1 Defekt	PIK3R1	AD	616005
PTEN Defekt	PTEN	AD	601728
CD19 Mangel	CD19	AR	107265
CD81 Mangel	CD81	AR	186845
CD20 Mangel	MS4A1	AR	112210
CD21 Mangel	CR2	AR	120650
TAC1 Defekt	TNFRSF13B (TAC1)	AD oder AR	604907
BAFFR Defekt	TNFRSF13C (BAFF-R)	AR	606269
TWEAK Defekt	TNFSF12	AD	602695
NFKB1 Defekt	NFKB1	AD	164011
NFKB2 Defekt	NFKB2	AD	615577
IKAROS Defekt	IKZF1	AD	603023
IRF2BP2 Defekt	IRF2B2	AD	615332

**Tabelle 2: Genetische Ursachen von Hypogammaglobulinämien**

Dargestellt sind die bekannten genetischen Ursachen einer Hypogammaglobulinämie. Modifiziert nach (37).

### 1.3. Fragestellung der Arbeit

In der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg stellte sich 2014 die Indexpatientin mit vorberichtlich rezidivierenden Infektionen (vor allem des Respirationstraktes) vor. Aufgrund einer stark reduzierten Serumkonzentration aller Immunglobuline sowie niedriger Impfantikörper für die altersentsprechenden Standardimpfungen wurde ein Immundefekt im Sinne eines CVID diagnostiziert. Anlässlich einer auffälligen B-Zell Verteilung erfolgte eine genetische Untersuchung eines Kandidatengens (*IGHD*, welches für IgD kodiert).

Bei der betroffenen Indexpatientin (und weiteren Familienmitgliedern) wurde eine heterozygote *IGHD*-Variante detektiert.

Folgende Fragestellungen wurden gestellt:

1. Ist die oben genannte *IGHD*-Variante für die Erkrankung der Indexpatientin und ggf. weiterer Familienmitglieder relevant?
2. Welche Rolle spielt IgD für die Differenzierung von B-Zellen und die Entwicklung eines Immunglobulin-Repertoires naiver B-Zellen?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Herkunft der Proben

Die untersuchten Proben stammen von Patienten der Universitätskinderklinik Würzburg, welche innerhalb diagnostischer oder therapeutischer Eingriffe gewonnen wurden.

Eine Einverständniserklärung der Patienten liegt vor. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg beraten (Ethikantragsnummer: 218/18-sc).

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Isolation mononukleärer Zellen

Die Isolierung von PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde 8ml EDTA-Vollblut mit NaCl 0,9% in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und über 10ml einer Ficoll-Lösung geschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte 25min mit 1.500rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur.

Nach der Zentrifugation sammelte sich ein weißlich trüber Ring zwischen der Blutzellen-Suspension und dem Ficoll, worin sich die mononukleären Zellen befanden. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde dieser Ring aufgenommen und in ein mit 10ml mit komplettem Zellkulturmedium für Leukozyten gefülltes Falcon pipettiert.

#### 2.2.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, in dem die Expression definierter Moleküle auf Einzelzellebene quantifiziert werden kann. Der Mechanismus beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung mit fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern (44) (siehe Tabelle 3). Für die durchflusszytometrische Messung wurde ein FACS Canto 2, für die durchflusszytometrische Sortierung ein FACS Aria Cellsorter verwendet. Die Analyse erfolgte mit der FACSDiva und FlowJo-Software.

### 2.2.2.1. Antikörper

Die aufgereinigten PBMC (ca.  $10^6$ ) wurden in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und mit entsprechenden Antikörpern in der angegebenen Verdünnung versetzt (siehe Tabelle 3). Im nächsten Schritt wurden die Proben für 20min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die einmalige Waschung mittels FACS-Puffer.

Bindungsstelle	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Verdünnung	Firma
IgA	FITC	-	Ziege, IgG	1:400	Southern Biotech, USA
IgG	PE	G18-145	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
CD27	PerCP/Cy-5.5	M-T271	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	1:200	Bio Legend, USA
IgD	Alexa Fluor 647	IA6-2	Maus IgG2a, κ	1:200	Bio Legend, USA
CD10	PE/Cy7	HI10a	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	1:200	Bio Legend, USA
CD19	APC/Cy7	HIB19	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	1:200	Bio Legend, USA
IgM	BV421	MHM-88	Maus IgG <sub>1</sub> , κ	1:300	Bio Legend, USA

**Tabelle 3: Verwendete Antikörper**

Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Cyanin 5.5 (Cy5.5), Cyanin 7 (Cy7), Allophycocyanin (APC), Brilliant Violet 421 (BV421)

### 2.2.3. Immunglobulin-Repertoire Analyse aus Einzelzellen

Die Zellen wurden, wie in 2.2.2. beschrieben, nach ihrem Oberflächenmarker sortiert und mit einer angeschlossenen Einzelzellauswurfleinrichtung als Einzelzellen sortiert.

Die Zellen wurden anschließend in eine PCR-Platte mit 96-Loch gelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen wurden  $10\mu\text{l}$  Lyselösung (siehe Tabelle 4) in jedes Loch hinzugegeben. Es erfolgte die Zentrifugation der PCR-Platten für 2min bei  $5^{\circ}\text{C}$  (750rpm). Währenddessen erfolgte die Anlagerung von Oligo-Desoxythymidin an die mRNA und die Lysierung der Zellen. Abschließend erfolgte eine Inkubation der Suspension bei  $65^{\circ}\text{C}$  (1 Minute) und bei  $20^{\circ}\text{C}$  (2 Minuten).

Reagenz	Menge	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	500 $\mu\text{l}$	--
Random Hexamers (50 $\mu\text{M}$ )	100 $\mu\text{l}$	7,1 $\mu\text{M}$
DTT (100mM)	36 $\mu\text{l}$	5,1 $\mu\text{M}$
NP-40 (10%)	50 $\mu\text{l}$	0,71%
RNAsin RNase Inhibitor (40U/ $\mu\text{l}$ )	14 $\mu\text{l}$	0,8 U/ $\mu\text{l}$

**Tabelle 4: Bestandteile der Lyselösung**

#### 2.2.3.1. Reverse Transkription und PCR

Um mRNA in cDNA umzuschreiben, wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Das Enzym kann sich an den Oligo-Desoxythymidin-Primer anlagern.

Dazu wird das Zelllysat zusammen mit  $3\mu\text{l}$  Mastermix (siehe Tabelle 5) bei  $42^{\circ}\text{C}$  (50min) und anschließend bei  $65^{\circ}\text{C}$  (10min) inkubiert.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	225µl	--
5X buffer	280µl	2X
dNTPs (100mM)	50µl	7,1mM
DTT (100mM)	100µl	14,3mM
RNasin RNase Inhibitor (40U/µl)	20µl	1,1U/µl
Superscript III (200U/l)	25µl	7,1U/µl

**Tabelle 5: Bestandteile des Mastermix' für die reverse Transkription**

Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgt bei -80°C. Für die anschließende PCR wurden unterschiedliche Primer für den ersten und zweiten Schritt verwendet (siehe Tabelle 6 und 11). Es wurden 3,5µl der cDNA als Matrize für die erste PCR und 4µl PCR-Produkt aus der ersten PCR als Matrize für die zweite PCR verwendet.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	3266µl	--
10X buffer	415µl	1X
dNTPs (100mM)	46,5µl	11,2mM
5'Primer Mix (50µM)	14,5µl	0,17µM
3'Primer Mix (50µM)	14,5µl	0,17µM

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Taq Polymerase (5U/μl)	43,5μl	0,05U/μl

**Tabelle 6: Bestandteile des PCR-Mix‘ für die Amplifikation rearrangierter Immunglobulingene (Mix für 100 Ansätze)**

Die einzelnen Schritte der PCR waren: Denaturierung, Annealing, Elongation.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	5min
	94°C	30sec
Annealing	57°C (1.PCR)	30sec
	59°C (2.PCR)	
Elongation	72°C	55sec (1.PCR)
		45sec (2.PCR)
	72°C	5min

**Tabelle 7: Reaktionsschritte der Einzelzell-PCR zur Amplifikation rearrangierter Immunglobulingene**

Es wurden 50 Zyklen der einzelnen Reaktionsschritte durchgeführt.

### 2.2.3.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten und Aufreinigung des PCR-Produkts

Ein Aliquot des PCR-Produkts wurde mittels Gelelektrophorese mit einem 1,0%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Bei einem positiven Nachweis eines spezifischen PCR-Produkts mit einer Bande auf Höhe ~450 Basenpaare wurde das

restliche PCR-Produkt mittels QIAGEN-Quick PCR-Purification-Kit über eine Säule mit einer Silica-Membran aufgereinigt. Hierzu wurde ein Vacuumflow verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit 30µl Elution-Buffer eluiert.

#### **2.2.3.3. Sanger-Sequenzierung**

Die PCR-Produkte wurden mittels Sanger-Sequenzierung über einen kommerziellen Anbieter (Firma GATC Biotech AG, European Custom Sequencing Centre, Gottfried-Hagen-Str. 20, 51105 Köln) sequenziert. Zunächst wurden 5µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 5µl Primer (5µM) in vorgefertigte 1,5ml Tubes pipettiert.

Für die Sequenzierung wurde der 5' Primer-Mix der Nested-PCR verwendet.

#### **2.2.3.4. Auswertung der Sequenzierungsergebnisse**

Die Sequenzen wurden mithilfe einer online basierten Software „Ig-BLAST“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) ausgewertet.

Es konnten die VH-Familien, VH/DH- und JH-Segmente sowie Charakteristika der CDR3-Region analysiert werden.

Die Länge der CDR3-Region in der schweren Kette ist definiert von der letzten „C“-Base (GTG) in FW3 bis zur letzten Aminosäure vor „WG“ (TGGGGX).

Anschließend wurden die negativen und positiven Ladungen der CDR3-Region bestimmt. Positiv geladen sind die Aminosäuren R (Arginin), H (Histidin) und K (Lysin); negativ geladen sind D (Asparaginsäure) und E (Glutaminsäure).

Der reading frame (offenes Leseraster) der D-Regionen wurde den passenden DH-Sequenzen Stopp („1“), Hydrophil („2“) und Hydrophob („3“) entsprechend zugeordnet (45).

#### **2.2.4. Statistische Auswertung**

Verglichen wurden der relative Anteil der VH-, DH- und JH-Segmente sowie die CDR3-Länge und die dazugehörigen negativen und positiven Ladungen (0-2/<3) von gepoolten Immunglobulinsequenzen von zwei *IGHD*-Variantenträgern und Gesundkontrollen (46-58).

Die Daten wurden mittels Office Excel 2016 sortiert und ausgewertet (siehe Abschnitt 3.3.). Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test. Bei einem p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen. Eine graphische Darstellung erfolgte mittels Power Point.

## 2.3. Materialien

### 2.3.1. Labormaterialien

---

Material	Firma
Filter Tips (0,5-20 $\mu$ l), REF 70.1116.210;	Biosphere, Sarstedt; Nümbrecht
Filter Tips (2-100 $\mu$ l), REF 70.760.212;	Biosphere, Sarstedt; Nümbrecht
Filter Tips (100-1000 $\mu$ l), REF 70.762.211;	Biosphere, Sarstedt; Nümbrecht
Glaspipette 10ml	Marienfeld; Lauda-Königshofen
Cellstar 10ml in 1/10	greiner bio-one; Frickenhausen
96 PCR-Platte Halbrand, REF 72.1979.202	Sarstedt; Nümbrecht
Petrischalen Greiner 632102 (94/16mm)	greiner bio-one; Frickenhausen
Cryo.S (Einfrierröhrchen) 1,0ml	greiner bio-one; Frickenhausen
Cellstar Tubes 15ml	greiner bio-one; Frickenhausen
Cellstar Tubes 50ml	greiner bio-one; Frickenhausen
Safe Seal Gefäß 1,5ml	Sarstedt; Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt; Nümbrecht
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buffer PB Binding buffer</li> <li>• Buffer PE Wash buffer</li> <li>• Buffer EB Elution buffer</li> <li>• QIAquick Spin Columns 50</li> </ul>	
FACS Röhrchen 5ml Polystyrene round bottom tube	BD; Heidelberg

**Tabelle 8: Labormaterialien**

### 2.3.2. Reagenzien

---

Reagenz	Firma
Destilliertes H <sub>2</sub> O (Ampuwa Spüllösung)	Fresenius Kabi; Langenhagen
Agarose Pulver universal peqGOLD (Lot.-No. 209363)	peqlab; Erlangen
DNA-Stain (HD Green Plus) (Lot.-No. Ba20150528)	INTAS; Göttingen
Loading Buffer (Gel Pilot Loading Dye); (Lot.-No. 148010187)	Qiagen; Hilden
Quick-Load, 100 bp DNA Ladder (Lot: 0491412)	New England BioLabs; Frankfurt am Main
Primer für Versand: 5'- Age VH Mix	Eurofins Genomics; Ebersberg
Isotone Kochsalzlösung NaCl 0,9%	Fresenius Kabi; Langenhagen
RPMI-1640 Medium (L-glutamine, sodium bicarbonate, liquid, steril - filtered, suitable for cell culture),	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
FicoLite-H (Human)	Linaris; Dossenheim
Nuclease free water	Qiagen; Hilden
Random hexamers (50µM)	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific); Darmstadt
NP-40 Detergent solution (10%)	Thermo Fisher Scientific; Darmstadt
RNAsin Ribonuclease Inhibitor	Promega; Mannheim
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche; Mannheim
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific); Darmstadt
Hot Start Taq DNA Polymerase	Quiagen; Hilden

**Tabelle 9: Reagenzien**

### 2.3.3. Medien und Puffer

Medium / Puffer	Firma
FACS-Puffer	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1xPBS</li> <li>• 0,5 % Bovines Serum Albumin (Cat.-No. A9647)</li> </ul>	Life technologies; Carlsbad (Kalifornien); USA Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Komplettes Zellmedium	FBS Biochrom GmbH; Berlin
<ul style="list-style-type: none"> <li>• RPMI</li> <li>• 1% Penicillin/ -Streptomycin</li> <li>• 10% FBS (fetal bovine serum)</li> </ul>	
TBE-Puffer	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 450mM TRIS Base M (T-6066)</li> <li>• 450mM Borsäure M (B-6768)</li> <li>• 10mM EDTA (E-5134)</li> </ul>	Sigma-Aldrich; Taufkirchen Sigma-Aldrich; Taufkirchen Sigma-Aldrich; Taufkirchen

**Tabelle 10: Medien und Puffer**

### 2.3.4. Primer

	Name Forward Primer	Sequenz Forward Primer	Name Reverse Primer	Sequenz Reverse Primer
Erste PCR	5' L-VH1	ACAGGTGCCAC-TCCCAGGTGCAG	3' C $\mu$ CH1	GGGAATTCTC-ACAGGAGACGA
	5' L-VH2	CTGCAACCGGTG-TACATTGTGCCA-TCCGGATGACCC-AGTC	3'IgD CH1	GGAAGGTGTG-CACGCCGCTGGTC
	5' L-VH3	AAGGTGTCCAGT-GTGARGTGCAG		
	5' L-VH4/6	CCCAGATGGGTC-CTGTCCCAGGTG-CAG		

	<b>Name Forward Primer</b>	<b>Sequenz Forward Primer</b>	<b>Name Reverse Primer</b>	<b>Sequenz Reverse Primer</b>
	5' L-VH5	CAAGGAGTCTGT-TCCGAGGTGCAG-		
Zweite PCR	5' Agel VH1/5	CTGCA <b>ACCGGTG</b> -TACATTCCGAGGT-GCAGCTGGTGCAG	3' Sall JH1/2/4/5	TGCGAAG <b>TCCG-ACGCTGAGGA</b> -GACGGTGACCAG
	5' Agel VH3	CTGCA <b>ACCGGTG</b> -TACATTCTGAGGT-GCAGCTGGTGGAG	3' Sall JH3	TGCGAAG <b>TCCG-ACGCTGAAGA</b> -GACGGTGACC-ATTG
	5' Agel VH4	CTGCA <b>ACCGGTG</b> -TACATTCCCAGGT-GCAGCTGCAGGAG	3' Sall JH6	TGCGAAG <b>TCCG-ACGCTGAGGA</b> -GACGGTGACC-GTG
	5' Agel VH3-23	CTGCA <b>ACCGGTG</b> -TACATTCTGAGGT-GCAGCTGTTGGAG		
	5' Agel VH4-34	CTGCA <b>ACCGGTG</b> -TACATTCCCAGGT-GCAGCTACAGCAGTG		

**Tabelle 11: Primer**

### 2.3.5. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Messzylinder	Brand; Wertheim
Glaskolben	Brand; Wertheim
Gelträger aus Plexiglas	laborintern
Eppendorf Pipette 10µl (Reference 2)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Pipette 100µl (Reference 2)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Pipette 1000µl (Reference 2)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf

---

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
8-Kanal Multipipette 10-100µl (Reference 2)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Mikrowelle 500W	Bosch; Gerlingen
Image Reader (Gel Doc 2000)	Bio Rad; Dreieich
Vacuum Manifold QIAvac 24 Plus (Cat. No. 19413)	QIAGEN; Hilden
Eppendorf Zentrifuge (Centrifuge 5415R)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge Mikro 120	Hettich LabTechnology; Tuttlingen
Vortex Minishaker MS2	IKA-Werke; Staufen
Pipetboy acu	IBS (Integra Biosciences); Biebertal
FACS Canto 2	BD; Franklin Lakes (USA)

**Tabelle 12: Laborgeräte**

### 2.3.6. Software

---

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Microsoft Excel 2016	Microsoft, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft, USA
Prism 7	Graph Pad Software, Kalifornien (USA)
FACSDiva 6	BD, Franklin Lakes (USA)
Ig BLAST (letzte Modifizierung 09.09.2013)	NCBI, USA
FlowJo; Version 10	FlowJo LLC; Ashland (USA)

**Tabelle 13: Software**

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Beschreibung der Indexpatientin

Die damals 3 Jahre alte Indexpatientin (III.3.) stellte sich erstmals 2014 in der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg vor. Sie litt unter rezidivierenden Infektionen vor allem des Respirationstraktes (obstruktive Bronchitiden, Pneumonien), zervikaler Lymphadenopathie sowie rezidivierenden Otitiden.

In der initialen Blutuntersuchung zeigten sich neben einem Immunglobulinmangel (IgA, IgG und IgM) zusätzlich fehlende bzw. abgeschwächte Impfantworten bei nachweislich erfolgten Impfungen gegen Tetanus, Diphtherie, Mumps, Masern, Röteln und Varizella-Zoster-Virus (siehe Tabelle 15).

Anhand der klinischen und laborchemischen Untersuchungen wurde der Verdacht eines variablen Immundefekts (CVID) gestellt und die Basisdiagnostik mit durchflusszytometrischen Untersuchungen erweitert.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich bei der Quantifizierung der Lymphozytenpopulation eine normale Anzahl von T-, B- und natürlichen Killerzellen (siehe Tabelle 15). Auffälligkeiten zeigte die Indexpatientin hinsichtlich einer deutlichen Verminderung der Gedächtnis-B-Zellen (CD27<sup>+</sup>) sowohl mit Expression des membranständigen IgD (IgD<sup>+</sup>) als auch ohne Expression von IgD (IgD<sup>-</sup>) (siehe Tabelle 15). Zusätzlich fiel ein vermehrter Anteil CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> B-Zellen auf (siehe Tabelle 15), die aufgrund ihres Phänotyps mit durchgelaufenem Immunglobulin-Klassenwechsel (IgM-negativ) aber fehlender Expression des für B-Zellen charakteristischen Gedächtnis-Markers (CD27) als „atypische“ Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet werden.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass etwa 50% der normalerweise IgD und IgM koexprimierenden CD27<sup>-</sup> naiven B-Zellen zwar IgM jedoch kein IgD exprimierten, sodass es sich bei den oben beschriebenen „atypischen“ Gedächtnis-B-Zellen um IgD<sup>-</sup> aber IgM<sup>+</sup> naive B-Zellen handelt.

Aufgrund der durchflusszytometrischen Untersuchung mit anteilig etwa der Hälfte der naiven B-Zellen ohne membranständige IgD-Expression wurde der Verdacht geäußert, dass gegebenenfalls eine genetische Variante im für IgD kodierenden *IGHD*-Gen vorliegen könnte, welche die Expression von IgD auf den B-Zellen negativ beeinflusst.

Deshalb könne die naive B-Zell-Population der Indexpatientin in einen Wildtyp (IgD<sup>+</sup>) und Mutante (IgD<sup>-</sup>) unterteilt werden. Die möglicherweise unterschiedliche Verteilung von IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) und IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) ließe sich aufgrund des Mechanismus der allelischen Exklusion (siehe Abschnitt 1.2.) erklären, wobei B-Zellen immer nur ein Allel des Immunglobulins exprimieren (Mutante oder Wildtyp).

### **3.1.1. Genetische Untersuchung der Indexpatientin sowie weiterer Familienmitglieder**

Eine genetische Analyse im Immunologischen Labor der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg ergab bei der oben genannten Indexpatientin eine Variante im *IGHD*-Gen, welches für den konstanten Teil von IgD kodiert (siehe Abbildung 3, Stammbaum: III.3.). Die durch die *IGHD*-Variante bedingte Veränderung liegt in der C<sub>H1</sub>-Domäne des konstanten Teils von IgD. Es handelt sich um eine Missense-Mutation (c.16 C>T), bei der durch eine Substitution anstelle der Aminosäure Prolin, Leucin vorliegt (p.Pro6Leu).

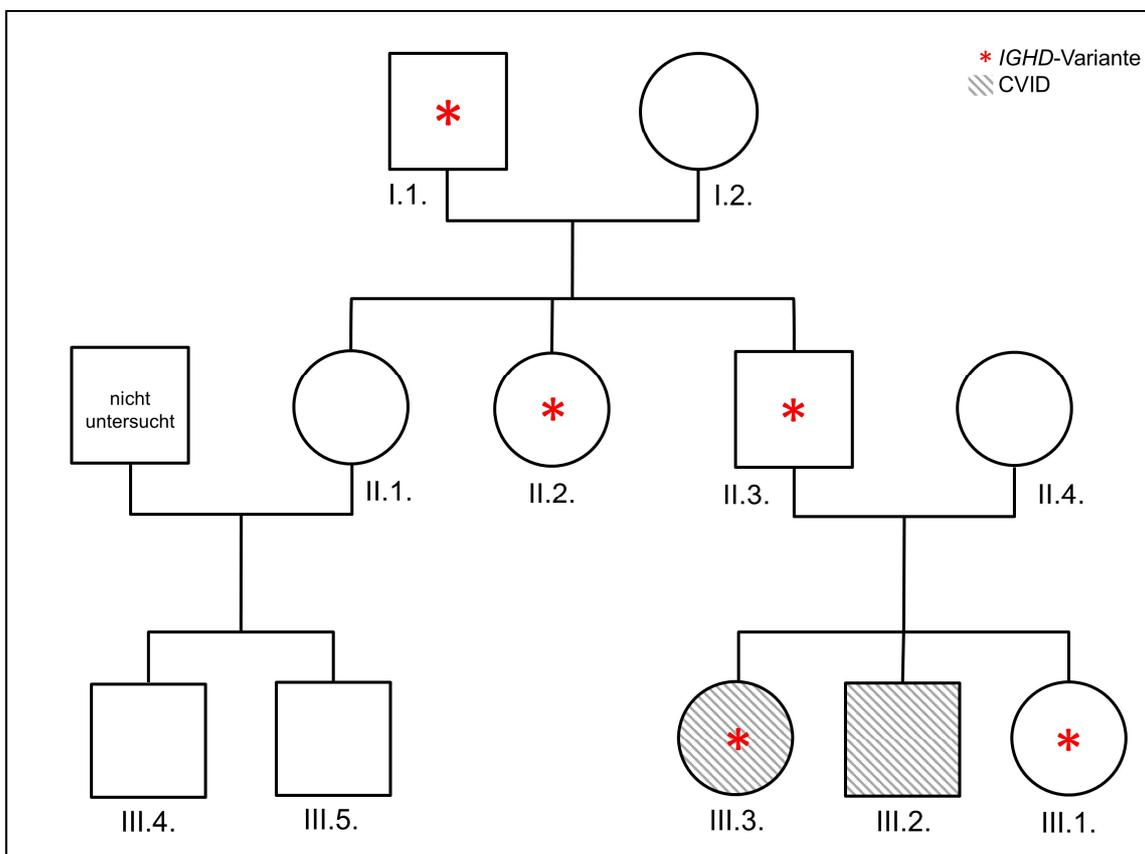
Da Prolin an Stelle 6 in vielen Spezies aber auch in den verschiedenen Isotypen des Menschen konserviert ist, lässt sich vermuten, dass diese Position eine wichtige Funktion der C-Region des Immunglobulins darstellt und möglicherweise wichtig für dessen Konfiguration ist.

In der weiteren Familienuntersuchung wurde die beschriebene *IGHD*-Variante bei vier weiteren Familienmitgliedern über drei Generationen detektiert (siehe Abbildung 3: I.1.; II.2.; II.3.; III.1.)

### 3.1.2. Die Bedeutung der p.Pro6Leu *IGHD*-Variante für die Entstehung des Antikörpermangelsyndroms

Bis auf den Bruder der Patientin (siehe Abbildung 3: III.2.) zeigten keine weiteren der untersuchten Familienmitglieder eine klassische Symptomatik eines Immundefektes (leere Anamnese für Infektanfälligkeit).

Bei dem Bruder der Indexpatientin zeigte sich, ähnlich zum Krankheitsbild der Indexpatientin, eine auffällige Infektionsanfälligkeit mit rezidivierenden Bronchitiden.



**Abbildung 3: Stammbaum der Familie**

Dargestellt ist der Stammbaum der Familie W17 über drei Generationen. Bei den entsprechend markierten Individuen wurde eine *IGHD*-Variante genetisch nachgewiesen. Die schraffierten Symbole stellen Individuen mit diagnostiziertem variables Immundefektsyndrom (CVID) dar.

Indexpatientin: III.3., ○ weibliche Individuen, □ männliche Individuen

In der immunologischen Analyse der erwachsenen Individuen I.1., II.1., II.2., II.3., II.4., sowie der Kinder III.1., III.4. und III.5. (siehe Abbildung 3) wurde ein

Immundefekt anhand normwertiger Serumimmunglobulin-Spiegel und positiven Impfantworten ausgeschlossen (siehe Tabelle 14 und 15). Bei I.2. (siehe Abbildung 3) zeigten sich eine verminderte Anzahl von T-Zellen sowie ein leicht vermindertes IgM im Serum (siehe Tabelle 14).

In der laborchemischen und immunologischen Diagnostik des Bruders (III.2.) der Indexpatientin zeigte sich eine Hypogammaglobulinämie mit einer Verminderung der Serumspiegel von IgA und IgM. Der IgD-Serumspiegel war leicht erhöht. Zusätzlich waren einige Impfantworten abgeschwächt/nicht nachweisbar (siehe Tabelle 15). In der durchflusszytometrischen Analyse wurde ein verminderter Anteil von Gedächtnis-B-Zellen festgestellt (siehe Tabelle 15). Daher wurde auch bei dem Bruder die Diagnose eines CVID gestellt.

Zusammenfassend wurde insgesamt bei fünf Familienmitgliedern die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante über mehrere Generationen diagnostiziert. Vier dieser Personen hatten nie eine apparente Infektionsneigung und zeigten keine Auffälligkeiten in der immunologischen Analyse (Serumimmunglobuline und Impftiter). Bei der Indexpatientin, die auch diese Variante trägt, war ein Immundefekt im Sinne eines CVID diagnostiziert worden. Beim Bruder der Indexpatientin wurde ein CVID diagnostiziert; bei ihm lag die *IGHD*-Variante jedoch nicht vor. Letztendlich gab es somit keinen Anhalt, dass die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante mit dem Phänotyp der Indexpatientin segregiert.

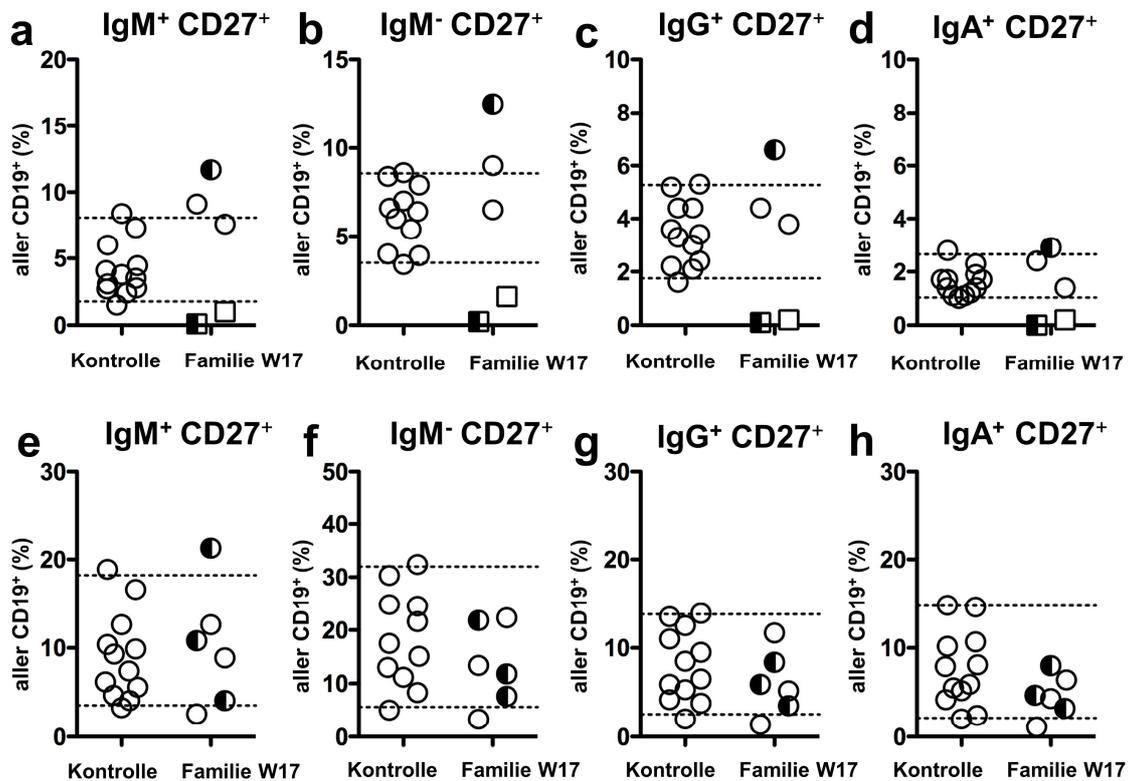
Tabelle 14: Immunologische Labordiagnostik erwachsener Individuen

Stammbaum	I.1	I.2	II.2	II.1	II.3	II.4	Normwerte Erwachsene
<b>IGHD-Variante</b>	<b>ja</b>	nein	<b>ja</b>	nein	<b>ja</b>	nein	
Leukozyten	5.85	5.17	7.98	9.74	8.57	6.84	5-10 n*1000/µl
Lymphozyten	1.79	<b>0.61 -</b>	2.10	2.71	2.19	1.66	1.0-4.05 n*1000/µl
CD3 <sup>+</sup>	59.3	53.2	78.3	76.9	62.2	69.4	56-84%
CD19 <sup>+</sup>	4.6	14.0	5.5	6.7	14.2	13.2	6-23 %
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	43.6	31.5	50.5	<b>53.9 +</b>	45.2	42.3	31-52 %
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	10.2	<b>14.9 -</b>	22.6	18.8	14.6	24.6	18-35 %
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	33.4	<b>26.2 +</b>	12.1	13.5	<b>27.2 -</b>	9.4	3-22 %
CD3 <sup>+</sup>	1062	<b>327 -</b>	1650	2082	1359	1149	1000-2200 /µl
CD19 <sup>+</sup>	82	86	116	182	92	219	70-480 /µl
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	780	<b>157 -</b>	1064	1460	987	701	530-1300 /µl
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	183	<b>92 -</b>	475	508	319	407	330-920 /µl
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	597	161	255	366	<b>604 +</b>	155	110-570 /µl
% 27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	31.1	90.1	44.7	66.7	<b>38.4 -</b>	<b>41.5 -</b>	61-92 %
% 27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	13.5	3.0	5.6	13.7	14.1	5.9	3-17 %
% 27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	17.9	4.1	23.0	16.7	24.4	<b>33.6 +</b>	2-16 %
% 27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>	37.5	2.8	26.7	2.9	23.1	18.9	
% CD24 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>	3.1	<b>12.3 +</b>	3.6	1.8	4.4	2.3	2-9 %
% CD21 <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup>	0.2	2.8	0.1	<b>8.2 +</b>	<b>5.3 +</b>	<b>10.6 +</b>	0-4 %
% CD24 <sup>-</sup> CD38 <sup>++</sup>	0.1	0.6	0.1	1.0	0.8	0.2	0-4 %
IgG	1054.0	1295.0	993.0	1333.0	1162.0	1197.0	690-1600 mg/dl
IgA	159.0	182.0	80.0	146.0	106.0	117.0	70-370 mg/dl
IgM	94.0	<b>39.0 -</b>	54.0	102.0	43.0	56.0	40-240 mg/dl
IgE	14.6	31.7	9.5	<b>112.0 +</b>	27.9	nicht untersucht	0-100 IU/ ml
IgD	<0.6	1.6	<0.6	2.4	<0.7	9.5	0.1-15.3 mg/dl
IgG1 (Subfraktion)	468.17	<b>811.16 +</b>	423.06	788.00	585.71	492.37	280-800 mg/dl
IgG2 (Subfraktion)	427.92	399.41	476.62	497.00	499.23	489.19	115-570 mg/dl
IgG3 (Subfraktion)	83.42	107.41	65.93	94.00	74.79	105.54	24-125 mg/dl
IgG4 (Subfraktion)	15.80	28.01	35.82	18.20	27.93	26.49	5.2-125 mg/dl
Tetanus	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<0.10 IU/ml)
Diphtherie	positiv	<b>negativ</b> (0.03 IU/ml)	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<0.10 IU/ml)
Mumpsvirus IgG-AK	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<1:500 Titer)
Masernvirus IgG-AK	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	<b>grenzwertig</b> (240 mIU/ml)	negativ (<300mIU/ml)
Rötelnvirus IgG-AK	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<8 IU/ml)
VZV IgG-AK	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<100 mIU/ml)

Tabelle 15: Immunologische Labordiagnostik pädiatrischer Individuen

Stammbaum	III.1	III.2	III.3	III.4	III.5	Normwerte Kinder
<b>IGHD-Variante</b>	<b>ja</b>	nein	<b>ja</b>	nein	nein	
Leukozyten	6.79	15.39	13.3	9.320	6.24	5-17 n*1000/ $\mu$ l
Lymphozyten	2.32	3.38	3.83	2.90	2.88	1.5-9.5 n*1000/ $\mu$ l
CD3 <sup>+</sup>	73.9	68.9	64.4	60.2	65.0	56-75 %
CD19 <sup>+</sup>	5.7	<b>6.1 -</b>	18.3	24.3	17.3	13-27 %
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	33.6	<b>29.4 -</b>	33.6	24.1	40.8	31-47 %
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	30.4	32.5	25.4	27.3	16.4	16-35 %
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14.7	<b>22.3 +</b>	9.2	10.3	13.2	4-17 %
CD3 <sup>+</sup>	1716	1714	2166	1751	1924	1400-3700 / $\mu$ l
CD19 <sup>+</sup>	133	151	614	705	512	390-1400 / $\mu$ l
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	779	730	1131	702	1206	700-2200 / $\mu$ l
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	705	807	856	795	487	490-2200 / $\mu$ l
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	342	555	614	300	392	130-720 / $\mu$ l
% 27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	43.4	<b>92.4 +</b>	60.9	70.2	81.8	55-85 %
% 27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	10.5	<b>0.9 -</b>	<b>0.3 -</b>	17.0	9.3	5-17 %
% 27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	<b>20.5 +</b>	2.0	<b>0.3 -</b>	9.3	6.7	2-16 %
% 27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>	25.6	4.7	38.5	3.5	2.2	
% CD24 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>	<b>1.4 -</b>	8.9	<b>3.6 -</b>	<b>12.6 +</b>	11.4	4-12 %
% CD21 <sup>-</sup> CD38	<b>7.7 +</b>	1.0	3.4	<b>6.9 +</b>	1.3	1-4 %
% CD24 <sup>-</sup> CD38 <sup>++</sup>	0.9	0.5	0.2	1.4	0.8	0-6 %
IgG	1040.0	871.0	<b>617.0 -</b>	821.0	710.0	640-1420 mg/dl
IgA	74.0	<b>34.0 -</b>	<b>&lt;5.0 -</b>	51.0	74.0	52-220 mg/dl
IgM	70.0	<b>39.0 -</b>	<b>25.0 -</b>	67.0	51.0	40-180 mg/dl
IgE	nicht untersucht	8.6	0.2	6.8	7.6	0-60 IU/ml
IgD	1.0	<b>16.5 +</b>	<b>&lt;0.7 -</b>	2.9	<b>&lt;0.7 -</b>	0.1-15.3 mg/dl
IgG1 (Subfraktion)	748.04	520.53	164.00	375.00	498.33	240-780 mg/dl
IgG2 (Subfraktion)	246.59	115.48	63.80	151.00	138.03	55-200 mg/dl
IgG3 (Subfraktion)	51.15	<b>115.72 +</b>	<b>106.81 +</b>	57.00	48.90	15-93 mg/dl
IgG4 (Subfraktion)	19.19	1.49	<b>&lt;0.30 -</b>	9.50	16.61	0.6-68.9 mg/dl
Tetanus	positiv	<b>negativ</b> (0.04 IU/ml)	<b>negativ</b> (0.04 IU/ml)	positiv	positiv	negativ (<0.10 IU/ml)
Diphtherie	positiv	<b>negativ</b> (0.05 IU/ml)	<b>negativ</b> (0.08 IU/ml)	positiv (0.23 IU/ml)	positiv	negativ (<0.10 IU/ml)
Mumpsvirus IgG-AK	positiv	<b>grenzwertig</b> (1:360 Titer)	<b>negativ</b> (<1:230 Titer)	<b>grenzwertig</b> (1:250 Titer)	positiv	negativ (<1:500 Titer)
Masernvirus IgG-AK	positiv	positiv	<b>grenzwertig</b> (150 mlU/ml)	positiv	positiv	negativ (<300mlU/ml)
Rötelnvirus IgG-AK	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ (<8 IU/ml)
VZV IgG-AK	positiv	positiv	<b>negativ</b> (<50mlU/ml)	<b>grenzwertig</b> (86mlU/ml)	positiv	negativ (<100 mlU/ml)

## 3.2. Analyse der B-Zell Differenzierung



**Abbildung 4: Relativer Anteil unterschiedlicher Gedächtnis-B-Zell-Populationen bei Kontrollpersonen, heterozygoten *IGHD*-Variantenträgern sowie Familienmitgliedern ohne Variantennachweis.**

Dargestellt ist der relative Anteil IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> sowie IgA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen an CD19<sup>+</sup> B-Zellen bei Kindern (a-d) und Erwachsenen (e-h) der Familie W17 sowie altersentsprechenden Kontrollpersonen (Erwachsene 25-35 Jahre, Kinder 3-7 Jahre).

○ gesund (weder erkrankt noch Variantenträger)

□ erkrankt

● gesund und heterozygoter Variantenträger

■ erkrankt und heterozygoter Variantenträger

--- 10.- 90. Perzentile der abgebildeten gesunden Kontrollpersonen

Da die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante in der untersuchten Familie nicht mit einem klinischen Phänotyp oder eine Störung auf Ebene der Immunglobulinpiegel assoziiert zu sein schien, untersuchten wir anschließend die nächst tiefere

Ebene, nämlich ob die Variante mit einer gestörten Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen einhergeht.

Es wurde durchflusszytometrisch der Anteil von Gedächtnis-B-Zellen (charakterisiert durch die Expression von CD27<sup>+</sup>) mit der Expression des membranständigen Immunglobulins IgM (IgM<sup>+</sup>) sowie ohne Expression von IgM (IgM<sup>-</sup>), aber IgG (IgG<sup>+</sup>) oder IgA (IgA<sup>+</sup>) in Gesundkontrollen (Erwachsene und Kinder) analysiert und die 10.-90. Perzentile der Messwerte definiert. Zusätzlich wurde der Anteil o.g. Gedächtnis-B-Zellen bei den Familienmitgliedern (Kinder: III.1., III.2., III.3., III.4., III.5. und Erwachsene I.1., I.2., II.1., II.2., II.3., II.4) durchflusszytometrisch analysiert.

In der Abbildung 6 a-d wird ersichtlich, dass der relative Anteil aller untersuchten Gedächtnis-B-Zell-Populationen sowohl bei der Indexpatientin (III.3. ■) mit *IGHD*-Variantennachweis als auch bei dem erkrankten Bruder (III.2. □), der die Variante nicht trägt, unterhalb der 10. Perzentile lagen.

Der relative Anteil von IgA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen (klassengewechselt) der klinisch gesunden Schwester (III.1. ●) mit nachgewiesener *IGHD*-Variante zeigte sich hingegen nicht vermindert, sondern grenzwertig und der der anderen Gedächtnis-B-Zell-Population erhöht (siehe Abbildung 6).

In der Abbildung 6 e-h ist die Analyse der Gedächtnis-B-Zellen der erwachsenen Familienmitglieder (davon vier mit nachgewiesener *IGHD*-Variante) dargestellt.

Bei den heterozygoten *IGHD*-Variantenträgern (I.1; II.2; II.3. ●) zeigte sich der relative Anteil der unterschiedlichen Gedächtnis-B-Zellen bei fast allen untersuchten Personen zwischen der 10.-90. Perzentile. Allein beim Großvater väterlicher Seite der Indexpatientin (I.1.) fiel ein erhöhter Anteil von IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen auf. Der relative Anteil der Gedächtnis-B-Zellen der Großmutter väterlicher Seite der Patientin (I.2.) ohne nachgewiesene *IGHD*-Variante lag knapp unterhalb der 10. Perzentile. Zusätzlich zeigte sich ein verminderter relativer Anteil der IgA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen (klassengewechselt) bei der

Mutter der Indexpatientin (II.4.) ohne nachweisbare *IGHD*-Variante (Abbildung 6 e-g).

Zusammenfassend zeigt sich keine generelle B-Zell Differenzierungsstörung in Individuen mit *IGHD*-Variante. Der relative Anteil der Gedächtnis-B-Zellen der *IGHD*-Variante tragenden Indexpatientin (III.3.) und des Bruders (III.2.) ohne Varianten-Nachweis sind in den durchflusszytometrischen Analysen (Abbildung 6 a-d) unterhalb der 10. Perzentile, was charakteristisch für das Krankheitsbild des CVID ist, welches durch eine Störung der B-Zell Differenzierung hervorgerufen wird.

### 3.3. Immunglobulin-Repertoire Analyse

Wir haben uns als nächstes die Frage gestellt, ob die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante, welche zwar nicht mit einer Störung der Gedächtnis-B-Zell Differenzierung und Immunglobulinproduktion assoziiert ist, möglicherweise aber mit Veränderungen des Immunglobulin-Repertoires naiver B-Zellen einhergeht.

Deshalb untersuchten wir das Immunglobulin-Repertoire naiver IgD<sup>-</sup> B-Zellen von zwei Trägern der heterozygoten *IGHD*-Variante (siehe Abbildung 3: II.3; III.3.). Diese B-Zellen verwendeten das variante Allel („Mutante“). Verglichen wurde das Repertoire dieser Population mit IgD<sup>+</sup>B-Zellen des gleichen Individuums („Wildtyp“). Zusätzlich verglichen wir beide Populationen mit dem publizierten Immunglobulin-Repertoire IgD<sup>+</sup> naiver B-Zellen von gesunden Nichtfamilienmitgliedern (Kontrollen), welche nicht die heterozygote *IGHD*-Variante trugen (siehe Tabelle 16) (46-58).

Untersucht wurde das Immunglobulin-Repertoire von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> B-Zellen (transitionale B-Zellen, „CD10<sup>+</sup>“) und von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup> B-Zellen (reife, naive B-Zellen, „CD10<sup>-</sup>“).

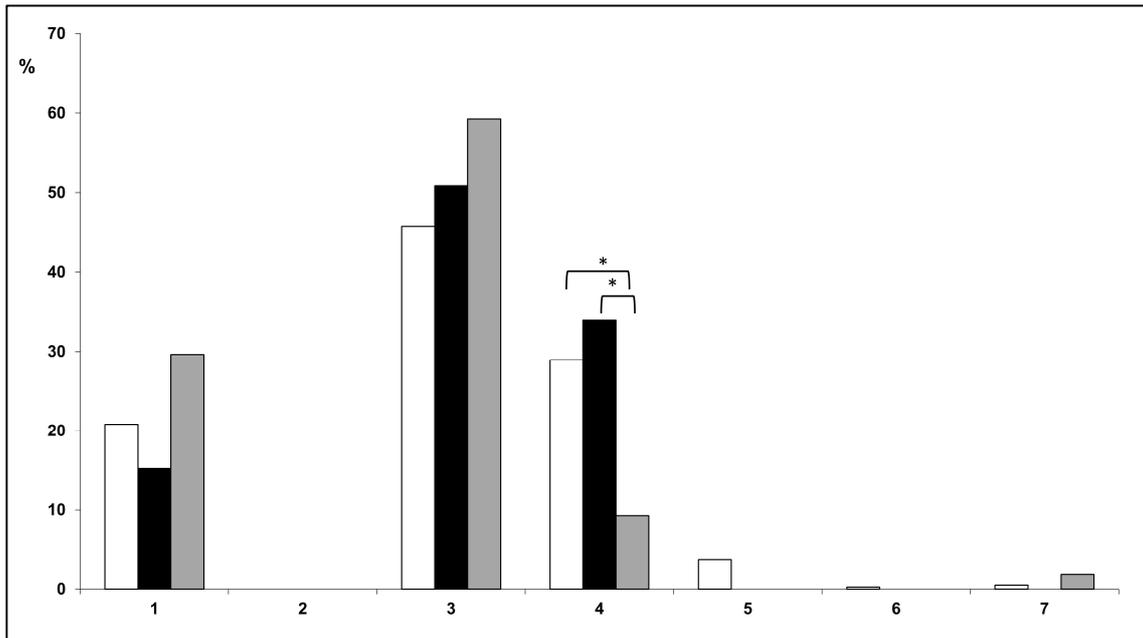
Verglichen wurde die Verwendung von VH-Familien, VH-Segmenten, DH-Segmenten, JH-Segmenten der schweren Kette des Immunglobulins sowie die CDR3-Länge der schweren Kette und deren positive/negative Ladung.

		<b>Kontrollen</b>	<b>II.3.</b>	<b>III.3.</b>
<b>Anzahl der untersuchten Sequenzen</b>	CD10 <sup>+</sup>	394	59	54
	CD10 <sup>-</sup>	397	64	53

**Tabelle 16: Anzahl der untersuchten Sequenzen für die Immunglobulin-Repertoire Analyse**

Dargestellt sind die Anzahl der untersuchten Immunglobulin-Sequenzen der Indexpatientin II.3. (siehe Abbildung 3) und des Vaters der Indexpatientin III.3. (siehe Abbildung 3) sowie publizierte Immunglobulin-Sequenzen von Gesundkontrollen (46-58) von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> B-Zellen (transitionale B-Zellen, „CD10<sup>+</sup>“) und CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> B-Zellen (reife, naive B-Zellen, „CD10<sup>-</sup>“), welche für die Immunglobulin-Repertoire Analyse verwendet wurden. Originalsequenzen der Individuen II.3. und III.3. (siehe Abschnitt 10.1. und 10.2.).

### 3.3.1. CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> transitionale B-Zellen



**Abbildung 5: Häufigkeit von VH-Familien in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von VH-Familien der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup>(Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup>(Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

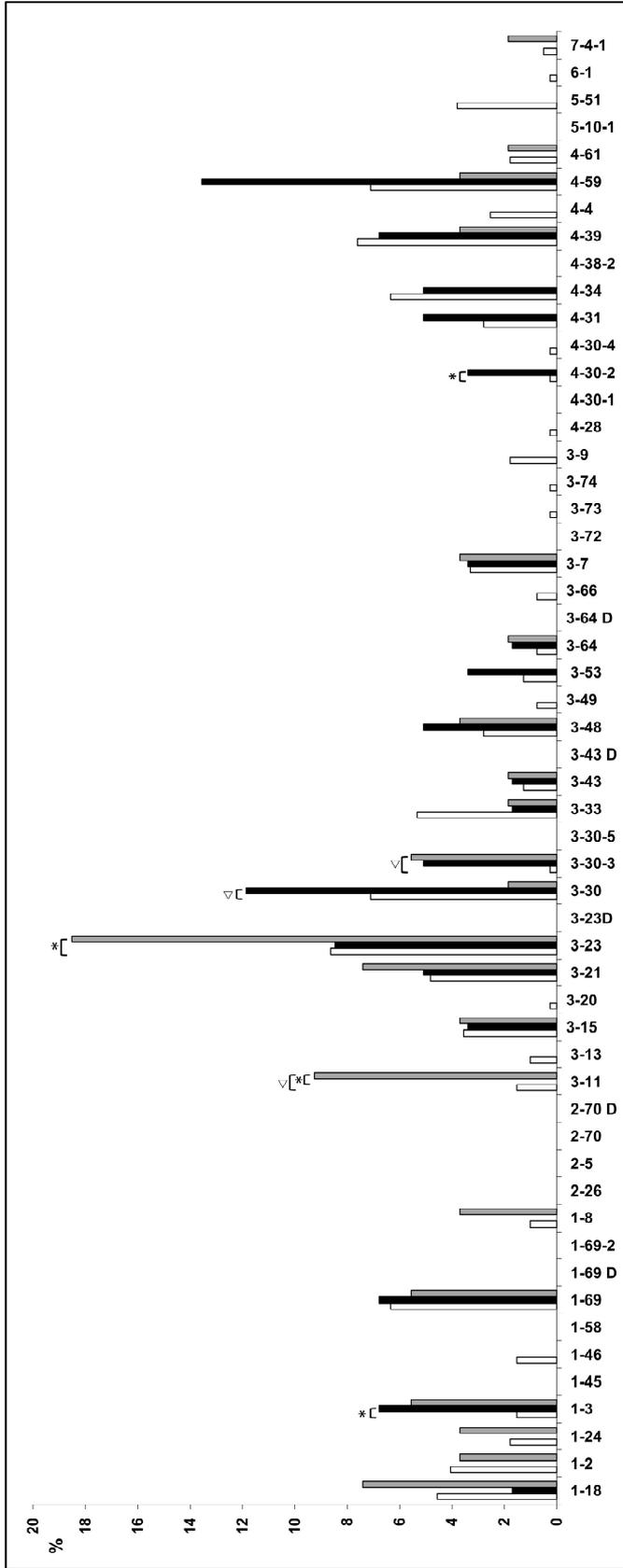
Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen VH-Familien in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), \* p ≤ 0,05,

Zunächst wurde die relative Häufigkeit der unterschiedlichen VH-Familien der schweren Kette in transitionalen B-Zellen bei IgD<sup>+</sup> B-Zellen von Kontrollen (Nichtvariantenträgern) und IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern sowie IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern verglichen.

Hier fiel auf, dass die VH-Familie 4 in IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zellen von Kontrollen signifikant erniedrigt (p=0,02) vorkommt.

Zusätzlich war die relative Häufigkeit der VH-Familie 4 in IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern signifikant erniedrigt (p= 0,03).



**Abbildung 6: Häufigkeit von VH-Segmenten in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von VH-Segmenten der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen VH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

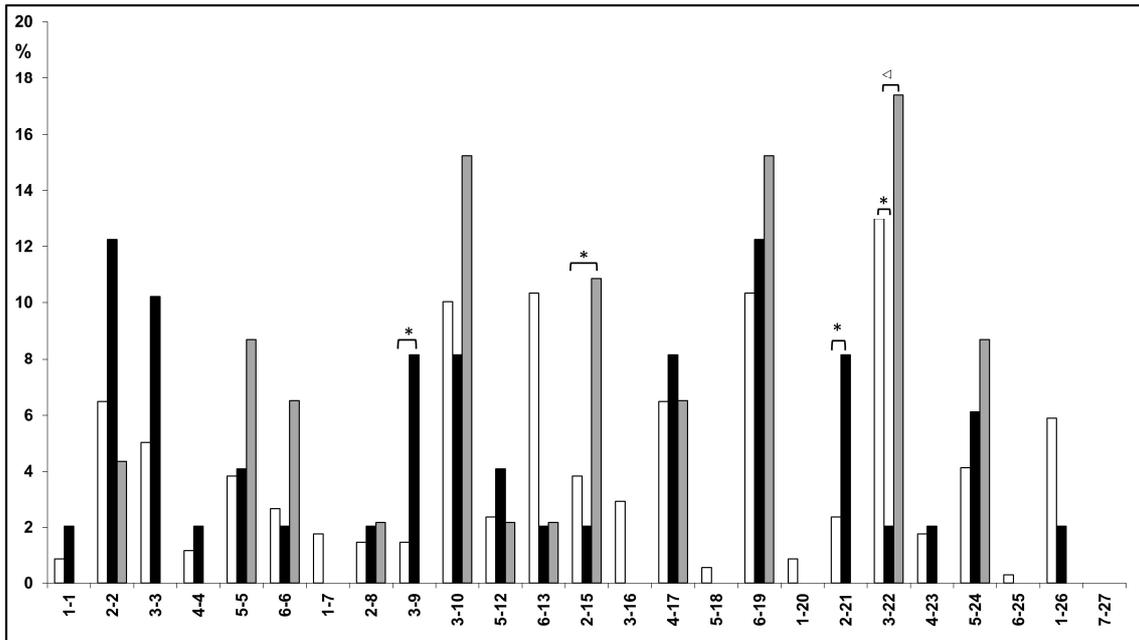
□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), \* p ≤ 0,05, < p ≤ 0,01

Als nächstes wurde die relative Häufigkeit von VH-Segmenten der schweren Kette in transitionalen B-Zellen analysiert.

Gezeigt werden konnte, dass sowohl das VH-Segment 1-3 ( $p=0,03$ ), VH-Segment 3-30 ( $p=0,01$ ) als auch das VH-Segment 4-30-2 ( $p=0,05$ ) in IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern im Vergleich zur IgD<sup>+</sup> Population der Kontrollen signifikant häufiger vorkommt.

In IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern wurde eine vermehrte Häufigkeit der VH-Segmente 3-11 ( $p=0,005$ ), 3-23 ( $p=0,03$ ) und 3-30-3 ( $p=0,006$ ) im Vergleich zu Zellpopulationen der Kontrollen gezeigt.

Zwischen IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern und IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern zeigte sich lediglich eine Diskrepanz in der relativen Häufigkeit des VH-Segments 3-11 ( $p=0,02$ ) durch eine signifikante Erhöhung im Wildtyp.



**Abbildung 7: Häufigkeit von DH-Segmenten in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von DH-Segmenten der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

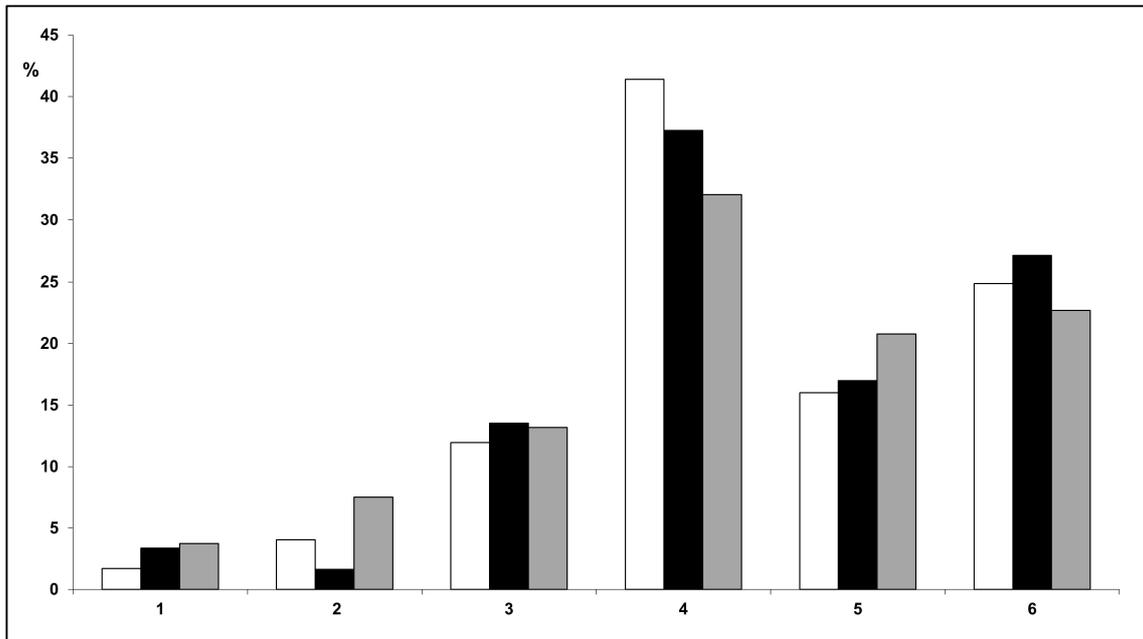
Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen DH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), \* p ≤ 0,05, ◁ p ≤ 0,01

Wir untersuchten anschließend die relative Häufigkeit der DH-Segmente in den Zellpopulationen. Auffällig war, dass die DH-Segmente 3-9 (p=0,02) und 2-21 (p=0,05) in IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) im Vergleich zu Populationen der Kontrollen signifikant erhöht vorkamen. Die relative Häufigkeit des DH-Segments 3-22 (p=0,02) ist im Vergleich zu der IgD<sup>+</sup> B-Zell-Population der Kontrollen beim Wildtyp signifikant erniedrigt.

In den IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern zeigte sich eine vermehrte relative Häufigkeit des DH-Segments 2-15 (p=0,05) im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zellen der Kontrollen.

Bei dem Vergleich der beiden B-Zell-Populationen von Variantenträgern zeigte sich in dem DH-Segment 3-22 ( $p=0,01$ ) bei IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) im Vergleich zu IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Wildtyp) eine signifikante Erhöhung der relativen Häufigkeit.



**Abbildung 8: Häufigkeit von JH-Segmenten in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

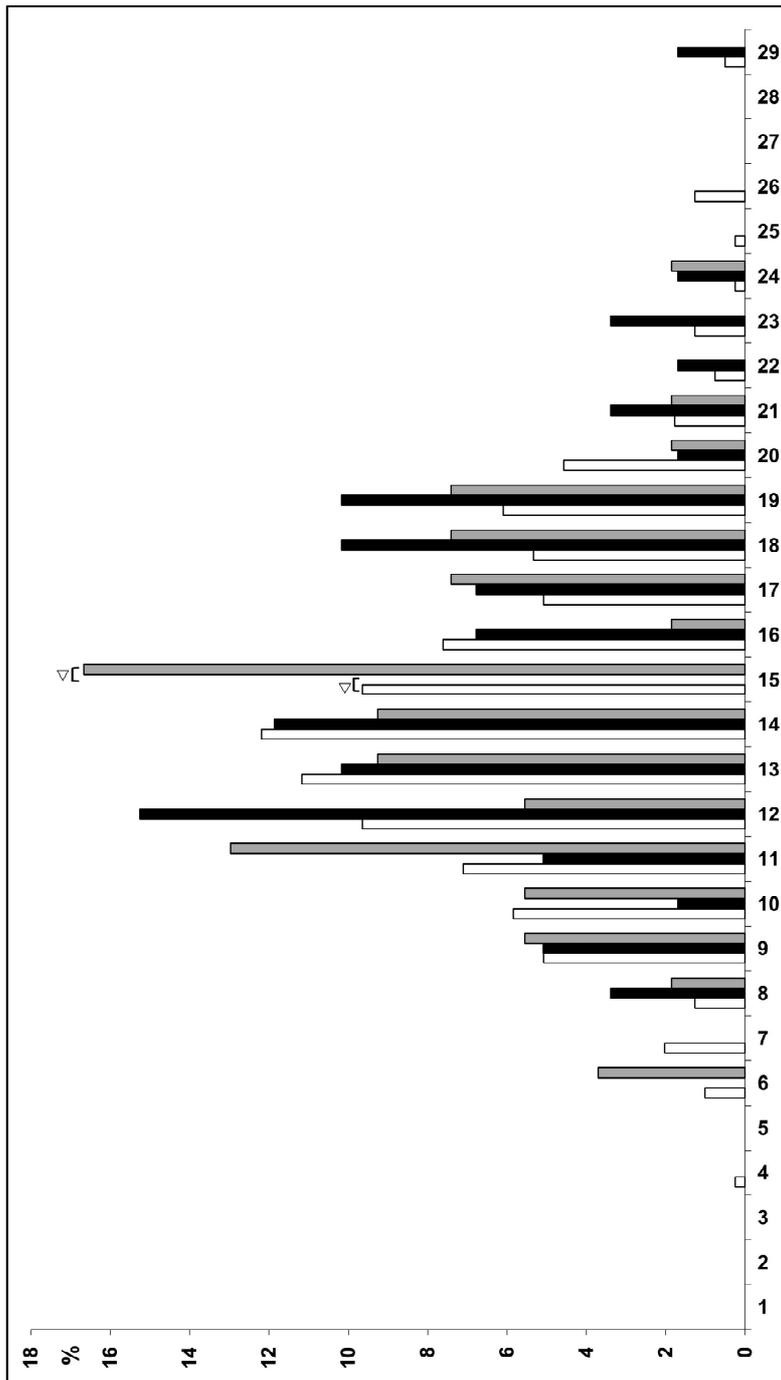
Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von JH-Segmenten der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen JH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen /IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante)

Des Weiteren wurden die relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen JH-Segmente verglichen.

Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied der relativen Häufigkeit der einzelnen Segmente zwischen IgD<sup>+</sup> B-Zellen von Nichtvariantenträgern (Kontrollen) und Zellpopulationen von Variantenträgern IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) und IgD<sup>-</sup> (Mutante).



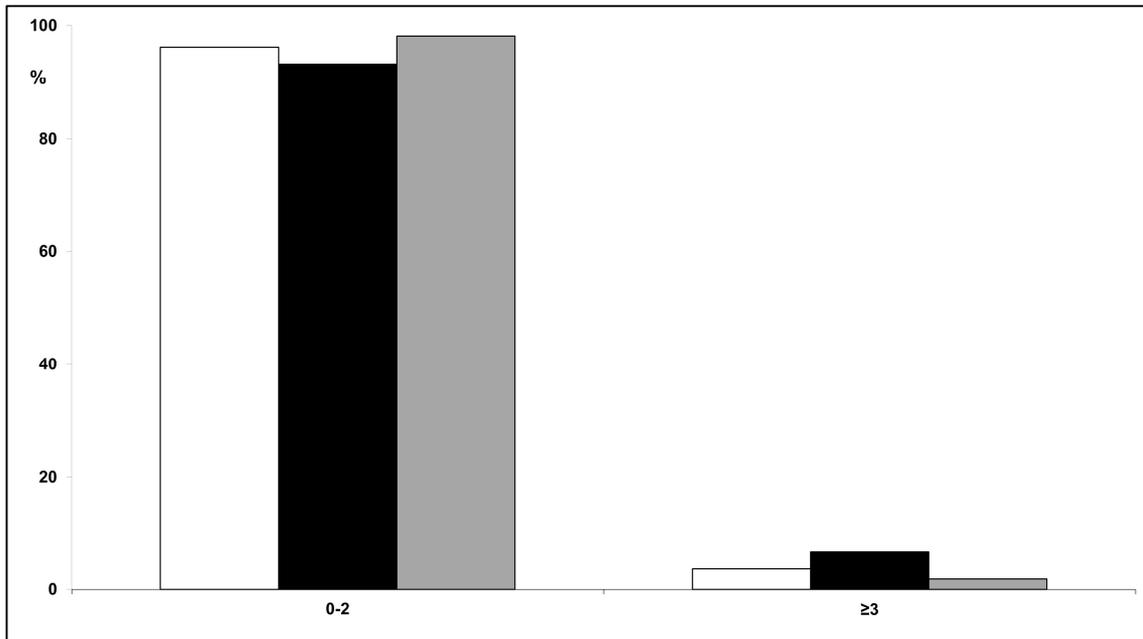
**Abbildung 9: Verteilung der CDR3-Längen in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Länge an Aminosäuren der *complementary determining region 3* (CDR3) der variablen Regionen der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante. Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen Längen der CDR3-Regionen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), ◁ p ≤ 0,01

Um die Analyse des Immunglobulin-Repertoires zu vervollständigen, untersuchten wir zusätzlich die CDR3-Längen der unterschiedlichen Populationen. Hier zeigte sich, dass die CDR3-Länge mit 15 Aminosäuren (p=0,009) in IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern signifikant weniger häufig vorkommt als in der IgD<sup>+</sup> B-Zell-Population der Kontrollen. In der Population der IgD<sup>-</sup> B-Zellen

(Mutante) von Variantenträgern zeigte sich hingegen eine signifikante Erhöhung der CDR3-Länge 15 ( $p=0,001$ ) im Vergleich zu  $IgD^+$  B-Zellen (Wildtyp) von Varianten-trägern.

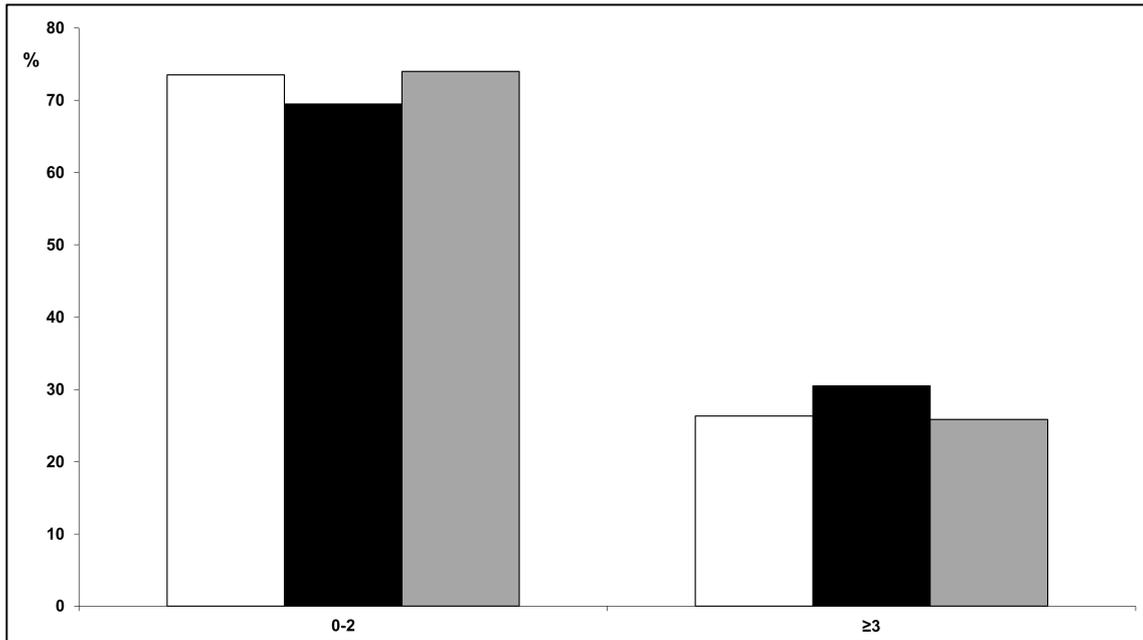


**Abbildung 10: Anzahl positiver Ladungen der CDR3-Region in  $CD10^+$  B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von Aminosäuren mit positiver Ladung innerhalb der CDR3-Region der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in  $IgD^+$  (Wildtyp) oder  $IgD^-$  (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen positiven Ladungen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/ $IgD^+$ / $IgD^-$ ) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/ $IgD^+$  (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/ $IgD^-$  (Mutante)



**Abbildung 11: Anzahl negativer Ladungen der CDR3-Region in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von Aminosäuren mit negativer Ladung innerhalb der CDR3-Region der schweren Kette in transitionalen B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen negativen Ladungen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

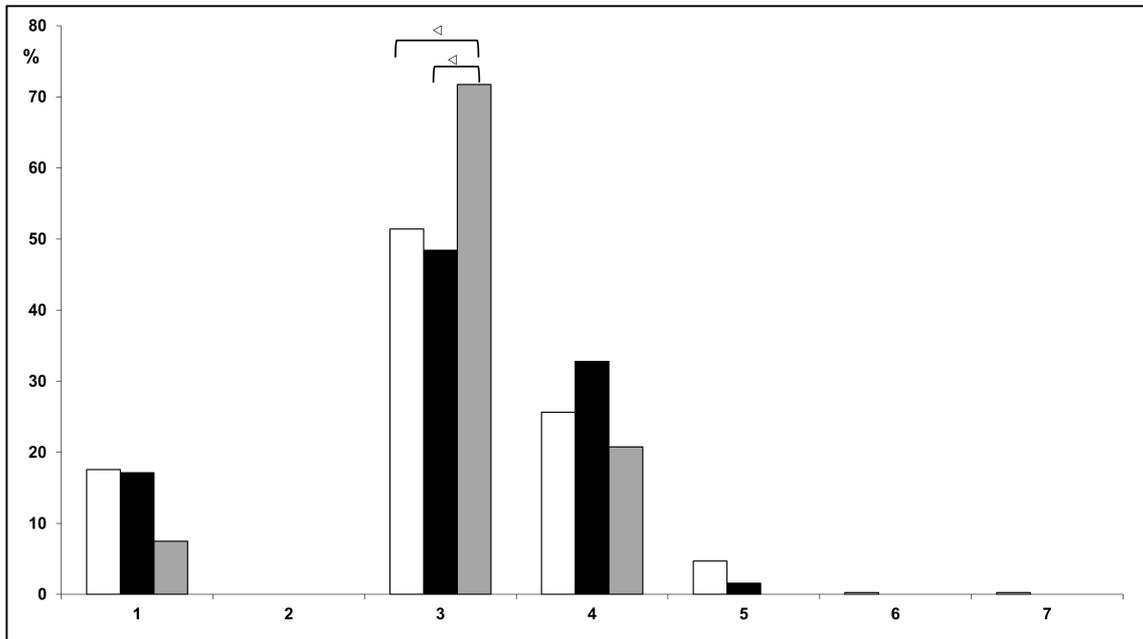
□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante)

Abschließend wurden zur Analyse des Immunglobulin-Repertoires der transitionalen B-Zellen positive und negative Ladungen der CDR3-Region innerhalb der unterschiedlichen Populationen verglichen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Häufigkeit in den unterschiedlichen Zellpopulationen von Variantenträgern und Nicht-variantenträgern sowohl bei positiven als auch negativen Ladungen der CDR3-Region.

### 3.3.2. CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup> reife, naive B-Zellen

Im nächsten Schritt erfolgte die Immunglobulin-Repertoire Analyse von reifen, naiven B-Zellen der unterschiedlichen Zellpopulationen.



**Abbildung 12: Häufigkeit von VH-Familien in CD10<sup>-</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von VH-Familien der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup>(Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup>(Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

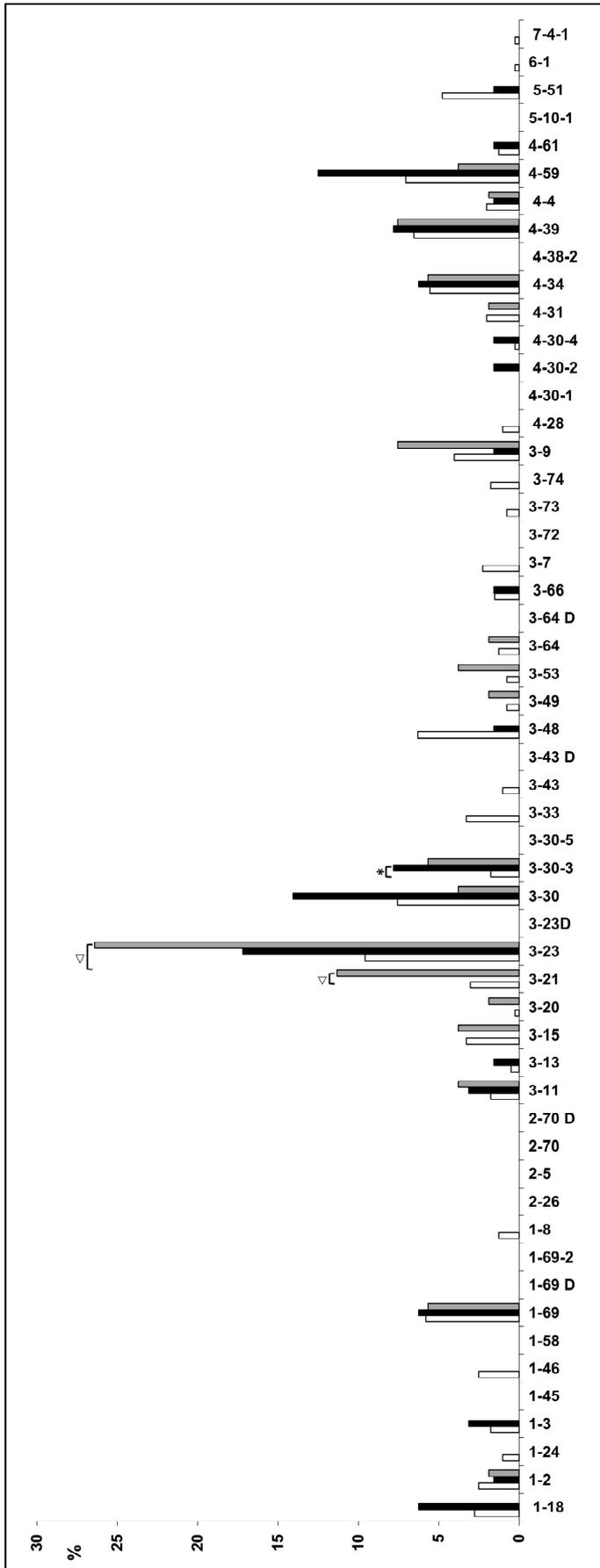
Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen VH-Familien in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), < p ≤ 0,01

Äquivalent zur Repertoire-Analyse transitionaler B-Zellen wurden zunächst die VH-Familien, diesmal in reifen, naiven B-Zellen, der unterschiedlichen Populationen verglichen.

Signifikant war, dass sich die relative Häufigkeit der VH-Familie 3 (p=0,01) der IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zu der IgD<sup>+</sup> B-Zell-Population der Kontrollen erniedrigt darstellt.

Ebenso kam die VH-Familie 3 (p=0,01) in IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern wesentlich häufiger vor, als in der Wildtyp-Population.



**Abbildung 13: Häufigkeit von VH-Segmenten in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von VH-Segmenten der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen VH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

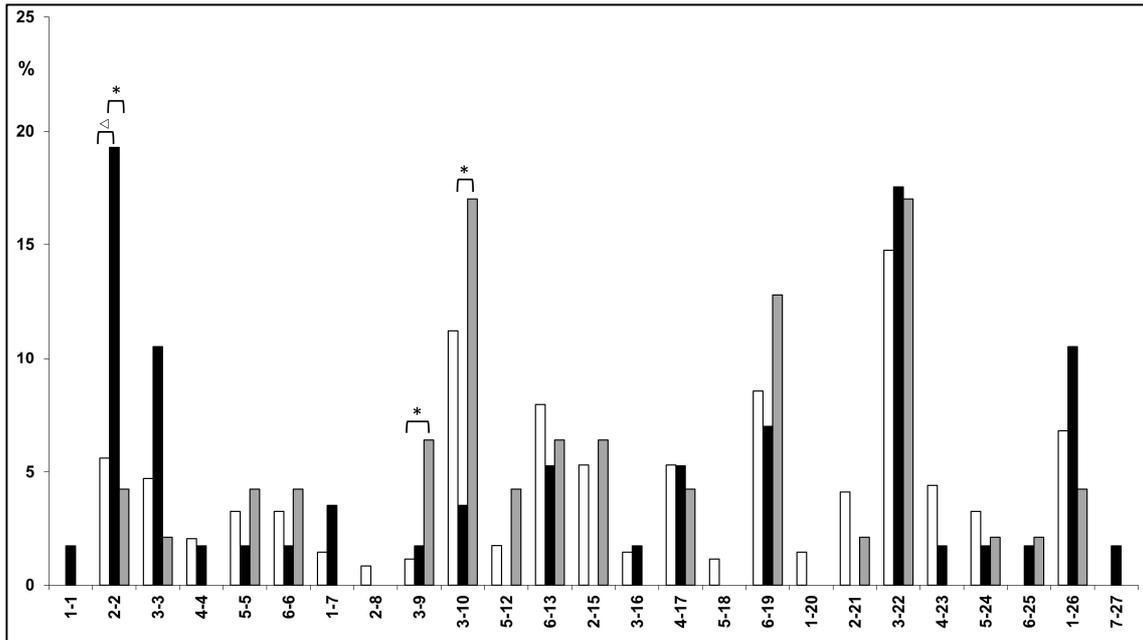
□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), \* p ≤ 0,05, ∇ p ≤ 0,01

Anschließend wurde die Verwendung von einzelnen VH-Segmenten in den unterschiedlichen Populationen verglichen.

In der IgD<sup>-</sup> B-Zell-Population (Mutante) von Variantenträgern war die relative Häufigkeit des VH-Segments 3-21 ( $p=0,01$ ) im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern erhöht.

Die relative Häufigkeit des VH-Segments 3-23 ( $p=0,001$ ) der IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern war im Vergleich zu den IgD<sup>+</sup> B-Zell-Populationen der Kontrollen erhöht.

Zusätzlich war die Häufigkeit des VH-Segments 3-30-3 ( $p=0,02$ ) von IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) im Vergleich zu der IgD<sup>+</sup> B-Zell-Population der Kontrollen erhöht.



**Abbildung 14: Häufigkeit von DH-Segmenten in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von DH-Segmenten der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen DH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante), \* p ≤ 0,05,

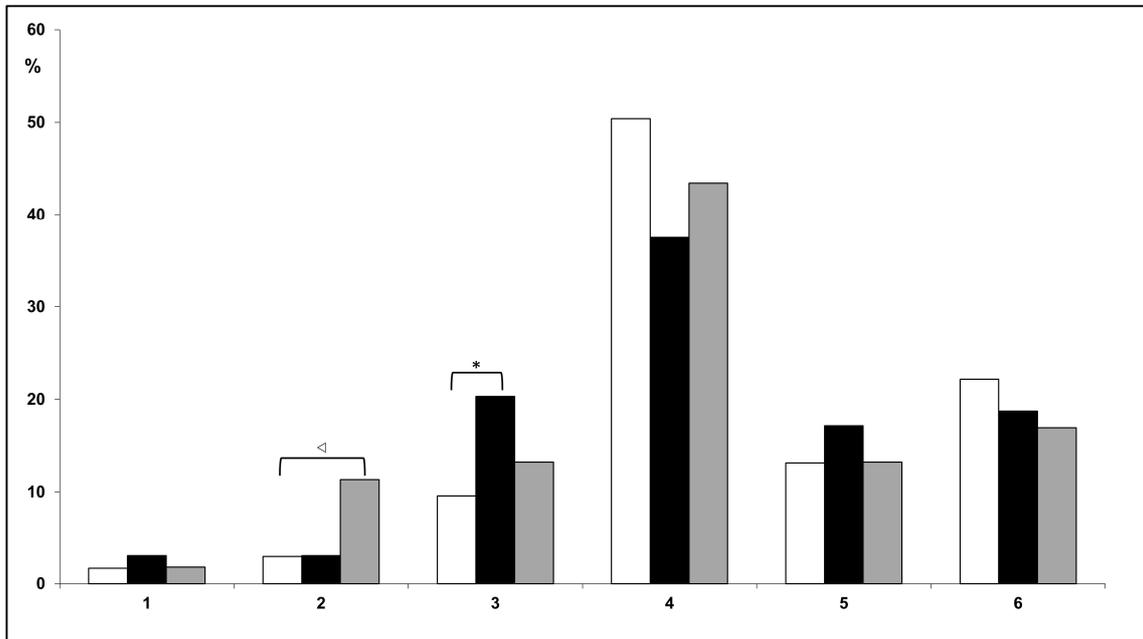
◁ p ≤ 0,01

Wir analysierten anschließend die relative Häufigkeit von DH-Segmenten in den unterschiedlichen Populationen.

Die relative Häufigkeit des DH-Segments 2-2 (p=0,001) in IgD<sup>+</sup> B-Zell-Populationen (Wildtyp) von Variantenträgern war im Vergleich zu der IgD<sup>+</sup> B-Zell-Population der Kontrollen erhöht. Zusätzlich ist die Häufigkeit dieses Segments in IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern signifikant erniedrigt (p=0,03).

Das DH-Segment 3-9 (p=0,04) der IgD<sup>-</sup> B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern ist im Vergleich zu Zellpopulationen der Kontrollen in seiner Häufigkeit erhöht.

Des Weiteren war auffällig, dass das DH-Segment 3-10 ( $p=0,04$ ) in den  $IgD^-$  B-Zell-Populationen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zur  $IgD^+$  B-Zell-Population (Wildtyp) von Variantenträgern, gehäuft vorkommt.



**Abbildung 15: Häufigkeit von JH-Segmenten in  $CD10^+$  B-Zellen**

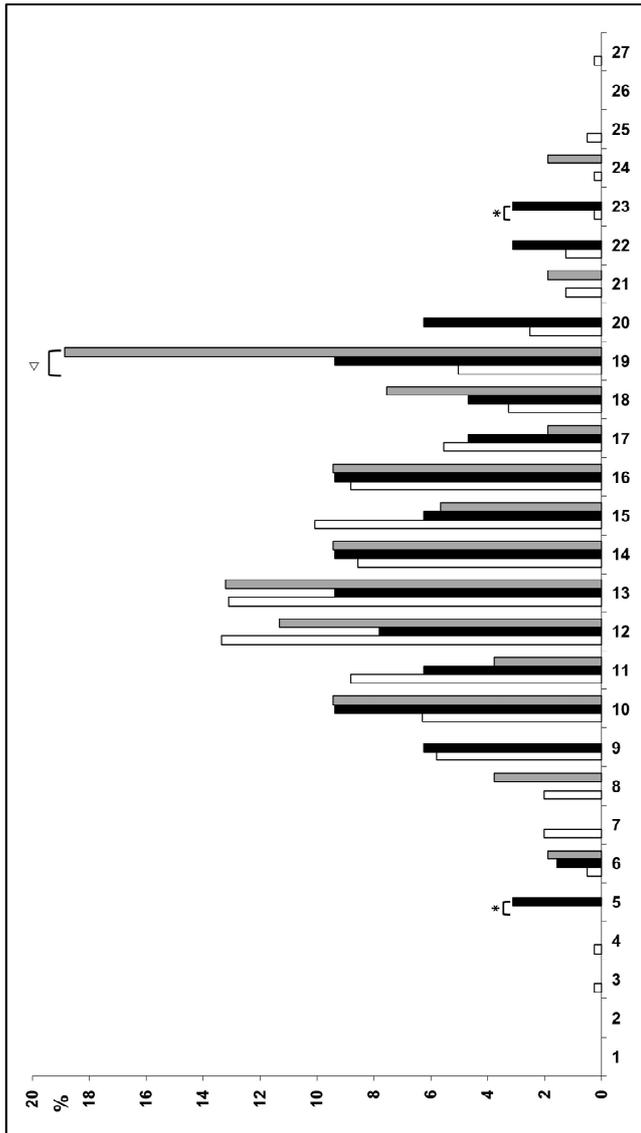
Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von JH-Segmenten der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in  $IgD^+$  (Wildtyp) oder  $IgD^-$  (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen JH-Segmente in verschiedenen Populationen (Kontrollen/ $IgD^+$ / $IgD^-$ ) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/ $IgD^+$  (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/ $IgD^-$  (Mutante), \*  $p \leq 0,05$ ,  
 $\triangleleft p \leq 0,01$

Auffällig bei der Analyse der JH-Segmente zeigte sich das Segment 2 ( $p=0,01$ ), welches in  $IgD^-$  B-Zellen (Mutante) von Variantenträgern im Vergleich zur  $IgD^+$  Population der Kontrollen in seiner Häufigkeit erhöht war.

Weiterhin zeigte sich eine vermehrte relative Häufigkeit im JH-Segment 3 in  $IgD^+$  B-Zellen (Wildtyp) von Variantenträgern im Vergleich zu  $IgD^+$  B-Zellen der Kontrollen ( $p= 0,02$ ).



**Abbildung 16: Verteilung der CDR3-Längen in CD10+ B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Länge an Aminosäuren der *complementary determining region 3* (CDR3) der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD+ (Wildtyp) oder IgD- (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen Längen der CDR3-Regionen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD+/IgD-) mittels Fisher exact test.

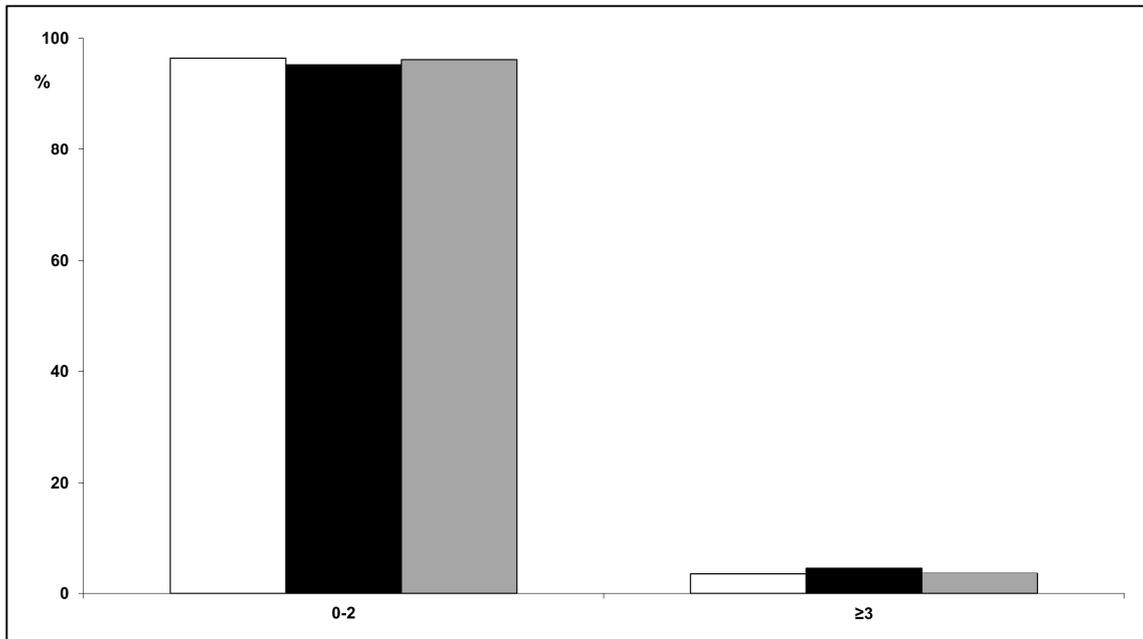
□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD+ (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD- (Mutante), \* p ≤ 0,05,

▽ p ≤ 0,01

Zusätzlich zu den Segmenten wurden die CDR3-Längen der unterschiedlichen Populationen verglichen.

In der Analyse zeigte sich, dass sowohl die CDR3-Länge mit 5 Aminosäuren (p=0,02) als auch die CDR3-Länge mit 23 Aminosäuren (p=0,05), signifikant häufiger bei IgD+ B-Zell-Populationen vom Wildtyp vorkommt verglichen mit Populationen der Kontrollen.

Außerdem konnte in der CDR3-Länge mit 19 Aminosäuren ( $p=0,001$ ) der IgD<sup>-</sup> B-Zell-Population (Mutante) von Variantenträgern eine erhöhte Häufigkeit im Vergleich zu IgD<sup>+</sup> B-Zell-Populationen der Kontrollen beobachtet werden.

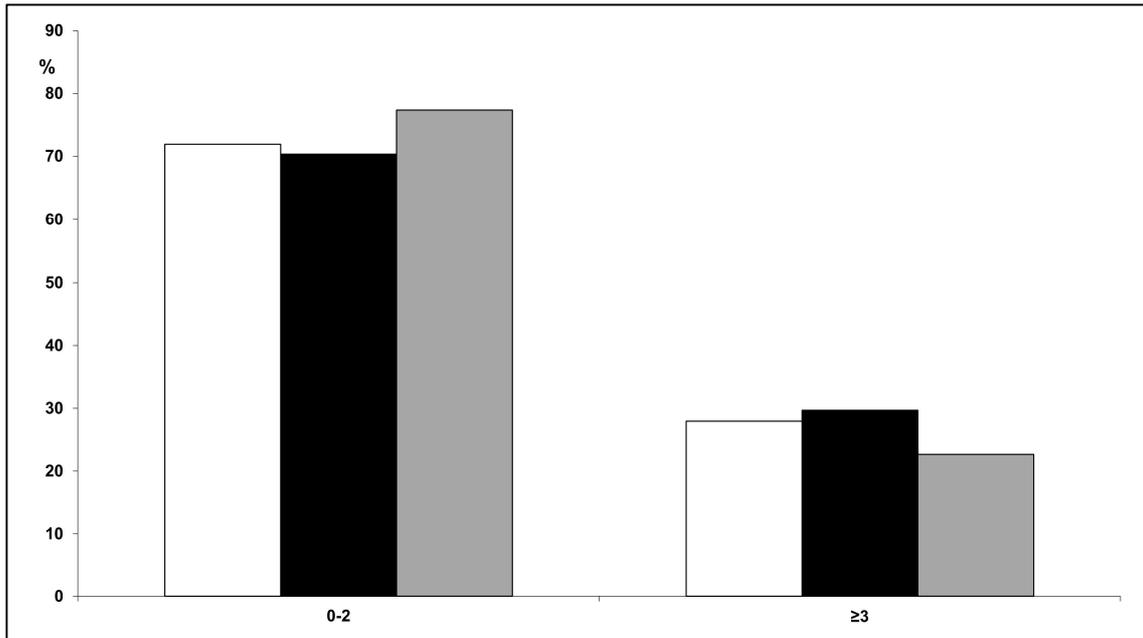


**Abbildung 17: Anzahl positiver Ladungen der CDR3-Region in CD10<sup>-</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von Aminosäuren mit positiver Ladung innerhalb der CDR3-Region der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup>(Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup>(Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen positiven Ladungen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante)



**Abbildung 18: Anzahl negativer Ladungen der CDR3-Region in CD10<sup>+</sup> B-Zellen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Verwendung von Aminosäuren mit negativer Ladung der CDR3-Region der schweren Kette in reifen, naiven B-Zellen von Individuen ohne *IGHD*-Variante bzw. in IgD<sup>+</sup> (Wildtyp) oder IgD<sup>-</sup> (Mutante) B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante.

Verglichen wurde die Häufigkeit der unterschiedlichen positiven Ladungen in verschiedenen Populationen (Kontrollen/IgD<sup>+</sup>/ IgD<sup>-</sup>) mittels Fisher exact test.

□ Kontrollen, ■ *IGHD*-Variante/IgD<sup>+</sup> (Wildtyp), ▒ *IGHD*-Variante/IgD<sup>-</sup> (Mutante)

Abschließend wurden sowohl positive als auch negative Ladungen der CDR3-Regionen in den unterschiedlichen Zellpopulationen von Variantenträgern und Nichtvariantenträgern verglichen. Äquivalent zu der Analyse in transitionalen B-Zellen zeigte sich auch in den naiven, reifen B-Zellen kein signifikanter Unterschied der relativen Häufigkeit der Ladungen der CDR3-Regionen in den unterschiedlichen Populationen.

#### 4. Diskussion

B-Zellen sind neben T-Zellen die zellulären Träger des adaptiven Immunsystems und für die Aufrechterhaltung humoraler Immunität verantwortlich. Die Entwicklung der B-Zelle im Knochenmark und ihre Differenzierung in der Peripherie werden wesentlich durch die Expression eines membranständigen BZR bestimmt. Störungen der B-Zell Entwicklung und Differenzierung durch eine defekte BZR-Signalgebung können primären oder sekundären Immundefekte mit vorwiegendem Antikörpermangel zu Grunde liegen (7;8).

B-Zellen zeigen während ihrer Entwicklung von der unreifen B-Zelle im Knochenmark hin zur reifen, naiven B-Zelle eine differentielle Expression von IgM und IgD, wobei reife, naive B-Zellen sowohl BZR der Isotypen IgM als auch IgD auf ihrer Oberfläche exprimieren (8).

In der Vergangenheit wurde bereits die Bedeutung des membranständigen IgD hinsichtlich der B-Zell Entwicklung, Aktivierung, Differenzierung und deren Antikörperproduktion im Mausmodell sowie in *in vitro* Zellkulturmodellen analysiert. Hier konnte verdeutlicht werden, dass IgD die Funktion von IgM im Rahmen der frühen B-Zell Entwicklung ersetzen könnte. Zudem erschien eine Aktivierung der B-Zelle über IgD nicht essentiell notwendig für die Produktion spezifischer Antikörper (23;26-35).

Die membranständige Expression von IgD hat jedoch möglicherweise eine bedeutende Funktion für die Homöostase des naiven B-Zell-Kompartiments (28).

Es zeigte sich zudem, dass membranständiges IgD möglicherweise Auswirkungen auf die Qualität der Immunantwort durch die Produktion hochaffiner Antikörper habe (29).

Neben der Homöostase des naiven B-Zell-Kompartiments und der Vermittlung der Sekretion hochaffiner Antikörper spielt die Expression von IgD auf B-Zellen möglicherweise auch eine wichtige Rolle in der Toleranzinduktion von autoreaktiven B-Zellen. Anergie B-Zellen sind durch eine Herunterregulierung von IgM bei jedoch gleichbleibender IgD-Expression charakterisiert (23).

Untersuchungen in Zellkulturmodellen, knock-out bzw. transgenen Mausmodellen zeigten, dass der Anergie-Status einer B-Zelle jedoch sowohl von einem IgM-Rezeptor-Molekül als auch von einem IgD-Rezeptor-Molekül ausgelöst werden kann. Interessanterweise scheint IgD jedoch das Ausmaß, des über den IgM induzierten Anergiezustand einer B-Zelle, zu minimieren (31;33). Zudem wurde vermutet, dass die Expression des IgD-BZR einen Überlebensvorteil für anerge B-Zellen vermittele (33).

Diese Experimente sowie die Beobachtung, dass zu IgD klassengewechselte B-Zellen vermehrt autoreaktiv sind (27), legt die Vermutung einer Funktion von membranständigen IgD für die Toleranzentwicklung von B-Zellen nahe.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen in Zellkultur- und Mausmodellen ist die Funktion von IgD auf B-Zellen im menschlichen Organismus bislang jedoch nur unzureichend verstanden.

Patienten mit monogenen Erkrankungen des Immunsystems (Primäre Immundefekte) können als Modelle zur Untersuchung des Immunsystems dienen und wichtige Einsichten in die Funktion des menschlichen Immunsystems geben (59).

In dieser Arbeit untersuchten wir die Familie einer an CVID erkrankten Indexpatientin, bei der eine heterozygote Variante im *IGHD*-Gen nachgewiesen wurde. Die Patientin zeigte eine chimäre Situation der IgD-Expression im naiven B-Zell-Kompartiment, wobei etwa die Hälfte der IgM<sup>+</sup> naiven B-Zellen IgD exprimierten und die anderen nicht.

Wir stellten uns die Frage, ob diese *IGHD*-Variante für den immunologischen und klinischen Phänotyp der Patientin ursächlich sein könnte. Zudem erschienen uns die heterozygoten Träger der *IGHD*-Variante mit der chimären IgD-Expression im naiven B-Zell-Kompartiment ein ideales Modell, um den Einfluss von IgD hinsichtlich der Entwicklung des präimmunen Immunglobulin-Repertoires beim Menschen untersuchen zu können.

#### 4.1. Bedeutung der *IGHD*-Variante für die Erkrankung der Indexpatientin

Die heterozygote p.Pro6Leu *IGHD*-Variante wurde insgesamt bei fünf Individuen aus drei Generationen der Familie W17 nachgewiesen. Neben der Indexpatientin konnte die *IGHD*-Variante bei vier weiteren Familienmitgliedern nachgewiesen werden, die zwar alle eine chimäre Expression von IgD im naiven B-Zell-Kompartiment aufwiesen, jedoch keine klinischen oder immunologischen Zeichen eines Antikörpermangels (CVID) zeigten. Bemerkenswert war, dass bei dem Bruder der Indexpatientin (siehe Abbildung 3, III.2.) keine *IGHD*-Variante nachgewiesen worden ist - trotz des Bestehens eines CVID.

Die klinische Manifestation dieses Patienten ist weitgehend identisch zur Indexpatientin (siehe Abbildung 3, III.3.). Es scheint so, dass die nachgewiesene heterozygote *IGHD*-Variante in dieser Familie nicht oder nur sehr unvollständig mit dem klinischen Phänotyp „CVID“ korreliert.

Es könnte vermutet werden, dass die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante nur teilweise mit der Erkrankung assoziiert ist und somit eine variable Penetranz des immunologischen Phänotyps in der Familie vorliegt.

Eine möglicherweise vergleichbare Konstellation hinsichtlich einer nicht vollständigen Assoziation und variablen Penetranz einer genetischen Variante und dem Auftreten eines CVID stellen unterschiedliche Varianten im *TNFRSF13B-Gen* dar, welches für den Zytokin-Rezeptor TACI kodiert (41;60;61). Hier wurden non-sense, frameshift oder missense Varianten beschrieben, wobei Letztere am häufigsten vorkommen (43;62). TACI-Varianten finden sich als eine der häufigsten genetischen Varianten bei ca. 10% aller CVID-Patienten, jedoch auch bei ca. 1% gesunder Individuen (42;43;63-66). Es handelt sich meistens um monoallelische Varianten, wobei ein biallelisches Vorkommen auch beschrieben wird (67). Der assoziierte Phänotyp CVID kann entweder autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv vererbt werden, wobei der autosomal-dominante Erbgang überwiegt (42;43). Homozygote Varianten gelten immer als krankheitsauslösend und finden sich bei Gesunden sehr wahrscheinlich nicht. Das Vorliegen von Varianten im heterozygoten Status geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer

Hypogammaglobulinämie, der phänotypischen Manifestation eines CVID sowie dem vermehrten Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Lymphadenopathien einher (67).

Somit scheint bei den TACI-Varianten hinsichtlich des Auftretens eines CVID ein Gendosisdefekt vorzuliegen, jedoch kann allein das Vorliegen einer heterozygoten Variante ein Risikofaktor für die Krankheitsentstehung sein. Die Gendosis (heterozygot versus homozygot/compound-heterozygot) scheint zudem den klinischen Phänotyp zu beeinflussen, da Autoimmunphänomene vorwiegend bei heterozygoten Trägern beobachtet werden (62;67).

Vermutlich führen TACI-Varianten nicht zwangsläufig zu dem Phänotyp CVID, sondern gehen mit einer variablen Penetranz einher, da nicht alle Variantenträger erkrankt sind und den für einen CVID-typischen Phänotyp mit vermehrten Infektionen zeigen (41;42;63;68;69).

Erklären könnte man die variable Penetranz durch zusätzliche und bisher unbekannte genetische Varianten und-/oder Umweltfaktoren (43). Ein gleicher Erklärungsversuch könnte auch für die Auswirkung der p.ProLeu6 *IGHD*-Variante hinsichtlich des Phänotyps CVID in der hier untersuchten Familie angewendet werden.

Einschränkend zu der obigen Aussage bezüglich der möglicherweise variablen Penetranz der *IGHD*-Variante muss auf die nur geringe Anzahl untersuchter Variantenträger in der untersuchten Familie (n=5) hingewiesen werden. Eine Identifizierung und immunologische/klinische Untersuchung weiterer Variantenträger könnte hier weiteren Aufschluss bezüglich der diskutierten Fragestellung ergeben. In der *ExAC*-Datenbank, in der die Datensätze einer whole-exome Sequenzierung von etwa 60.000 Individuen abgelegt sind, befindet sich jedoch nur ein weiteres Individuum, bei dem die gleiche *IGHD*-Variante im heterozygoten Status nachgewiesen werden konnte (<http://exac.broadinstitute.org/variant/14-106311995-G-A>, Zugriffsdatum: 04.02.2019). Die Allelfrequenz beträgt somit 1:119.784 und die Prävalenz heterozygoter Träger 1:59.892. Die Prävalenz eines CVID wird mit 1:25.000-1:50.000 (70) angegeben, sodass die *IGHD*-Variante in der Bevölkerung eine

insgesamt sehr seltene Variante darstellt und wenn überhaupt nur bei sehr wenigen Patienten mit CVID vorzukommen scheint.

Eine genetische Untersuchung von größeren CVID-Kohorten könnte darüber Aufschluss geben, ob diese Variante zumindest einen partiellen Risikofaktor für die Entstehung eines CVID darstellen könnte.

Hinsichtlich der Zuschreibung einer Kausalität zwischen einer genetischen Variante und einem klinischen Phänotyp ist Vorsicht geboten. Deshalb ist der Begriff „Mutation“ vor allem definitiv krankheitsauslösenden Genvarianten vorbehalten. Dadurch, dass sowohl die TACI-Varianten als auch die p.ProLeu6 *IGHD*-Variante im Gegensatz zu einer Mutation, nicht als unmittelbar krankheitsauslösend gelten, verwenden wir in dieser Arbeit den neutralen Begriff Variante (63;71).

Die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante wurde in der hier untersuchten Familie bei allen Trägern im heterozygoten Zustand nachgewiesen. Wie zuvor diskutiert, sprechen die Untersuchungen nicht für einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Variante und dem klinischen Phänotyp CVID. Sollte dennoch ein kausaler Zusammenhang bestehen, stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus eine „nur“ im heterozygoten Zustand vorliegende Genvariante den immunologischen oder klinischen Phänotyp auslösen könnte.

Ein möglicher molekularer Mechanismus wäre z.B. der dominant-negative Effekt. Dieser kommt insbesondere zum Tragen, wenn das betreffende Allel für ein Protein kodiert, das in einem Multimerkomplex vorkommt. Hierbei kommt es bei heterozygoten Mutationsträgern zu einer Hemmung der darin befindlichen Wildtyp-Proteine durch Einfügen eines veränderten Proteins in einen Multimerkomplex und resultierend zu einer veränderten Gesamtfunktion des Proteins (72). Dieser Mechanismus ist bei CVID bei einzelnen TACI-Varianten sowie beim Autoimmun-Lymphproliferativen Syndrom (ALPS) bei Varianten im FAS-Gen beschrieben (61;73-76).

Dieser Mechanismus spielt in der vorliegenden Arbeit jedoch möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle, da B-Zellen jeweils nur ein für den BZR kodierendes Allel aufgrund des Mechanismus der allelischen Exklusion exprimieren (24).

In den B-Zellen bei den p.Pro6Leu *IGHD*-Variantenträgern wird nämlich entweder das Wildtyp-Allel oder das mutierte Allel exprimiert.

Ein weiterer Mechanismus, wie eine heterozygot vorliegende Genvariante einen Phänotyp auslösen kann, wäre z.B. die Haploinsuffizienz. Diese wurde u.a. bei CVID für die bestimmte TACI-Variante und bei ALPS für bestimmte FAS-Varianten beschrieben (60;61;77-79). Über das einfach vorkommende Wildtyp-Allel kann im Vergleich zur Konstellation mit dem zweifach vorkommenden Wildtyp-Allel keine ausreichende Proteinmenge produziert werden, sodass es hierüber zur Manifestation des Phänotyps kommt (80).

In dieser Arbeit wurde untersucht, auf welcher Ebene der B-Zell Differenzierung und Funktion eine IgD-Haploinsuffizienz bei heterozygoten p.Pro6Leu *IGHD*-Variantenträgern einen Phänotyp verursachen könnte:

Auf Ebene der einzelnen naiven B-Zellen kann keine haploinsuffiziente Konstellation nachgewiesen werden, da die individuelle B-Zelle aufgrund des Mechanismus der allelischen Exklusion entweder das Wildtyp-Allel oder das mutierte Allel verwendet und damit entweder membranständiges IgD exprimiert oder nicht („Chimäre Situation“) (24). Auf Ebene der naiven B-Zellen zeigten sich Zeichen einer Haploinsuffizienz, da im Vergleich zu Gesundkontrollen entweder eine normal starke oder gar keine Expression zu verzeichnen war - das heißt etwa die Hälfte der B-Zellen exprimierten kein IgD. Auf Ebene der Gedächtnis-B-Zellen zeigte sich in den verschiedenen Gedächtnis-Populationen zumindest kein Hinweis auf eine haploinsuffiziente Konstellation, da keine Verminderung der Gedächtnis-B-Zellen mit einem heterozygoten Trägertum der *IGHD*-Variante assoziiert werden konnte. Auf Ebene der sezernierten Antikörper (=Serumimmunglobulin-Spiegel und Impfantikörper) konnte auch keine

haploinsuffiziente Situation festgestellt werden, da keinen quantitativen und qualitativen Veränderungen bei den Variantenträgern (mit Ausnahme der Indexpatientin) bestanden.

Zusammenfassend lässt sich demnach keine eindeutige Assoziation der *IGHD*-Variante mit einem klinischen Phänotyp nachweisen. Vermutlich stellt die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante allenfalls eine Variante mit einer variablen Penetranz des Phänotyps CVID dar, welche z.B. durch bisher unbekannte Umweltfaktoren oder weitere genetische Varianten zu einem Phänotyp führen kann.

Parallel zur Erstellung dieser Arbeit publizierte eine andere Arbeitsgruppe die genetische, immunologische und klinische Charakterisierung von vier Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante. Anstelle von Tryptophan an Position 123 resultiert aus der c.368G>A nonsense Variante ein Stopcodon (p.W123X) (81).

Untersucht wurden die Verteilungen sowohl transitionaler, reifer/naiver B-Zellen sowie Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. Die untersuchten B-Zellen der IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> Population zeigten keine Auffälligkeiten bzgl. der B-Zell Entwicklung und Differenzierung - auch wurden keine Anzeichen einer Immundefizienz bei untersuchten Variantenträgern festgestellt (81).

#### 4.1.2. Wertung der Daten / kritische Reflexion

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die bei der Indexpatientin detektierte p.Pro6Leu *IGHD*-Variante in der betreffenden Familie bei anderen Individuen vorkommt und ob diese mit einer Störung der Immunglobulinproduktion oder sogar mit dem Auftreten einer Erkrankung (CVID) einhergeht.

Wie schon zuvor diskutiert, kann zwar sicher vermutet werden, dass die Variante in der Familie nicht direkt kausal mit der Erkrankung CVID in Verbindung steht. Da die Anzahl der gefundenen Variantenträger (n=5) jedoch recht gering ist, kann deshalb nicht sicher beurteilt werden, ob die Variante ein mögliches Risiko für die Entstehung eines CVID ist. Hierzu müssten größere CVID-

Patientenkohorten untersucht werden. Es war zudem versucht worden, zu untersuchen, ob die Variante in der Familie mit einer Störung der B-Zell Differenzierung hin zu Gedächtnis-B-Zellen einhergeht. Die Analyse der B-Zell-Differenzierung mit der Untersuchung unterschiedlicher Gedächtnis-B-Zell-Populationen des peripheren Blutes erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen von immunfluoreszenzgefärbten PBMC. Charakterisiert werden konnten die Gedächtnis-B-Zellen durch die Expression von CD27<sup>+</sup> sowie die Unterteilung in weitere Subpopulationen durch die Oberflächenexpression von: IgM<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup> oder IgA<sup>+</sup> (6).

Um diese Methodik spezifischer zu gestalten, z.B. zur Detektierung von Gedächtnis-B-Zellen bei immunsupprimierten Individuen, wurde unter anderem die durchflusszytometrische Analyse einer Protein-Tyrosin-Phosphatase CD148 als zusätzlicher Oberflächenmarker vorgeschlagen (82). Zusätzlich kann zur Identifikation transitionaler B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen neben CD27 auch die Expression des Transporters ABCB1 untersucht werden. In naiven B-Zellen besteht eine vermehrte Expression, in transitionalen B-Zellen eine verminderte Expression und in Gedächtnis-B-Zellen wird der Transporter nicht exprimiert (83).

Eine Erweiterung des Detektionsverfahrens mittels CD148 und ABCB1-Transporter erscheint hier jedoch nicht zwingend notwendig, da das von uns gewählte durchflusszytometrische Panel zur Identifikation von Gedächtnis-B-Zellen dem für die CVID-Klassifikation entspricht und als Standardanalyseverfahren von B-Zellen empfohlen wird (6).

Die Diagnose CVID wird anhand der Laborparameter bei einer reduzierten Konzentration von  $\geq$  zwei Immunglobulinklassen, verminderter Impfantworten sowie einer vermehrten Infektionsanfälligkeit gestellt (1).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine bestimmte Genvariante mit dem klinischen Phänotyp segregiert. Hier zeigte sich keine Segregation von Genvariante und Erkrankungssymptomen. Da auch andere Genvarianten, die mit CVID assoziiert sind (z.B. TACI), keine vollständige Segregation zeigen

(43), ist vor allem die Charakterisierung der klinischen und immunologischen Symptome und weniger der genetischen Befunde entscheidend für die Diagnosestellung eines CVID und die daraus folgende Therapieentscheidungen. Dies wird auch in den aktuellen Diagnosekriterien der European Society for Immunodeficiencies berücksichtigt (Stand: April 2017) (1;84).

#### 4.2. Rolle von IgD auf naiven B-Zellen für die Immunglobulin-Repertoire Entwicklung

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die p.Pro6Leu *IGHD*-Variante in der untersuchten Familie nicht mit der CVID-Erkrankung einhergeht. Wir hatten dann anhand der chimären IgD-Expression der naiven B-Zellen von *IGHD*-Variantenträger untersucht, ob die Expression von IgD Einfluss auf die Entwicklung des präimmunen Immunglobulin-Repertoires beim menschlichen Organismus hat. Hierbei ging es weniger um die (patho)genetische Aufklärung der Erkrankung in der Familie. Vielmehr wurden die *IGHD*-Variantenträger als „genetische Modelle“ herangezogen, an denen die genannte Fragestellung im menschlichen Organismus untersucht werden kann.

In dieser Arbeit wurde das Immunglobulin-Repertoire der schweren Kette von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> (transitionalen) B-Zellen und CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup> (reifen, naiven) B-Zellen von *IGHD*-Variantenträgern (IgD<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) analysiert und mit Kontrollen verglichen. Bis auf wenige Unterschiede in der Verwendung von VH-Familien, VH-Segmenten, DH-Segmenten und CDR3-Längen konnten wir keine relevanten Unterschiede im Immunglobulin-Repertoire von IgD<sup>+</sup> B-Zellen und IgD<sup>-</sup> B-Zellen feststellen.

Primär interessierte uns, ob IgD einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunglobulin-Repertoires des naiven B-Zell Kompartiments beim Menschen habe und ob sich indirekt hieraus ggf. eine Rolle von IgD für die Toleranzinduktion der B-Zellen ableiten ließe.

Diese Überlegungen basierten auf folgenden Vorbeobachtungen:

Initial beschrieben Goodnow et al. bereits 1988 in Untersuchungen von transgenen Mäusen einen auf Antigenstimulation hyporesponsiven Zustand von B-Zellen (Anergie), der phänotypisch durch die Herunterregulation von IgM bei gleichbleibender IgD Expression gekennzeichnet war (23). Aus weiteren Untersuchungen von transgenen bzw. knock-out Mausmodellen wurde vermutet, dass die Expression von IgD auf naiven B-Zellen das Ausmaß dieses über IgM induzierten Anergiezustandes abschwächt und dadurch toleranzbedingte Löcher im präimmunen Immunglobulin-Repertoire reduzieren könne (33).

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die IgD-Expression auf Ebene der präimmunen/naiven B-Zellen die Toleranzinduktion (über den Mechanismus der Anergie) abschwächt und dass die IgD-Expression naiver B-Zellen möglicherweise das Überleben autoreaktiver B-Zellen begünstigt. Interessanterweise konnte im humanen System gezeigt werden, dass B-Zellen, welche membranständiges IgD, aber nicht IgM exprimierten (hervorgerufen durch einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu IgD), vermehrt autoreaktiv sind (27).

Wir vermuteten daher, dass sich im Immunglobulin-Repertoire der IgD<sup>-</sup> B-Zell-Population bei den heterozygoten *IGHD*-Variantenträgern weniger Anzeichen für eine Autoreaktivität zeigen, als in der IgD<sup>+</sup> Wildtyp-Population.

Aus früheren Studien zum Immunglobulin-Repertoire bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Immundefekten konnten bereits Immunglobulin-Repertoire Muster identifiziert werden, die vermehrt in B-Zellen mit autoreaktiven BZR verwendet werden:

In der Repertoire-Analyse von Patienten mit SLE fand sich z.B. eine bemerkenswerte Anreicherung des VH4-34-Gensegments in polyreaktiven Autoantikörpern (85). Unterschiede in der Verwendung des Gensegments VH4-34 zwischen IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> B-Zellen konnten in dieser Arbeit nicht detektiert werden.

Charakteristikum des Immunglobulin-Repertoires einer autoreaktiven B-Zelle ist außerdem eine längere sowie positiver geladene CDR3-Region der schweren Kette des Immunglobulins (51;86).

Zusätzlich wurde in früheren Studien in autoreaktiven B-Zellen eine vermehrte hydrophobe CDR3-Region der schweren Kette nachgewiesen (87), welche in unseren Untersuchungen aber nicht detektiert wurden.

Deutliche Unterschiede in der Länge oder Ladung der CDR3-Region konnten in dem Vergleich zwischen IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> B-Zellen in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, sodass auch hier keine Korrelation zu einem möglichen autoreaktiven Repertoire nachgewiesen werden konnte.

In der bereits erwähnten Studie einer anderen Arbeitsgruppe, in der ähnlich, wie in dieser Arbeit, B-Zellen von Individuen mit heterozygoter *IGHD*-Variante untersucht wurden, zeigte sich, dass die membranständige IgD-Expression womöglich keinen Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase naiver B-Zellen beim Menschen habe (81). Vermutet wurden möglicherweise Auffälligkeiten bei der Untersuchung des Immunglobulin-Repertoires der Zellpopulationen. Untersucht wurde die CDR3-Länge als Marker der Immunglobulin-Repertoire Selektion. Wie auch in der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich bei der Immunglobulin-Repertoire Untersuchung der CDR3-Länge keine bedeutenden Unterschiede zwischen der IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> Population (81).

Zusammenfassend zeigten sich keine relevanten Unterschiede im Immunglobulin-Repertoire bzw. in möglichen Autoreaktivitäts-Mustern des Repertoires zwischen IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> B-Zellen. Ausgehend von diesen Untersuchungen ergaben sich keine eindeutigen Hinweise für eine Rolle von membranständigem IgD für die Entwicklung des Immunglobulin-Repertoires naiver B-Zellen oder die Aufrechterhaltung/Verhinderung von Toleranz.

#### **4.2.1. Wertung der Daten / kritische Reflexion**

Das Immunglobulin-Repertoire von transitionalen B-Zellen und naiven B-Zellen von zwei *IGHD*-Variantenträgern wurde in Abhängigkeit ihrer IgD Expression

untersucht und jeweils mit IgD<sup>+</sup> B-Zellen von gesunden Kontrollindividuen verglichen. Die Anzahl der untersuchten Sequenzen war bei den Kontrollpersonen 791 und bei den *IGHD*-Variantenträgern 230 (II.3.: 123, III.3.: 107). Infolge der geringeren Anzahl der Sequenzen von II.3. und III.3. besitzt die Repertoire-Analyse ggf. eine geringere Aussagekraft. Die von uns verwendete Methodik der Repertoire-Analysen mittels Einzelzellanalyse und Sanger-Sequenzierung ist generell sehr aufwendig und kann möglicherweise durch das *next-generation sequencing* in Zukunft abgelöst werden. Das *next-generation sequencing* ermöglicht eine schnellere, effizientere und kostengünstigere Analyse des Repertoires im Vergleich zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung (88). Um das BZR-Repertoire exakt zu interpretieren, wäre eine zusätzliche Einteilung in Altersgruppen notwendig, da bereits altersabhängige Unterschiede im Repertoire von u.a. naiven B-Zellen beobachtet werden konnten (89).

Goodnow et al. stellten die Vermutung auf, dass IgD das Ausmaß des IgM-induzierten Anergiestatus‘ in B-Zellen reduziere und dadurch toleranzbedingte Löcher im Immunglobulin-Repertoire verhindere (33). Hierfür ergaben sich in unseren Untersuchungen des Immunglobulin-Repertoires keine Hinweise. Dies könnte auch wieder durch die geringe Anzahl untersuchter Sequenzen bedingt sein.

Möglicherweise lassen sich die Ergebnisse aus dem transgenen/knock-out Mausmodell nicht direkt auf den menschlichen Organismus übertragen. Grund dafür könnten möglicherweise speziesabhängige Unterschiede des Immunsystems zwischen Mäusen und Menschen sein (90).

Bei Individuen mit primären Immundefekten lassen sich häufig autoreaktive B-Zellen im naiven B-Zell Kompartiment nachweisen (52). Ursächlich ist vermutlich ein defekter BZR-Signalweg, welcher zu einem dysregulierten Toleranzmechanismus führt und benötigt wird für das Rezeptor Editing, die klonale Deletion sowie den Anergie-Status (91;92). Zusätzlich wird vermutet, dass die negative B-Zell Selektion, welche zur Eliminierung von autoreaktiven

Zellen durch die o.g. Mechanismen führt, inkomplett ist und dementsprechend einen Überlebensvorteil der autoreaktiven B-Zellen darstellt (52;92). So konnte bei heterozygoten Trägern einer TACI-Variante eine vermehrte Autoreaktivität in naiven B-Zellen nachgewiesen werden (93).

Kritisch diskutiert werden muss, dass in unseren Untersuchungen des Immunglobulin-Repertoires neben einem klinisch und immunologisch gesunden/unauffälligen Individuum auch die Indexpatientin mit CVID eingeschlossen wurde. Möglicherweise liegen bei der Patientin zusätzliche, uns bislang unbekannte genetische Varianten vor, die einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunglobulin-Repertoires haben und die Effekte der fehlenden IgD-Expression überlagern.

## 5. Zusammenfassung

Die Expression eines funktionsfähigen BZR ist essentiell für die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen, für deren Toleranzinduktion und Sekretion protektiver Antikörper.

Genetisch bedingte Defekte im BZR-Signaltransduktionsweg liegen den primären Immundefekten mit vorwiegendem Antikörpermangel („humoraler Immundefekt“) zu Grunde. Naive B-Zellen in der Peripherie exprimieren den BZR als zwei Isotypen (IgM und IgD), wohingegen unreife B-Zellen im Knochenmark nur IgM exprimieren. Die Bedeutung für diese differentielle IgM/IgD-Expression ist nicht bekannt. Es wird jedoch der Expression von IgD eine Rolle in der Generierung hochaffiner Antikörper und in der Regulation von B-Zell Toleranz zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurden die Familienmitglieder einer Indexpatientin klinisch, immunologisch und genetisch charakterisiert. Bei der Indexpatientin wurde ein Immundefekt im Sinne eines CVID diagnostiziert. Es zeigte sich eine auffällige Expression von IgD auf naiven B-Zellen, zudem konnte eine Variante in dem für IgD kodierenden *IGHD*-Gen nachgewiesen werden.

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Auftreten des Immundefektes und der p.Pro6Leu *IGHD*-Variante nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich bei den Trägern der *IGHD*-Variante kein Hinweis auf eine Störung der B-Zell Differenzierung oder ein Defekt der spezifischen Antikörperproduktion. Somit scheint die untersuchte p.Pro6Leu *IGHD*-Variante nicht ursächlich für den klinischen und immunologischen Phänotyp der Indexpatientin zu sein. Inwieweit die Variante ein relatives Risiko für die Entwicklung eines CVID darstellt, kann aus der Untersuchung der Familie nicht beurteilt werden und müsste in einer größeren CVID-Kohorte evaluiert werden.

Da aus Untersuchungen von transgenen/knock-out Mausmodellen eine Bedeutung von IgD für die Regulation der peripheren B-Zell Toleranz vermutet wird, nutzten wir in dieser Arbeit charakterisierte heterozygote Träger der *IGHD*-

Variante als „genetisches Modell“ zur Analyse der Bedeutung von IgD für die Entwicklung des Immunglobulin-Repertoires naiver B-Zellen des Menschen. Die durch allelische Exklusion bedingte chimäre Situation der IgD-Expression naiver B-Zellen bei heterozygoten *IGHD*-Variantenträgern machte den direkten Vergleich zwischen IgD<sup>+</sup> Wildtyp-Populationen und IgD<sup>-</sup> Mutante im gleichen Organismus möglich.

In den Untersuchungen des Immunglobulin-Repertoires von transitionalen und reifen, naiven B-Zellen in diesen Individuen zeigten sich jedoch keine wegweisenden Unterschiede zwischen IgD<sup>+</sup> und IgD<sup>-</sup> Populationen. Insbesondere auch charakteristische Motive des Immunglobulin-Repertoires, die auf eine Autoreaktivität des kodierten Immunglobulins hinweisen (VH4-34 Gensegment, lange CDR3-Region, positive Ladung und Hydrophobizität der CDR3-Region) waren nicht unterschiedlich zwischen beiden Zellpopulationen.

Somit scheint entweder die Expression von IgD auf naiven B-Zellen beim Menschen keinen Einfluss auf die Immunglobulin-Repertoire Entwicklung und die Regulation der Toleranzinduktion zu haben oder die verwendete Methodik ist nicht sensitiv genug, um mögliche Auffälligkeiten zu detektieren.

Hier würde sich für zukünftige Untersuchungen des Immunglobulin-Repertoires eine Hochdurchsatzsequenzierung mittels next-generation sequencing und für die Analyse der Autoreaktivität die Expression und Reaktivitätstestung monoklonaler Antikörper aus individuellen B-Zellen anbieten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ameratunga, R., Woon, S.-T., Gillis, D., Koopmans, W. und Steele, R. (2013). **New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin.** *Clinical & Experimental Immunology* 174, S. 203-211.
2. Wolf, H. M., Baumann, U., Borte, M., Grimbacher, B., Schulze, I., Schuster, V. und Weiß, M. (2005). **Humoral immunodeficiency II: Antibody deficiency syndromes with known genetic defect.** *Allergologie* 28, S. 498-506.
3. Wood, P., Stanworth, S., Burton, J., Jones, A., Peckham, D. G., Green, T., Hyde, C. und Chapel, H. (2007). **Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review.** *Clinical and Experimental Immunology* 149, S. 410-423.
4. McKinney, R. E. J. (1988). **Chronic Enteroviral Meningoencephalitis in Agammaglobulinemic Patients** *The Pediatric Infectious Disease Journal* 7, S. 80ff.
5. Pac, M., Bernatowska, E. A., Kierkuś, J., Ryżko, J. P., Cielecka-Kuszyk, J., Jackowska, T. und Mikołuc, B. (2017). **Gastrointestinal disorders next to respiratory infections as leading symptoms of X-linked agammaglobulinemia in children - 34-year experience of a single center.** *Archives of medical science : AMS* 13, S. 412-417.
6. Wehr, C., Kivioja, T., Schmitt, C. und al, e. (2008). **The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency.** *Blood* 111, S. 77-85.
7. Durandy, A., Kracker, S. und Fischer, A. (2013). **Primary antibody deficiencies.** *Nature Reviews Immunology* 13, S. 519-533.
8. Pieper, K., Grimbacher, B. und Eibel, H. (2013). **B-cell biology and development.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, S. 959-971.
9. Grimaldi, C. M., Hicks, R. und Diamond, B. (2005). **B Cell Selection and Susceptibility to Autoimmunity.** *The Journal of Immunology* 174, S. 1775-1781.

10. Schroeder, H. W., Jr. und Cavacini, L. (2010). **Structure and function of immunoglobulins**. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S. 41-52.
11. Abbas, A. K., Lichtmann, A. H. und Pillai, S. (2017). **General Features of Antibody Structure** In: *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, 9.Auflage, Oxford, Chapter 5, S. 100.
12. Moreland, L. W. (2004). **Hypervariable region**. In: *Rheumatology and Immunology Therapy, A to Z Essentials*, Springer Berlin Heidelberg, Chapter 1303, S. 424.
13. Abbas, A., Lichtmann, A. und Pillai, S. (2017). **Structural Features of Antibody Variable Regions**. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 9.Auflage, Oxford, Chapter 5, S. 101.
14. McBride, O., Heiter, P., Hollis, G., Swan, D., Otey, M. und Leder, P. (1982). **Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes**. *Journal of Experimental Medicine* 155, S.1480-1490.
15. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. und Alt, F. W. (2006). **Mechanism and Control auf V(D)J Recombination at the Immunoglobulin heavy chain locus**. *Annual Review of Immunology* 24, S. 541-570.
16. Abbas, A., Lichtmann, A. und Pillai, S. (2017). **V(D)J Recombination**. In: *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, 9.Auflage Oxford, Chapter 8, S. 186-192.
17. Ru, H., Chambers, M. G., Fu, T.-M., Tong, A. B., Liao, M. und Wu, H. (2015). **Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures**. *Cell* 163, S. 1138-1152.
18. Abbas, A., Lichtmann, A. und Pillai, S. (2007). **Subset of Mature B cells** In: *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, 9.Auflage Oxford, Chapter 8, S. 197.

19. Janeway, C. J., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2001). **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease** In, Garland Science, USA, Kapitel 4-2; Abb.: 4.2.
20. Nemazee, D. und Buerki, K. (1989). **Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras**. Proceedings of the National Academy of Sciences 86, S. 8039-8043.
21. Nemazee, D. (2006). **Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance**. Nature Reviews Immunology 6, S. 728.
22. Nemazee, D. (2000). **Revising B Cell Receptors**. Journal of Experimental Medicine 191, S. 1813-1818.
23. Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., Trent, R. J. und Basten, A. (1988). **Altered Immunoglobulin Expression and Functional Silencing of Self-Reactive B Lymphocytes in Transgenic Mice**. Nature 334, S. 676-682.
24. Vettermann, C. und Schlissel, M. S. (2010). **Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms**. Immunological Reviews 237, S. 22-42.
25. Tonegawa, S. (1983). **Somatic generation of antibody diversity**. Nature 302, S. 575.
26. Hobeika, E., Maity, P. C. und Jumaa, H. (2016). **Control of B Cell Responsiveness by Isotype and Structural Elements of the Antigen Receptor**. Trends in Immunology 37, S. 310-320.
27. Koelsch, K. (2007). **Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals**. The Journal of Clinical Investigation 117, S. 1558-1565.

28. Nitschke, L., Kosco, M. H., Köhler, G. und Lamers, M. C. (1993). **Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, S. 1887-1891.
29. Roes, J. und Rajewsky, K. (1993). **Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells.** Journal of Experimental Medicine *177*, S. 45-55.
30. Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M. H., Ochsenbein, A. F., Zinkernagel, R. M., Köhler, G. und Brombacher, F. (1998). **IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells.** Nature *393*, S. 797-801.
31. Brink, R., Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adams, E., Eris, J., Mason, D., Hartley, S. und Basten, A. (1992). **Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen.** Journal of Experimental Medicine *176*, S. 991-1005.
32. Kim, K.-M. und Reth, M. (1995). **The B cell antigen receptor of class IgD induces a stronger and more prolonged protein tyrosine phosphorylation than that of class IgM.** European Journal of Immunology *181*, S. 1005-1014.
33. Sabouri, Z., Perotti, S., Spierings, E., Humburg, P., Yabas, M., Bergmann, H., Horikawa, K., Roots, C., Lambe, S., Young, C., Andrews, T. D., Field, M., Enders, A., Reed, J. H. und Goodnow, C. C. (2016). **IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells.** Nature Communications *7*.
34. Chen, K. und Cerutti, A. (2011). **The Function and Regulation of Immunoglobulin D.** Current Opinion in Immunology *23*, S. 345-352.

35. Übelhart, R., Hug, E., Bach, M. P., Wossning, T., Dühren-von Minden, M., Horn, A. H. C., Tsiantoulas, D., Kometani, K., Kurosaki, T., Binder, C. J., Sticht, H., Nitschke, L., Reth, M. und Jumaa, H. (2015). **Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD.** *Nature Immunology* 16, S. 534-543.
36. Conley, M. E., Mathias, D., Treadaway, J., Minegishi, Y. und Rohrer, J. (1998). **Mutations in Btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia.** *American journal of human genetics* 62, S. 1034-1043.
37. Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J. L., Chatila, T., Crow, Y. J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Puck, J., Tang, M. L. K., Tangye, S. G., Torgerson, T. R. und Sullivan, K. E. (2018). **International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity.** *Journal of Clinical Immunology* 38, S. 96-128.
38. Conley, M. E. (2009). **Genetics of hypogammaglobulinemia: what do we really know?** *Current Opinion in Immunology* 21, S. 466-471.
39. Berglund, L. J., Wong, S. W. J. und Fulcher, D. A. (2008). **B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features.** *Pathology* 40, S. 288-294.
40. Schäffer, A. A., Salzer, U., Hammarström, L. und Grimbacher, B. (2007). **Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis.** *Current Opinion in Genetics & Development* 17, S. 201-212.
41. Poodt, A. E. J., Driessen, G. J. A., De Klein, A., Van Dongen, J. J. M., Van Der Burg, M. und De Vries, E. (2009). **TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency.** *Clinical & Experimental Immunology* 156, S. 35-39.

42. Salzer, U., Chapel, H. M., Webster, A. D. B., Pan-Hammarström, Q., Schmitt-Graeff, A., Schlesier, M., Peter, H. H., Rockstroh, J. K., Schneider, P., Schäffer, A. A., Hammarström, L. und Grimbacher, B. (2005). **Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans.** *Nature Genetics* 37, S. 820-828.
43. Rachid, R., Castigli, E., Geha, R. S. und al., e. (2006). **TACI Mutation in Common Variable Immunodeficiency and IgA Deficiency** *Current Allergy Asthma Report* 6, S. 357-362.
44. Aysun, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. und Nalbant, A. (2017). **Flow cytometry: basic principles and applications** *Critical Reviews in Biotechnology* 37, S.163-176.
45. Corbett, S. J., Tomlinson, I. M., Sonnhammer, E. L. L., Buck, D. und Winter, G. (1997). **Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination<sup>1</sup>.** *Journal of Molecular Biology* 270, S. 587-597.
46. Hervé, M., Isnardi, I., Ng, Y.-s., Bussel, J. B., Ochs, H. D., Cunningham-Rundles, C. und Meffre, E. (2007). **CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance.** *The Journal of Experimental Medicine* 204, S. 1583-1593.
47. Samuels, J., Ng, Y. S., Coupillaud, C., Paget, D. und Meffre, E. (2005). **Human B Cell Tolerance and Its Failure in Rheumatoid Arthritis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1062, S. 116-126.
48. Samuels, J., Ng, Y.-S., Coupillaud, C., Paget, D. und Meffre, E. (2005). **Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis.** *The Journal of Experimental Medicine* 201, S. 1659-1667.

49. Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V. und Nussenzweig, M. C. (2005). **Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus**. *The Journal of Experimental Medicine* 201, S. 703-711.
50. Ng, Y.-S., Wardemann, H., Chelnis, J., Cunningham-Rundles, C. und Meffre, E. (2004). **Bruton's Tyrosine Kinase Is Essential for Human B Cell Tolerance**. *Journal of Experimental Medicine* 200, S. 927-934.
51. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. und Nussenzweig, M. C. (2003). **Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors**. *Science* 301, S. 1374-1377.
52. Meffre, E. (2011). **The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246, S. 1-10.
53. Sauer, A. V., Morbach, H., Brigida, I., Ng, Y.-S., Aiuti, A. und Meffre, E. (2012). **Defective B cell tolerance in adenosine deaminase deficiency is corrected by gene therapy**. *The Journal of Clinical Investigation* 122, S. 2141-2152.
54. Menard, L., Saadoun, D., Isnardi, I., Ng, Y.-S., Meyers, G., Massad, C., Price, C., Abraham, C., Motaghedi, R., Buckner, J. H., Gregersen, P. K. und Meffre, E. (2011). **The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans**. *The Journal of Clinical Investigation* 121, S. 3635-3644.
55. Meyers, G., Ng, Y.-S., Bannock, J. M., Lavoie, A., Walter, J. E., Notarangelo, L. D., Kilic, S. S., Aksu, G., Debré, M., Rieux-Laucat, F., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Durandy, A. und Meffre, E. (2011). **Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, S. 11554-11559.
56. Menard, L., Samuels, J., Ng, Y. S. und Meffre, E. (2011). **Inflammation-independent defective early B cell tolerance checkpoints in rheumatoid arthritis**. *Arthritis & Rheumatism* 63, S. 1237-1245.

57. Isnardi, I., Ng, Y.-S., Srdanovic, I., Motaghedi, R., Rudchenko, S., von Bernuth, H., Zhang, S.-Y., Puel, A., Jouanguy, E., Picard, C., Garty, B.-Z., Camcioglu, Y., Doffinger, R., Kumararatne, D., Davies, G., Gallin, J. I., Haraguchi, S., Day, N. K., Casanova, J.-L. und Meffre, E. (2008). **IRAK-4- and MyD88-Dependent Pathways Are Essential for the Removal of Developing Autoreactive B Cells in Humans.** *Immunity* 29, S. 746-757.
58. Isnardi, I., Ng, Y.-S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J. H., Cunningham-Rundles, C. und Meffre, E. (2010). **Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones.** *Blood* 115, S. 5026-5036.
59. Su, H. (2017). **Studying human immunodeficiencies in humans: advances in fundamental concepts and therapeutic interventions.** *F1000Research* 6, S. 318-318.
60. Romberg, N., Virdee, M., Chamberlain, N., Oe, T., Schickel, J. N., Perkins, T., Cantaert, T., Rachid, R., Rosengren, S., Palazzo, R., Geha, R., Cunningham-Rundles, C. und Meffre, E. (2015). **TNFRSF13B hemizygoty reveals TACI haploinsufficiency at later stages of B-cell development.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136, S. 1315-1325.
61. Sathkumara, H. D., De Silva, N. R., Handunnetti, S. und De Silva, A. D. (2015). **Genetics of common variable immunodeficiency: role of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor.** *International Journal of Immunogenetics* 42, S. 239-253.
62. Lougaris, V., Gallizzi, R., Vitali, M., Baronio, M., Salpietro, A., Bergbreiter, A., Salzer, U., Badolato, R. und Plebani, A. (2012). **A novel compound heterozygous TACI mutation in an autosomal recessive common variable immunodeficiency (CVID) family.** *Human Immunology* 73, S. 836-839.

63. Pan-Hammarström, Q., Salzer, U., Du, L., Björkander, J., Cunningham-Rundles, C., Nelson, D. L., Bacchelli, C., Gaspar, H. B., Offer, S., Behrens, T. W., Grimbacher, B. und Hammarström, L. (2007). **Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency.** *Nature Genetics* 39, S. 429-430.
64. Zhang, L., Radigan, L., Salzer, U., Behrens, T. W., Grimbacher, B., Diaz, G., Bussel, J. und Cunningham-Rundles, C. (2007). **Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: Clinical and immunologic outcomes in heterozygotes.** *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, S. 1178-11785.
65. Pulvirenti, F., Zuntini, R., Milito, C., Specchia, F., Spadaro, G., Danieli, M. G., Pession, A., Quinti, I. und Ferrari, S. (2016). **Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes.** *Journal of Immunology Research* 2016, S. 1-14.
66. Bogaert, D. J. A., Dullaers, M., Lambrecht, B. N., Vermaelen, K. Y., De Baere, E. und Haerynck, F. (2016). **Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all?** *Journal of Medical Genetics* 53, S. 575-590.
67. Salzer, U., Bacchelli, C., Buckridge, S., Pan-Hammarström, Q., Jennings, S., Lougaris, V., Bergbreiter, A., Hagen, T., Birmelin, J., Plebani, A., Webster, A. D. B., Peter, H.-H., Suez, D., Chapel, H., McLean-Tooke, A., Spickett, G. P., Anover-Sombke, S., Ochs, H. D., Urschel, S., Belohradsky, B. H., Ugrinovic, S., Kumararatne, D. S., Lawrence, T. C., Holm, A. M., Franco, J. L., Schulze, I., Schneider, P., Gertz, E. M., Schäffer, A. A., Hammarström, L., Thrasher, A. J., Gaspar, H. B. und Grimbacher, B. (2009). **Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes.** *Blood* 113, S.1967-1976.

68. Koopmans, W., Woon, S.-T., Brooks, A., Dunbar, P., Browett, P. und Ameratunga, R. (2012). **Clinical variability of family members with the C104R mutation in transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI)**. *Journal of clinical immunology* 33, S. 68-73.
69. Castigli, E., Wilson, S. A., Garibyan, L., Rachid, R., Bonilla, F., Schneider, L. und Geha, R. S. (2005). **TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency**. *Nature Genetics* 37, S. 829-834.
70. Tam, J. S. und Routes, J. M. (2013). **Common Variable Immunodeficiency**. *American Journal of Rhinology & Allergy* 27, S. 260-265.
71. Lobo, I. (2008). **Same Genetic Mutation, Different Genetic Disease Phenotype**. *Nature Education* 1, S. 64.
72. Herskowitz, I. (1987). **Functional inactivation of genes by dominant negative mutations**. *Nature* 329, S. 219-222.
73. Jackson, C. E., Fischer, R. E., Hsu, A. P., Anderson, S. M., Choi, Y., Wang, J., Dale, J. K., Fleisher, T. A., Middleton, L. A., Sneller, M. C., Lenardo, M. J., Straus, S. E. und Puck, J. M. (1999). **Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance**. *American Journal of Human Genetics* 64, S. 1002-1014.
74. Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J. und Puck, J. M. (1995). **Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome**. *Cell* 81, S. 935-946.
75. Garibyan, L., Lobito, A. A., Siegel, R. M., Call, M. E., Wucherpfennig, K. W. und Geha, R. S. (2007). **Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID)**. *Journal of Clinical Investigation* 117, S. 1550-1557.

76. Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K.-M., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y. und Lenardo, M. J. (2000). **Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations.** *Science* 288, S. 2354-2357.
77. Lee, J. J., Jabara, H. H., Garibyan, L., Rauter, I., Sannikova, T., Dillon, S. R., Bram, R. und Geha, R. S. (2010). **The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126, S. 1234-1241.
78. Kuehn, H. S., Caminha, I., Niemela, J. E., Rao, V. K., Davis, J., Fleisher, T. A. und Oliveira, J. B. (2011). **FAS Haploinsufficiency Is a common disease mechanism in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Journal of immunology* 186, S. 6035-6043.
79. Bride, K. und Teachey, D. (2017). **Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease.** *F1000Research* 6, S. 1928-1928.
80. Sullivan, K. E. und Stiehm, E. R. (2014). **Stiehm's Immune Deficiencies.** In, Academic Press, Chapter 3, S. 73-81
81. Nechvatalova, J., Bartol, S. J. W., Chovancova, Z., Boon, L., Vlkova, M. und van Zelm, M. C. (2018). **Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in IGHD Haploinsufficient Humans.** *The Journal of Immunology* 201.
82. Tangye, S. G., Liu, Y.-J., Aversa, G., Phillips, J. H. und de Vries, J. E. (1998). **Identification of Functional Human Splenic Memory B Cells by Expression of CD148 and CD27.** *The Journal of Experimental Medicine* 188, S. 1691-1703.
83. Wirths, S. und Lanzavecchia, A. (2005). **ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells.** *European Journal of Immunology* 35, S. 3433-3441.

84. Bonilla, F. A., Barlan, I., Chapel, H., Costa-Carvalho, B. T., Cunningham-Rundles, C., de la Morena, M. T., Espinosa-Rosales, F. J., Hammarström, L., Nonoyama, S., Quinti, I., Routes, J. M., Tang, M. L. K. und Warnatz, K. (2016). **International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders**. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 4, S. 38-59.
85. Tipton, C. M., Fucile, C. F., Darce, J., Chida, A., Ichikawa, T., Gregoret, I., Schieferl, S., Hom, J., Jenks, S., Feldman, R. J., Mehr, R., Wei, C., Lee, F. E.-H., Cheung, W. C., Rosenberg, A. F. und Sanz, I. (2015). **Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell expansions in acute Systemic Lupus Erythematosus**. *Nature immunology* 16, S. 755-765.
86. Bashford-Rogers, R. J., Smith, K. G. und Thomas, D. C. (2018). **Antibody repertoire analysis in polygenic autoimmune diseases**. *Immunology* 155, S. 3-17.
87. Larimore, K., McCormick, M. W., Robins, H. S. und Greenberg, P. D. (2012). **Shaping of Human Germline IgH Repertoires Revealed by Deep Sequencing**. *The Journal of Immunology* 189, S. 3221-3230.
88. Koboldt, D., Steinberg, K., Larson, D., Wilson, R. und Mardis, E. (2013). **The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics**. *Cell* 155, S. 27-38.
89. IJspeert, H., van Schouwenburg, P. A., van Zessen, D., Pico-Knijnenburg, I., Driessen, G. J., Stubbs, A. P. und van der Burg, M. (2016). **Evaluation of the Antigen-Experienced B-Cell Receptor Repertoire in Healthy Children and Adults**. *Frontiers in Immunology* 7.
90. Benitez, A., Weldon, A. J., Tatosyan, L., Velkuru, V., Lee, S., Milford, T. A., Francis, O. L., Hsu, S., Nazeri, K., Casiano, C. M., Schneider, R., Gonzalez, J., Su, R. J., Baez, I., Colburn, K., Moldovan, I. und Payne, K. J. (2014). **Differences in Mouse and Human Non-Memory B Cell Pools**. *Journal of Immunology* 192, S. 4610-4619.

91. Pillai, S., Mattoo, H. und Cariappa, A. (2011). **B cells and autoimmunity**. *Current Opinion in Immunology* 23, S. 721-731.
92. Nemazee, D. (2017). **Mechanisms of central tolerance for B cells**. *Nature Reviews Immunology* 17, S. 281-294.
93. Romberg, N., Chamberlain, N., Saadoun, D., Gentile, M., Kinnunen, T., Ng, Y. S., Virdee, M., Menard, L., Cantaert, T., Morbach, H., Rachid, R., Martinez-Pomar, N., Matamoros, N., Geha, R., Grimbacher, B., Cerutti, A., Cunningham-Rundles, C. und Meffre, E. (2013). **CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation**. *The Journal of Clinical Investigation* 123, S. 4283-4293.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A (Nukleotid)	Adenin
aa	amino acid
ABCB1	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
AD	autosomal-dominant
AK	Antikörper
ALPS	Autoimmun-Lymphproliferatives Syndrom
APC	Allophycocyanin
AR	autosomal-rezessiv
BAFF-R	B-cell activating factor receptor
BLNK	B-cell linker protein
bp	Basenpaare
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BV421	Brilliant Violet 421
BZR	B-Zell-Rezeptor
c	konstante
C (Nukleotid)	Cytosin
CAML	Calcium modulating ligand
CD	Cluster of Differentiation
CD10 <sup>-</sup>	reife, naive B-Zellen
CD10 <sup>+</sup>	transitionale B-Zellen
cDNA	complementary DNA
CDR	complementary-determining region
CH	konstante Region der schweren Kette
CH1	konstante Domäne 1
CH2	konstante Domäne 2
CH3	konstante Domäne 3
CL	konstante Region der leichten Kette
CR2	Komplementrezeptor 2
CVID	common variable immunodeficiency
Cy	Cyanin
D-	diversity

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EB	Elution buffer
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAS-LG	Fas Ligand
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FW	Framework
G (Nukleotid)	Guanin
ggf	gegebenenfalls
GOF	Gain of function
H.influenzae	Haemophilus influenzae
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgD <sup>+</sup>	membranständige Expression von Immunglobulin D ( <i>Wildtyp</i> )
IgD <sup>-</sup>	fehlende membranständige Expression von Immunglobulin D ( <i>Mutante</i> )
IgD-BZR	IgD B-Zell Rezeptor
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IGHD	Immunoglobulin constant heavy delta
IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu
IGLLI	Immunoglobulin lambda-like polypeptide
IgM	Immunglobulin M
IgM-BZR	IgM B-Zell Rezeptor
IKZF1	Ikaros family zinc finger protein 1
IRFSBP2	Interferon regulator factor 2-binding protein 2
J-	joining

mRNA	messenger RNA
MS4A1	Membrane Spanning 4-Domains A1
NaCl	Natriumchlorid
NFKB	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
NP-40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	p-Wert
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PIK3R1	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1
PIK3CD	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, delta
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RAG	Rekombinations-Aktivierungs-Gene
RAG 1	Rekombinations-Aktivierungs-Gen 1
RAG 2	Rekombinations-Aktivierungs-Gen 2
RNA	Ribonukleinsäure
RSS	recombination signal sequences
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
T (Nukleotid)	Thymin
TAC1	transmembrane activator and CAML interactor
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCF3	Transcription factor 3
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TNF	tumor necrosis factor
TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B
TNFRSF13C	tumor necrosis factor receptor superfamily member 13C
TNFSF12	tumor necrosis factor ligand superfamily member 12
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
V-	variable

VH	variable Region der schweren Kette
VL	variable Region der leichten Kette
VZV	Varizella-Zoster-Virus
X	Xanthin
XL	X-chromosomaler Erbgang
XLA	X-chromosomale Agammaglobulinämie
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4

Verwendete Maßeinheiten:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
dl	Deziliter
IU	International Unit
mIU	Milli-International Units
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
µl	Mikroliter
µm	Mikromol
rpm	Revolutions per minute
sec	Sekunde
U	Unit
W	Watt

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Immunglobulins und die somatische Rekombination. Modifiziert nach (19).....	5
Abbildung 2: Die unterschiedlichen Reifungsgrade der B-Zelle und ihre Antikörperpräsentation. Modifiziert nach (8).....	8
Abbildung 3: Stammbaum der Familie .....	30
Abbildung 4: Relativer Anteil unterschiedlicher Gedächtnis-B-Zell-Populationen bei Kontrollpersonen, heterozygoten <i>IGHD</i> -Variantenträgern sowie Familienmitgliedern ohne Variantennachweis. ....	34
Abbildung 5: Häufigkeit von VH-Familien in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	38
Abbildung 6: Häufigkeit von VH-Segmenten in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	39
Abbildung 7: Häufigkeit von DH-Segmenten in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	41
Abbildung 8: Häufigkeit von JH-Segmenten in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	42
Abbildung 9: Verteilung der CDR3-Längen in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	43
Abbildung 10: Anzahl positiver Ladungen der CDR3-Region in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	44
Abbildung 11: Anzahl negativer Ladungen der CDR3-Region in CD10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	45
Abbildung 12: Häufigkeit von VH-Familien in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	46
Abbildung 13: Häufigkeit von VH-Segmenten in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	47
Abbildung 14: Häufigkeit von DH-Segmenten in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	49
Abbildung 15: Häufigkeit von JH-Segmenten in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen.....	50
Abbildung 16: Verteilung der CDR3-Längen in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	51
Abbildung 17: Anzahl positiver Ladungen der CDR3-Region in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	52
Abbildung 18: Anzahl negativer Ladungen der CDR3-Region in CD10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	53

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische Ursachen von Agammaglobulinämien .....	12
Tabelle 2: Genetische Ursachen von Hypogammaglobulinämien .....	15
Tabelle 3: Verwendete Antikörper .....	18
Tabelle 4: Bestandteile der Lyselösung.....	19
Tabelle 5: Bestandteile des Mastermix' für die reverse Transkription .....	20
Tabelle 6: Bestandteile des PCR-Mix' für die Amplifikation rearrangierter Immunglobulingene (Mix für 100 Ansätze).....	21
Tabelle 7: Reaktionsschritte der Einzelzell-PCR zur Amplifikation rearrangierter Immunglobulingene .....	21
Tabelle 8: Labormaterialien .....	23
Tabelle 9: Reagenzien .....	24
Tabelle 10: Medien und Puffer .....	25
Tabelle 11: Primer .....	26
Tabelle 12: Laborgeräte .....	27
Tabelle 13: Software .....	27
Tabelle 14: Immunologische Labordiagnostik erwachsener Individuen.....	32
Tabelle 15: Immunologische Labordiagnostik pädiatrischer Individuen.....	33
Tabelle 16: Anzahl der untersuchten Sequenzen für die Immunglobulin- Repertoire Analyse.....	37

## 10. Anhang

### 10.1. Sequenzen II.3.

Sequenzen reifer, naiver B-Zellen (CD10<sup>-</sup>) der untersuchten Person II.3. (siehe Tabelle 16, Abbildungen 12-18):

	VH	DH	RF	JH	(-)	CDR3 (aa)	(+)	Länge
IGHD2 MN IgD+ 67	1-18	6-19	3	5	5	DGGGIAGVAGDEVDWFDP	0	18
IGHD2 MN IgD+ 76	1-18	/	/	4	2	DLFDY	0	5
IGHD2 MN IgD+ 81	1-18	6-19	2	4	1	FAVPYSRGWSNFDY	1	15
IGHD2 MN IgD+ 41	1-18	3-3	2	3	3	VLSSRYDFWVGQDAFDI	1	18
IGHD2 MN IgD+ 47	1-2	1-7	3	4	1	TNGITGTSFDY	0	11
IGHD2 MN IgD+ 84	1-3	1-26	1	4	2	GELPYDFDY	0	10
IGHD2 MN IgD+ 40	1-3	3-3	2	6	3	DGLYYDFWVGYPDV	0	14
IGHD2 MN IgD+ 23	1-69	2-2	3	4	4	GGLDIVVPAATEVDYFDY	0	19
IGHD2 MN IgD+ 26	1-69	6-13	1	3	1	SPPQQLVLLGAFDI	0	14
IGHD2 MN IgD+ 32	1-69	6-19	2	4	1	GSGWYSVDY	0	9
IGHD2 MN IgD+ 35	1-69	3-22	2	6	1	GGGYYYMDV	0	9
IGHD2 MN IgD+ 92	3-11	/	/	6	2	GGLSDYYYYMDV	0	13
IGHD2 MN IgD+ 48	3-11	/	/	5	1	DSGWI	0	5
IGHD2 MN IgD+ 75	3-13	1-26	2	4	1	GAGSYDGLLL	0	11
IGHD2 MN IgD+ 50	3-23	3-10	2	4	1	YSGSYDFDY	0	11
IGHD2 MN IgD+ 62	3-23	3-22	3	4	2	DQGMVTMIVVAHPLDY	1	17
IGHD2 MN IgD+ 66	3-23	1-26	3	5	1	GGVVGATDC	0	10
IGHD2 MN IgD+ 69	3-23	1-26	3	3	2	DLGAKVVGATYAFDI	1	16
IGHD2 MN IgD+ 86	3-23	3-22	3	3	2	VDRVIVVVNLGAFDI	1	17

# Anhang

IGHD2 MN IgD+ 87	3-23	1-26	2	6	2	DQSGGSYYYYYYMDV	0	16
IGHD2 MN IgD+ 94	3-23	2-2	1	4	2	ERSYQLPHDY	2	10
IGHD2 MN IgD+ 95	3-23	3-10	3	2	2	DRGGAMVRGVIIWYFDL	2	18
IGHD2 MN IgD+ 08	3-23	2-2	2	6	3	DGGDYCSSTSCRWYYYYYYMDV	1	23
IGHD2 MN IgD+ 21	3-23	4-17	3	4	1	STTVTRVGYFDY	1	12
IGHD2 MN IgD+ 38	3-23	4-23	2	4	2	ADGGWLPFDY	0	11
IGHD2 MN IgD+ 51	3-30	4-17	2	3	4	QYGDLAYEWDAFDI	0	15
IGHD2 MN IgD+ 79	3-30	3-16	2	4	3	DDYVFSWFDY	0	10
IGHD2 MN IgD+ 02	3-30	2-2	3	3	3	DGTVFTVPAAPGDAFDI	0	19
IGHD2 MN IgD+ 06	3-30	2-2	2	2	2	DRGCSSTSCPSFYWYFDL	1	19
IGHD2 MN IgD+ 13	3-30	3-3	2	5	3	DGVPNTYYDFWGSYKGNWFDP	1	22
IGHD2 MN IgD+ 17	3-30	6-19	1	4	2	DRSLGLVNACFDY	1	14
IGHD2 MN IgD+ 18	3-30	2-2	3	6	3	DWADIVVPAAPTKSYYYYYMDV	1	23
IGHD2 MN IgD+ 25	3-30	3-3	2	5	2	GAYYDFWSGLSGGFDP	0	16
IGHD2 MN IgD+ 42	3-30	4-4	3	3	3	DYTVTLFDAFDI	0	12
IGHD2 MN IgD+ 53	3-30- 3	3-22	2	3	4	ESGTYYYDSSGPLDAFDI	0	19
IGHD2 MN IgD+ 57	3-30- 3	7-27	2	1	1	VRSSPWAEYFQH	2	13
IGHD2 MN IgD+ 59	3-30- 3	6-13	1	5	2	GQLDNWFDP	0	9
IGHD2 MN IgD+ 61	3-30- 3	3-22	2	4	3	GAWDYYDSSGYYLDY	0	16
IGHD2 MN IgD+ 73	3-30- 3	1-26	2	6	1	GSGSYYYYYMDV	0	13
IGHD2 MN IgD+ 16	3-48	/	/	3	3	DYWDAFDI	0	10
IGHD2 MN IgD+ 65	3-66	3-22	2	4	2	ESFGGSGYSNFDY	0	14
IGHD2 MN IgD+ 44	3-9	6-13	3	4	2	DAAAAPLAISFIDY	0	14

# Anhang

IGHD2 MN IgD+ 55	4-30- 2	3-3	3	5	1	SFGVVPNWFDP	0	12
IGHD2 MN IgD+ 60	4-30- 4	/	/	6	2	EVGTYYYYYYMDV	0	13
IGHD2 MN IgD+ 74	4-34	3-22	2	5	3	RPGGYDSSGYPDNWFDP	1	19
IGHD2 MN IgD+ 77	4-34	3-22	2	4	0	RRGSGYYLH	3	9
IGHD2 MN IgD+ 29	4-34	2-2	3	4	2	YRWLKEPAAEGGRYY	3	15
IGHD2 MN IgD+ 33	4-34	2-2	3	6	1	PAAPGGYYYYMDV	0	14
IGHD2 MN IgD+ 63	4-39	/	/	5	1	HLRATWATLNWFDP	2	15
IGHD2 MN IgD+ 91	4-39	/	/	5	1	YRMGPGLYAFGVILNWFDP	1	20
IGHD2 MN IgD+ 01	4-39	2-2	2	4	2	HPIGEYCSSTSCSRGFFDY	2	19
IGHD2 MN IgD+ 46	4-39	1-1	3	3	3	HATGTTEDAFDI	1	12
IGHD2 MN IgD+ 43	4-39	1-7	1	5	2	HPRRELACWFDP	4	13
IGHD2 MN IgD+ 56	4-4	3-9	2	6	2	AYYDILTGHPYYYYYMDV	1	20
IGHD2 MN IgD+ 52	4-59	3-22	2	3	3	TYYDSSGYPSAVDAFDI	0	20
IGHD2 MN IgD+ 54	4-59	5-5	2	6	2	VGRRGYSYGYNEISYYYYYMDV	2	22
IGHD2 MN IgD+ 58	4-59	2-2	2	6	1	LSSIGYYYYMDV	0	12
IGHD2 MN IgD+ 64	4-59	6-25	2	3	1	VPRQTGYSTGLGAFDI	1	16
IGHD2 MN IgD+ 78	4-59	5-24	2	4	2	DDGGY	0	6
IGHD2 MN IgD+ 85	4-59	3-22	2	4	2	SLVTYYYYDSSGYHGPFDI	1	20
IGHD2 MN IgD+ 88	4-59	6-6	2	3	3	EKGYFASSRIDAFDI	2	16
IGHD2 MN IgD+ 30	4-59	3-3	2	4	2	VSYYDFWSGYFDY	0	13
IGHD2 MN IgD+ 27	4-61	4-17	2	4	3	VTYGDYDFDY	0	10
IGHD2 MN IgD+ 39	5-51	2-2	2	1	0	SRGYCSSTSCSTGYFQH	2	17

Sequenzen transitionaler B-Zellen (CD10<sup>+</sup>) der untersuchten Person II.3. (siehe Tabelle 16, Abbildungen 5-11):

	VH	DH	RF	JH	(-)	CDR3 (aa)	(+)	Länge
IGHD2 NE IgD+ 01	3-64	/	/	1	0	GYSSSWAGRGYFQH	2	14
IGHD2 NE IgD+ 05	3-23	3-3	2	4	2	ENGGYDFWSGYY	0	12
IGHD2 NE IgD+ 07	3-23	/	/	4	2	EPMAHRRGGFDY	3	12
IGHD2 NE IgD+ 14	1-69	4-17	2	4	3	GMPLRPPDYGDYGGAFDY	1	18
IGHD2 NE IgD+ 15	4-34	3-9	1	3	3	GILRYFDWLLFYDAFDI	1	17
IGHD2 NE IgD+ 18	4-39	6-19	3	5	1	TIAVAGINWFDP	0	12
IGHD2 NE IgD+ 21	1-69	2-15	2	6	1	SYVGGGYCSGGSCANPQRGYYYYYYMDV	1	29
IGHD2 NE IgD+ 22	1-18	2-2	2	5	2	FNPGDCSSTSCPKVWFDP	1	19
IGHD2 NE IgD+ 24	3-30	5-12	2	3	2	ASPRGGYSGYVQMGDAFDI	1	19
IGHD2 NE IgD+ 27	3-23	2-2	2	4	2	DGVGCSSTSCYKGADY	1	16
IGHD2 NE IgD+ 29	1-3	2-2	2	5	1	LMGYCSSTSCYTGNWFDP	0	18
IGHD2 NE IgD+ 31	3-53	3-3	3	5	3	DDITIFGVVPGRE	1	13
IGHD2 NE IgD+ 38	3-30	6-13	3	5	1	DTSIAAAGPPGI	0	12
IGHD2 NE IgD+ 39	3-15	/	/	4	2	VPAKPRGGPGDHNFYD	3	17
IGHD2 NE IgD+ 40	3-7	2-2	3	3	3	DQVVPAAVDAFDI	0	13
IGHD2 NE IgD+ 41	4-59	3-9	2	3	3	DRTRYDILTGYFSVGAFDI	2	19
IGHD2 NE IgD+ 45	3-48	3-3	2	6	5	DSPPPDYDFWSGSRDYYYYYMDV	1	22
IGHD2 NE IgD+ 46	4-39	2-2	1	6	4	QESSPLWEYQLLSVGTDPDYMDV	0	23
IGHD2 NE IgD+ 48	3-30	2-8	2	4	3	DSDGWILGYCTNGVCYTLDY	0	20
IGHD2 NE IgD+ 3	3-48	6-19	2	6	3	SPSERDSSGWYAGYYYYYMDV	1	21
IGHD2 NE IgD+ 13	3-21	5-12	3	5	2	DPDIVATP	0	8

# Anhang

IGHD2 NE IgD+ 16	4-59	3-3	2	6	2	WGN YDFW S G Y A S R Y M D V	1	17
IGHD2 NE IgD+ 25	3-48	/	/	2	1	V L S G W Y F D L	0	9
IGHD2 NE IgD+ 01	4-30- 2	5-24	2	6	2	V I G D F G Y Y Y Y Y M D V	0	14
IGHD2 NE IgD+ 02	3-43	2-21	2	4	2	G T F R C G G D C Y S R S Y F D Y	2	17
IGHD2 NE IgD+ 03	3-7	4-4	2	4	2	V P S A G D Y S N Y L L Y F D Y	0	16
IGHD2 NE IgD+ 04	3-15	6-19	2	3	2	D R G S G W Y K Y A F D I	2	13
IGHD2 NE IgD+ 11	1-3	3-3	3	4	1	V T I F G V V S L D Y	0	11
IGHD2 NE IgD+ 12	1-69	3-10	2	4	1	A F G S G S T P L Y Y F D Y	0	14
IGHD2 NE IgD+ 13	1-3	/	/	6	2	G D R V Y Y Y Y Y M D V	1	13
IGHD2 NE IgD+ 14	3-23	/	/	1	2	D S V G A P F E Y F Q H	1	12
IGHD2 NE IgD+ 15	3-30- 3	3-10	2	6	3	T P Q G G S G S Y Y N P S F E D Y Y Y Y M D V	0	23
IGHD2 NE IgD+ 17	4-31	6-6	2	4	1	R Y S S S S F V D Y	1	10
IGHD2 NE IgD+ 18	3-30	1-26	2	3	3	P T S A Y G S G T H M V G Q K D D A F D I	2	21
IGHD2 NE IgD+ 21	4-31	1-10	2	5	2	E N R I P R H T L N W F D P	3	14
IGHD2 NE IgD+ 22	3-21	4-17	2	4	3	G G D Y G D Y V F D Y	0	11
IGHD2 NE IgD+ 23	3-33	5-24	1	4	2	D G L R F Q V G M Y Y F D Y	1	14
IGHD2 NE IgD+ 25	3-21	2-21	2	4	3	E Q T N P L A Y C G G D C S G P P D Y	0	19
IGHD2 NE IgD+ 26	4-59	6-19	2	4	1	Y S S G W P N V D Y	0	11
IGHD2 NE IgD+ 27	4-34	4-17	2	5	3	A T T D Y G D Y H N W F D P	1	14
IGHD2 NE IgD+ 28	3-30- 3	6-19	3	4	1	F P Y T I A V A G T I L D Y	0	14
IGHD2 NE IgD+ 29	4-39	/	/	3	2	K A T V T G G D A F D I	1	12
IGHD2 NE IgD+ 31	4-59	5-5	3	6	3	L G I V G D T A M D Y Y Y Y Y M D V	0	18
IGHD2 NE IgD+ 32	1-3	2-21	3	3	3	D S V V V V V T A A S D A F D I	0	16

## Anhang

IGHD2 NE IgD+ 33	3-30	3-10	2	4	1	DSVYYGSGSLLGY	0	13
IGHD2 NE IgD+ 34	3-30	3-9	1	6	2	GGRYFDSHYMDV	2	13
IGHD2 NE IgD+ 35	4-31	2-2	3	6	1	AVLTSIVVVPAAMTMDV	0	18
IGHD2 NE IgD+ 36	3-53	/	/	4	2	EGNSRAFDY	1	9
IGHD2 NE IgD+ 37	3-23	/	/	4	1	VSPTRVDY	1	9
IGHD2 NE IgD+ 38	3-30	/	/	4	2	DRRRGSLGNPDY	3	12
IGHD2 NE IgD+ 40	4-34	5-24	1	6	2	EVAFPARWLQPVVYYYYMDV	1	19
IGHD2 NE IgD+ 41	4-59	5-5	2	5	1	HGYSYGNLWFDP	1	12
IGHD2 NE IgD+ 42	4-59	2-21	2	5	2	GGGWGGAYCGGDCSSFDP	0	18
IGHD2 NE IgD+ 43	4-59	4-23	2	6	2	SPSLHDYGGNQVHLYMDV	2	19
IGHD2 NE IgD+ 44	3-30- 3	4-17	2	6	2	LSGYGDYVWTHYYYYMDV	1	18
IGHD2 NE IgD+ 45	4-59	3-9	2	6	3	DHGDILTGPPLYMDV	1	16
IGHD2 NE IgD+ 46	4-39	6-19	2	4	1	IPQSGWDY	0	8
IGHD2 NE IgD+ 47	1-69	3-22	2	4	3	EYDSSGYHFDY	1	12
IGHD2 NE IgD+ 48	4-30- 2	3-10	2	6	2	VVTNYYGSGSYLADGVYYYYYMDV	0	24

## 10.2. Sequenzen III.3.

Sequenzen reifer, naiver B-Zellen (CD10<sup>-</sup>) der untersuchten Person III.3. (siehe Tabelle 16, Abbildungen 12-18):

	VH	DH	RF	JH	(-)	CDR3 (aa)	(+)	Länge
IGHD1 MN IgD- 81	3-30- 3	/	/	5	1	GYVGVTFPHLFVSGGWFDP	1	19
IGHD1 MN IgD- 82	3-64	/	/	2	3	YYDSSGEGYFDY	0	13
IGHD1 MN IgD- 94	4-34	/	/	2	2	ESPTGRRLSHYWFYDL	3	16
IGHD1 MN IgD- 86	4-39	/	/	4	0	AHSVAY	1	6
IGHD1 MN IgD- 93	4-4	/	/	5	2	DPSRWGRFDP	2	10
IGHD1 MN IgD- 61	4-59	/	/	5	1	SGREGSGWLG	1	10
IGHD1 MN IgD- 79	3-23	1-26	1	4	2	LARWELLGILFDY	1	13
IGHD1 MN IgD- 94	4-59	1-26	3	3	1	IVGATFHAFDI	1	11
IGHD1 MN IgD- 78	1-69	2-15	2	4	2	TGKTKYCSGGSCYLADFDY	2	19
IGHD1 MN IgD- 95	3-11	2-15	3	5	0	SLVVAANR	1	8
IGHD1 MN IgD- 58	3-23	2-15	2	3	1	RYCSGGSCYTGWRRQGAFDI	2	19
IGHD1 MN IgD- 79	3-30	2-2	2	6	1	MGCSSTSCYFYYYYGMDV	0	18
IGHD1 MN IgD- 80	3-30- 3	2-2	3	6	2	QGIGEQVPAAPAMGYYYYGMDV	0	24
IGHD1 MN IgD- 68	3-23	2-21	3	4	2	SPIVVIWGEWYFDY	0	14
IGHD1 MN IgD- 52	1-2	3-10	1	4	2	DLYYYGSGSPGDY	0	14
IGHD1 MN IgD- 90	3-15	3-10	1	6	3	DTMGGWFGESRYYYYGMDV	1	19
IGHD1 MN IgD- 52	3-21	3-10	3	5	3	DITMVRGVIIHDSQNWFDP	2	19
IGHD1 MN IgD- 71	3-23	3-10	2	6	1	GSGSWGIFYYYYGMDV	0	16
IGHD1 MN IgD- 87	3-23	3-10	1	3	4	DPGGVLLWFGESHIGRDAFDI	2	21
IGHD1 MN IgD- 93	3-23	3-10	2	4	3	DPTYYYGSGSYGMDGNDY	0	19

# Anhang

IGHD1 MN IgD- 63	4-31	3-10	2	4	1	TYYYGSGSYSFDY	0	13
IGHD1 MN IgD- 67	4-39	3-10	1	4	2	SLSLLWFGHEPPDY	1	14
IGHD1 MN IgD- 85	3-11	3-22	2	6	2	VRADYYYYGMDV	1	12
IGHD1 MN IgD- 86	3-15	3-22	2	4	2	VLYYDSSGYFLDY	0	13
IGHD1 MN IgD- 76	3-21	3-22	2	4	3	GGYYDSSGYGLVEFDY	0	16
IGHD1 MN IgD- 49	3-23	3-22	2	3	3	EQRHYDSSGYFGAFDI	2	18
IGHD1 MN IgD- 54	3-23	3-22	2	6	1	SPPAGTKAGHYYYGMDV	2	17
IGHD1 MN IgD- 60	3-23	3-22	2	1	2	DANLNYYDSSGYVLYFQH	1	19
IGHD1 MN IgD- 73	3-9	3-22	2	4	3	ARYYYDSSGRGEFDY	2	15
IGHD1 MN IgD- 80	4-34	3-22	3	2	1	GAWSNTMIVVVKYWYFDL	1	18
IGHD1 MN IgD- 88	1-69	3-3	1	2	5	GEREWLADRTDWYFDL	2	16
IGHD1 MN IgD- 88	3-21	3-9	2	3	3	DPGYCTNGVCYALDAFDI	0	19
IGHD1 MN IgD- 51	3-30	3-9	1	4	2	DYWSGIRGHFDY	2	12
IGHD1 MN IgD- 91	4-34	3-9	2	2	2	GLTYDILTGYFRGWYFDL	1	19
IGHD1 MN IgD- 66	3-20	4-17	2	2	2	PYGENWYFDL	0	10
IGHD1 MN IgD- 50	3-9	4-17	2	4	2	VERSHYGYFDY	2	12
IGHD1 MN IgD- 73	3-30- 3	5-12	2	6	5	DPAWELGYSGYDDLGSMDV	0	19
IGHD1 MN IgD- 74	3-53	5-12	2	5	2	VGSGYDSFWFDP	0	13
IGHD1 MN IgD- 63	3-23	5-24	3	4	1	GGAPKMATNRYFDY	2	15
IGHD1 MN IgD- 89	3-23	5-5	2	3	2	DHPAARGYTLGAFDI	2	15
IGHD1 MN IgD- 64	3-53	5-5	3	6	2	DLTTAMVRYYGMDV	1	14
IGHD1 MN IgD- 76	3-21	6-13	3	4	2	EPRHIAAGSGDY	2	13
IGHD1 MN IgD- 77	3-23	6-13	3	4	1	AISRIAASYRPDY	2	13

IGHD1 MN IgD- 65	4-39	6-13	3	4	1	HWGVAAAGNPPYYFDY	1	16
IGHD1 MN IgD- 49	1-69	6-19	2	3	5	ESVSSGWDDAFDI	0	14
IGHD1 MN IgD- 75	3-21	6-19	3	4	2	VEVAVAGNYFDY	0	12
IGHD1 MN IgD- 57	3-23	6-19	1	4	2	EGRQWLVDY	1	10
IGHD1 MN IgD- 77	3-23	6-19	2	4	1	PNSGWFDY	0	8
IGHD1 MN IgD- 60	3-49	6-19	2	4	2	DSSGWGNYYFDY	0	12
IGHD1 MN IgD- 92	4-39	6-19	2	4	1	LVRYSWGWDY	1	11
IGHD1 MN IgD- 85	3-9	6-25	2	5	1	PKGRYSRRGFDP	4	12
IGHD1 MN IgD- 70	3-21	6-6	2	4	1	TLYSSSPFDY	0	10
IGHD1 MN IgD- 78	3-9	6-6	2	6	2	EYSSSSGWGYYYYGMDV	0	18
IGHD1 MN IgD- 81	3-30- 3	/	/	5	1	GYVGVTFPHLFVSGWFDP	1	19

Sequenzen transitionaler B-Zellen (CD10<sup>+</sup>) der untersuchten Person III.3. (siehe Tabelle 16, Abbildungen 5-11):

	VH	DH	RF	JH	(-)	CDR3 (aa)	(+)	Länge
IGHD1 NE IgD- 49	1-69	/	/	2	2	GTVADTRYFDL	1	11
IGHD1 NE IgD- 50	3-21	6-6	2	6	2	ELRYSSGGYYYYGMDV	1	17
IGHD1 NE IgD- 52	3-7	2-15	2	4	1	WGLYCSCGSCYSGVFDY	0	17
IGHD1 NE IgD- 53	3-21	2-15	2	3	0	GRPNLGYCSCGSCGLSSI	1	18
IGHD1 NE IgD- 54	3-23	2-2	3	4	4	DSEDIVVPAAHFDY	1	15
IGHD1 NE IgD- 55	3-30- 3	4-17	3	2	2	GNQDNTVTAYWYFDL	0	15
IGHD1 NE IgD- 57	3-11	5-5	2	6	3	DDRGYSYGYSGCGMD	1	15
IGHD1 NE IgD- 62	1-69	3-10	2	5	1	RIYSGSTSPNWFDP	1	15

## Anhang

IGHD1 NE IgD- 63	1-18	2-15	2	2	2	DGCSGGSCYSGWYFDL	0	17
IGHD1 NE IgD- 64	3-30- 3	6-19	2	3	3	EMAGGYSSGWYGWDAFDI	0	19
IGHD1 NE IgD- 67	4-59	2-15	2	5	0	ARASGGARVGP	2	11
IGHD1 NE IgD- 69	3-7	6-6	3	4	2	EGRIAARPGDY	2	11
IGHD1 NE IgD- 71	3-23	3-22	2	1	2	DGYDSSGYYPGLGYFQH	1	18
IGHD1 NE IgD- 72	3-23	4-17	3	6	1	SKTTVKTYYYYYGMDV	2	16
IGHD1 NE IgD- 73	1-3	5-5	3	3	4	DPEAMVVRDAFDI	1	13
IGHD1 NE IgD- 74	3-23	3-10	3	3	3	DHGRGVRGVPDAFDI	3	15
IGHD1 NE IgD- 75	3-21	6-6	2	4	1	DFYSSSSGG	0	9
IGHD1 NE IgD- 76	1-2	3-22	2	5	2	AHYDRGNWFDP	2	11
IGHD1 NE IgD- 78	3-30	2-15	3	4	2	DGPSGIVVVVAATPSYFDY	0	19
IGHD1 NE IgD- 79	1-24	3-22	2	6	1	GIRPYYYGMDV	1	11
IGHD1 NE IgD- 80	3-43	6-19	2	4	3	ARDSSGWYEGGLDY	1	14
IGHD1 NE IgD- 82	4-61	2-2	3	5	2	GDIVVVAAILGWFPD	0	15
IGHD1 NE IgD- 83	1-18	5-24	2	2	4	DGFVYDMAARGREAWYFDL	2	19
IGHD1 NE IgD- 84	3-64	/	/	4	3	EGKDSSSSPKFDY	2	13
IGHD1 NE IgD- 85	4-39	5-5	3	6	2	RDTKSTVSLDV	2	11
IGHD1 NE IgD- 86	3-23	6-19	2	5	1	SGGYSSGYFPNWFDP	0	15
IGHD1 NE IgD- 88	1-24	6-19	3	4	1	AVAAYGYLDY	0	10
IGHD1 NE IgD- 90	3-15	/	/	5	0	GGSRSG	1	6
IGHD1 NE IgD- 91	3-23	3-10	3	3	2	TMVRGLFDAFDI	1	12
IGHD1 NE IgD- 93	3-11	3-10	1	4	2	QWFGELLPDY	0	10

## Anhang

IGHD1 NE IgD- 95	1-8	3-10	2	6	1	TPRPGSGSYKGYYYGMDV	2	20
IGHD1 NE IgD- 96	1-18	4-17	2	6	3	GIPDYGDYYYGMDV	0	14
IGHD1 NE IgD- 63	1-18	3-10	2	3	2	SDRNYGSGKAFDI	2	13
IGHD2 NE IgD- 64	3-11	/	/	5	2	IHSNGGKDG FDP	2	12
IGHD1 NE IgD- 65	3-11	3-22	2	4	2	DPTYDSSGYYPY	0	13
IGHD1 NE IgD- 66	7-4-1	6-19	2	5	2	GEPQSGWYYNW FDP	0	15
IGHD1 NE IgD- 67	1-3	/	/	5	2	DRGGVAW FDP	1	10
IGHD1 NE IgD- 68	1-3	3-10	2	5	0	ASSGYYYGSGSYSG	0	14
IGHD1 NE IgD- 69	1-8	6-19	3	3	3	THGITEAVAGNDAFDI	1	17
IGHD1 NE IgD- 70	3-23	/	/	5	2	DFKLVMGQAGIDP	1	14
IGHD1 NE IgD- 71	3-15	6-19	3	6	2	DHPSCIAVAGPCRYYYGMDV	2	21
IGHD1 NE IgD- 72	4-39	6-13	2	4	1	LGRPSSSSWYPLKYYFDY	2	18
IGHD1 NE IgD- 79	4-59	5-24	2	4	1	VARDGYNY	1	8
IGHD1 NE IgD- 80	3-48	2-8	2	6	2	EGGDRYCTNGVC	1	12
IGHD1 NE IgD- 81	3-23	5-12	/	/	2	DPKSGPIDY	1	9
IGHD1 NE IgD- 92	1-2	3-22	2	6	4	DGPQDPYYYDSVGYSGGGAYGMDV	0	24
IGHD1 NE IgD- 95	3-48	3-22	2	4	2	SSPDSSGYAKIDY	1	14
IGHD1 NE IgD- 50	3-21	5-5	2	4	2	DLGAPIQLWGYFDY	0	15
IGHD1 NE IgD- 51	3-23	/	/	4	1	MGFFDY	0	6
IGHD1 NE IgD- 52	3-11	3-22	3	6	2	DGVVVVPRQVPYYYGMDV	1	18
IGHD1 NE IgD- 82	3-30- 3	5-24	3	6	3	DYVEMATITYYYYYGMDV	0	19
IGHD1 NE IgD- 86	1-69	3-22	2	1	2	GSGDSSGYEYFQH	1	13

## Anhang

---

IGHD1 NE IgD- 90	3-23	/	/	4	3	RCEEQCFDY	1	9
IGHD1 NE IgD- 91	3-33	5-24	2	4	3	DSGDGYNSPDY	0	11
IGHD1 NE IgD- 49	1-69	/	/	2	2	GTVADTRYFDL	1	11