

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



**Analyse der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung bei Patienten mit  
chronischer Immunthrombozytopenie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Daniel Schuster**  
aus Herrieden

**Würzburg, Dezember 2019**

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

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Martin Fassnacht-Capeller

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2020**

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Immunthrombozytopenie (ITP)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Einteilung der ITP .....	1
1.1.2	Pathophysiologie der ITP .....	2
1.1.3	Verlauf und Therapie der ITP .....	3
1.2	<b>B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung</b> .....	<b>5</b>
1.2.1	B-Zell-Entwicklung: Somatische Rekombination und Bildung von B-Zell-Rezeptoren im Knochenmark.....	7
1.2.2	B-Zell-Toleranz: Zentrale und periphere Toleranz .....	8
1.2.3	B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen.....	11
1.2.4	B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen .....	12
1.2.5	Durchflusszytometrische Phänotypisierung von B-Zell-Subpopulationen beim Menschen.....	13
1.3	<b>Arbeitsthema: Veränderungen der B-Zellreihe in der chronischen ITP</b> ....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	<b>Material</b> .....	<b>17</b>
2.2	<b>Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.2.1	Probengewinnung .....	21
2.2.2	Erstellen von Färbeschemata für die durchflusszytometrische Analyse .....	24
2.2.3	Datenerhebung und Analysestrategie der durchflusszytometrischen Messungen.....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	<b>Darstellung der Patientenkohorte</b> .....	<b>29</b>

<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Blutes.....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Durchflusszytometrische Analysestrategien der B-Zell-Subpopulationen von Blutproben.....	31
3.2.2	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Blutproben .....	33
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Knochenmarks .....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Durchflusszytometrische Analysestrategien von B-Zell-Subpopulationen von Knochenmarkproben.....	42
3.3.2	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Knochenmarkproben .....	43
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen der Milz.....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Durchflusszytometrische Analysestrategien der B-Zell-Subpopulationen von Milzproben.....	45
3.4.2	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Milzproben .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1	Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Blutes.....	63
4.2	Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Knochenmarks .....	67
4.3	Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen der Milz.....	68
4.4	Vergleich der B-Zell-Verteilung der primären ITP mit ausgewählten Beispielen der sekundären ITP .....	70
4.5	Zukünftige Therapieansätze bei chronischer ITP .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

10	Anhang.....	94
10.1	Danksagung.....	94
10.2	Lebenslauf.....	95

## 1 Einleitung

### 1.1 Immunthrombozytopenie (ITP)

Die Immunthrombozytopenie (ITP) kann in eine primäre Form, die nicht durch eine andere Erkrankung verursacht wird, und in eine sekundäre Form, die im Zusammenhang mit anderen Grunderkrankungen steht, eingeteilt werden [1]. Es sind sowohl Erwachsene als auch Kinder betroffen [2]. Im Zentrum der Erkrankung steht die erhöhte Blutungsneigung, die durch einen immunologisch vermittelten Abbau der Thrombozyten, hauptsächlich durch autoreaktive Antikörper, bedingt ist [3]. Diverse Therapieoptionen, wie die Gabe von Glucocorticoiden, anderen Immunsuppressiva und B-Zell-depletierenden monoklonalen Antikörpern sowie, das Verabreichen von Blutplättchenbildung stimulierenden Substanzen, stehen heutzutage zur Verfügung. Zusätzlich ist eine invasive Behandlung der ITP mit der Entfernung der Milz eine Option [4, 5].

#### 1.1.1 Definition und Einteilung der ITP

Bei der primären Immunthrombozytopenie werden die körpereigenen Thrombozyten zum einen durch autoreaktive Antikörper angegriffen und teilweise zerstört [1, 6], zum anderen spielen auch T-Zell vermittelte (zytotoxische) Prozesse und Störungen bei der Bildung der Thrombozyten im Knochenmark eine Rolle [7]. Die Diagnosestellung der ITP ist eine Ausschlussdiagnose, bei der eine Thrombozytopenie mit einer Blutplättchenzahl von  $<100 \times 10^9/L$  im Blut auftritt [6]. Die sekundäre ITP wird durch ein multifaktorielles Geschehen bestimmt. Hierbei sind häufig vererbte oder erworbene Krankheiten prädisponierend, wie z. B. chronische Infektionskrankheiten durch das Helicobacter pylori-Bakterium [8], das humane Immundefizienz-Virus (HIV) [9], aber auch Autoimmunkrankheiten wie die Rheumatoide Arthritis oder der Systemische Lupus Erythematoses (SLE). Zusätzlich kann eine sekundäre Immunthrombozytopenie im Rahmen von primären Immundefekten auftreten.

Bei etwa 80 % der erkrankten Erwachsenen liegt eine primäre ITP vor [10, 11]. Die Inzidenz der primären ITP liegt bei ungefähr 3,3 auf 100 000 Erwachsenen pro Jahr, bei einer Prävalenz von 9,5 auf 100 000 Erwachsenen und steigt mit dem Lebensalter an [12, 13]. Frauen im mittleren Alter sind etwas häufiger betroffen als Männer, wohingegen bei Personen über 65 Jahren die Verteilung ausgeglichen ist [14]. Bei Kindern liegt die Inzidenz mit ca. 6 auf 100 000 Kindern pro Jahr hingegen höher [11, 13].

Die ITP lässt sich zeitlich in drei Phasen einteilen. Die ersten drei Monate nach der Diagnose werden als „neu-diagnostizierte ITP“ bezeichnet, statt früher „akute ITP“. Die zweite Phase bis einschließlich 12 Monate nach der Diagnose wird als „persistente ITP“ bezeichnet. Dauert die ITP länger als 12 Monate an, spricht man von einer „chronischen ITP“. Als refraktär wird die Erkrankung bezeichnet, wenn diese nach Splenektomie weiterhin andauert [6].

### **1.1.2 Pathophysiologie der ITP**

Die primäre ITP wird hauptsächlich durch IgG-Autoantikörper, die sich gegen körpereigene Thrombozyten und Megakaryozyten richten, verursacht. IgM- und IgA-Antikörper spielen im Vergleich zu IgG-Antikörpern eine eher untergeordnete Rolle [15, 16]. Die Autoantikörper binden an bestimmte Glykoproteine (GP) auf der Zelloberfläche der Thrombozyten, wie GPIIbIIIa und GPIb-IX-V [17]. Solche mit Autoantikörpern beladene Thrombozyten werden vermehrt abgebaut [18]. Hierbei scheinen anti-GPIIbIIIa Antikörper vornehmlich eine Fc-Rezeptor-abhängige Phagozytose der Thrombozyten in der Milz zu vermitteln, wohingegen anti-GPIb-IX-V Antikörper eine Desialylierung und einen Fc-Rezeptor-unabhängigen Abbau der Thrombozyten in der Leber über Ashwell-Morell Rezeptoren induzieren [19, 20].

Bei ITP-Patienten werden nicht nur Autoantikörper gegen Oberflächenstrukturen der Blutplättchen gefunden, sondern auch gegen zytosolische Proteine. Es wird vermutet, dass diese gelösten Proteine durch antigenpräsentierende Zellen vermehrt T-Zellen dargeboten werden [21].

Des Weiteren werden auch Autoantikörper detektiert, die gegen Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten im Knochenmark, gerichtet sind. Durch diese scheinen die Megakaryozyten in ihrem Reifungsprozess gestört zu werden und die Neubildung von Thrombozyten im Knochenmark wird beeinträchtigt [22, 23]. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte z. B. ein unnatürlicher Verlauf der Apoptose und ein verändertes Wachstum der Megakaryozyten in der Zellkultur gezeigt werden [22, 24].

Neben den autoreaktiven Antikörpern scheinen auch autoreaktive T-Zellen eine Rolle in der Verminderung von Thrombozyten und Megakaryozyten in der ITP zu spielen [25, 26]. So sind bei manchen ITP-Patienten zytotoxische CD8+ T-Zellen, die Thrombozyten direkt lysieren können, nachweisbar [27].

Jedoch sind bei ca. 30-40 % der ITP-Patienten keine Autoantikörper detektierbar [28]. Daher werden die antithrombozytären Antikörper nach internationalen Leitlinien auch nicht als essentielles Diagnosekriterium der ITP gefordert [29].

### **1.1.3 Verlauf und Therapie der ITP**

Bei der ITP sind Symptome häufig, die aus der Thrombozytopenie resultieren, wie petechiale Einblutungen, Purpura, Schleimhautblutungen und Epistaxis. Als gravierendste, aber mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 1,5 % sehr seltene Komplikation, treten intrakranielle Blutungen auf. Im Vergleich zur Gesamtbevölkerung ist die Mortalität von ITP-Patienten um das ca. 1,5-fache erhöht. [3, 30, 31].

Im Allgemeinen ist bei der Mehrheit der erwachsenen ITP-Patienten eine medikamentöse Heilung eher selten zu erreichen, sodass die Erkrankung meist in das chronische Stadium voranschreitet [32]. Dagegen stellt die ITP bei der Mehrheit der betroffenen Kinder eine selbstlimitierende Erkrankung dar, was ein Hinweis auf unterschiedliche Krankheitsprozesse bei beiden Gruppen sein könnte [2].

Im Therapieregime der ITP besteht die erste Option in der Gabe von Glucocorticoiden oder intravenösem Immunglobulin, mit dem Ziel, den

Thrombozytenabbau zu reduzieren [33, 34]. Häufig eingesetzte Glucocorticoide, wie Dexamethason oder Prednisolon, scheinen die Zusammensetzung des T-Zell-Kompartiments positiv zu beeinflussen, indem sich die Zahl der regulatorischen T-Zellen sowie T-1-Helferzellen (Th1) und T-2-Helferzellen (Th2) wieder normalisiert und die regulatorischen Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und transformierende Wachstumsfaktor-Beta (TGF- $\beta$ ) ansteigen [35, 36].

An zweiter Stelle des Therapieregimes steht die Splenektomie oder die Gabe des chimären monoklonalen Antikörpers Rituximab, der sich gegen den Oberflächenmarker CD20 der B-Zellen richtet. Hierbei stellt die Splenektomie bislang den Goldstandard mit Remissionsraten von ca. 60 % dar [37, 38]. Der Grund dafür ist, dass durch eine vollständige Entfernung der Milz der Abbau der Thrombozyten reduziert wird und keine B- und T-Zell-Autoaktivierung mehr in dieser stattfindet. In jüngster Zeit wird die Splenektomie als Therapiemethode allerdings weniger angewandt, da eine Entfernung der Milz mit Langzeitrisiken, wie erhöhter Anfälligkeit für bakterielle Infektionen bis hin zur Sepsis und einer erhöhten Gefahr der Thromboembolie, einhergeht [39].

Als neuere Therapieoption stehen die Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten Romiplostim und Eltrombopag zur Verfügung, die durch eine vermehrte Megakaryozytenbildung zu einer Erhöhung der Plättchenproduktion im Knochenmark führen [29]. Die Erfolgsrate der Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten-Therapie liegt nach neuen Studien bei ca. 80-94 % [40].

Allgemein gibt es bei der Therapie der chronischen ITP Hinweise darauf, dass ein früher und aggressiver Therapieansatz, bestehend aus einer immunmodulierenden und einer zell-depletierenden Komponente, die beste Wirksamkeit zeigt. Ein Beispiel dafür wäre die Kombination aus Dexamethason und Rituximab [32, 41]. Schließlich hat das jeweilige Krankheitsstadium eine große Auswirkung auf die Prognose bestimmter Therapieregime [42].

## **1.2 B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung**

Die B-Lymphozyten, auch B-Zellen (von Bursa Fabricii oder bone marrow) genannt, sind ein zentraler Bestandteil des erworbenen, adaptiven Immunsystems und stellen eine Zellpopulation dar, die in der Lage ist, durch Erkennung bestimmter Antigene über B-Zell-Rezeptoren, diese als Antikörper zu produzieren und ins Blut abzugeben. Defekte in der B-Zellentwicklung, in der Selektion, sowie in der Funktion können zu Autoimmunerkrankungen, Krebs, Immundefekten und Allergien führen [43]. Einen groben Überblick über die im Folgenden beschriebenen Schritte der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung liefert Abbildung 1.

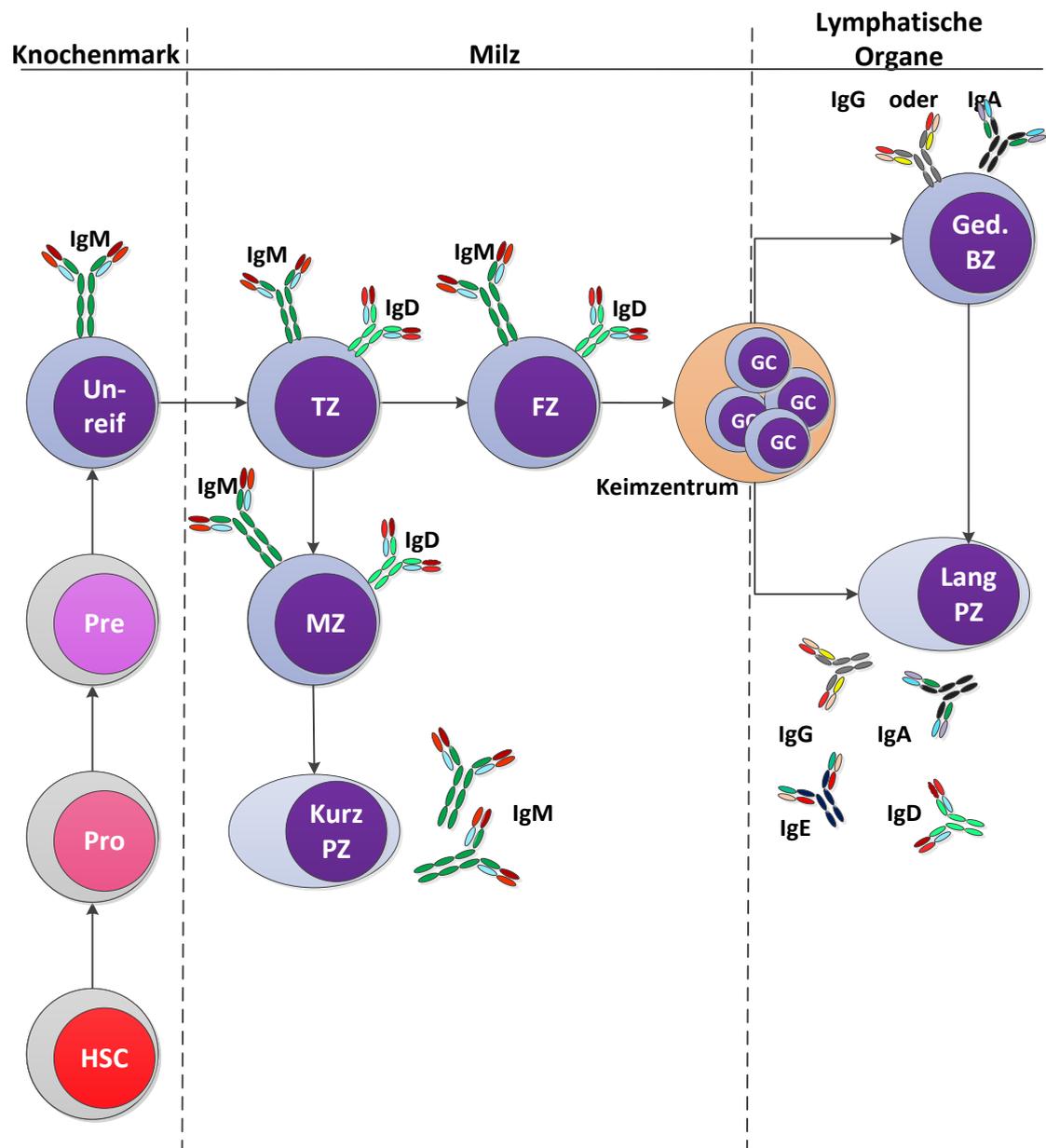


Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung.

Aus den hämatopoetischen Vorläuferzellen (HSC) entwickeln sich im Knochenmark die Pro-B-Zellen (Pro). Die Rekombination der D- und J-Gensegmente der schweren Kette findet in diesem Stadium statt. In der frühen Pre-B-Zellphase (Pre) folgt die Umlagerung des V-Gensegments der schweren Kette. Diese bildet zusammen mit den V-set-Pre-B-Zell-Ersatz- (V-preB) und lambda-ähnlichen-Leichtketten den Pre-B-Zell-Rezeptor im Zellinneren. Die erfolgreiche Umlagerung der kappa- oder lambda-Leichtkettensegmente ersetzt den V-preB-Teil des Pre-B-Zell-Rezeptors und bildet zusammen mit der schweren Kette das IgM-Molekül an der Oberfläche unreifer B-Zellen (Unreif).

Die unreifen B-Zellen migrieren in die Milz als sog. Transitional-B-Zellen (TZ). Dort vervollständigen sie ihren ersten Entwicklungsschritt je nach Spezifität ihres B-Zell-Rezeptors als sog. Marginalzone-B-Zellen (MZ) oder folliculäre B-Zellen (FZ). Beide Gruppen gehören zu den sogenannten naiven oder reifen B-Zellen.

Bei Antigenkontakt und mit der Unterstützung von neutrophilen B-Helferzellen entwickeln sich Marginalzone-B-Zellen in kurzlebige Plasmazellen (Kurz PZ), die in der Lage sind, IgM zu bilden. Follikuläre B-Zellen werden durch Bindung von Antigenen aktiviert und entwickeln sich im Keimzentrum über Keimzentrum-B-Zellen (GC) mit der Unterstützung von T-Helferzellen zu Gedächtnis-B-Zellen (Ged. BZ) oder über die Stufe der Plasmablasten zu langlebigen Plasmazellen (Lang PZ), die IgG-, IgA-, IgE- und IgD-Antikörper produzieren können.

### **1.2.1 B-Zell-Entwicklung: Somatische Rekombination und Bildung von B-Zell-Rezeptoren im Knochenmark**

Bei allen Säugetieren werden die B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark oder vor der Geburt in der fetalen Leber gebildet [44, 45]. Hierbei entstehen aus den hämatopoetischen Stammzellen die Pro-B-Zellen. In dieser frühen Phase werden im Knochenmark die Gensegmente, die den variablen Teil des sich später an der Oberfläche befindenden B-Zell-Rezeptoren kodieren, funktionell neu umgelagert [46]. Diese als Rearrangement oder Rekombination bezeichnete Umlagerung, dient dazu, durch Neukombination der VDJ-Regionen der schweren Kette (H-Kette) ein umfangreiches B-Zell-Rezeptor-Repertoire gegen auftretende Antigene zu ermöglichen. Diese VDJ-Rekombination wird auch als somatische Rekombination bezeichnet. Zuerst werden bei den Pro-B-Zellen die D- und J-Gensegmente der schweren Kette neu kombiniert, gefolgt von einer Neuordnung der V-Segmente an diese DJ-Gensegmente. Die somatische Rekombination ermöglicht somit die Bildung eines großen Pools an verschiedenen B-Zell-Rezeptoren, die rechnerisch in der Lage sind, ca.  $5 \times 10^{13}$  verschiedene Antigene zu binden und zu erkennen. Da die B-Zell-Rezeptoren als Vorlage für die spätere Antikörperproduktion fungieren, werden diese oft auch als „membrangebundene Form des Antikörpers“ bezeichnet.

Nach erfolgreicher VDJ-Genumlagerung der schweren Kette in der Pro-B-Zell-Phase wird diese als sogenannte schwere- $\mu$ -Kette von Pre-B-Zellen in der Proteinbiosynthese hergestellt. Ziel der Pre-B-Zellphase ist es, die Pre-B-Zell-Rezeptoren, als Vorstufe der späteren B-Zell-Rezeptoren, zu bilden und Gensegmente der leichten-Ketten in dieser Phase neu zu kombinieren. Bei Pre-B-Zellen sind sogenannte Ersatz-leichte-Ketten, bestehend aus lambda-5 (CD179B)- und V-Pre-B-Zell-Surrogat-Leichtketten (V-PreB; CD179A) vorhanden. Diese

schließen sich mit der schweren- $\mu$ -Kette und den transitorischen Signalüberträgermolekülen Ig-alpha (CD79a) und Ig-beta (CD79b) zusammen und bilden die Pre-B-Zell-Antigen-Rezeptoren (Pre-BCR) im Zellinneren [45, 47]. Die Expression des Pre-BCR hat mehrere Auswirkungen: Zum einen werden durch spezielle Enzyme die Neuordnung und die Expression der Gensegmente der schweren Kette auf dem homologen Chromosom ausgeschaltet, dies wird allelische Exklusion genannt. Zum anderen werden durch die Pre-BCR die Umlagerung der Gensegmente der leichten Kette und die Inaktivierung der Expression der Ersatzleichten-Ketten angestoßen [48, 49]. Die Pre-B-Zellen teilen sich ein bis zwei Mal, ordnen die Gensegmente für die kappa- oder lambda-Leichtketten neu an, und bilden schließlich Leichte-Ketten-Proteine.

Die nächste Population der unreifen B-Zellen ist durch B-Zell-Rezeptoren an der Zelloberfläche in Form von IgM-Molekülen charakterisiert. Diese ergeben sich aus dem Zusammenschluss der leichten-Kette-Proteine mit der  $\mu$ -schweren Kette. Die unreifen B-Zellen proliferieren und differenzieren noch nicht nach Antigenkontakt, sondern müssen zunächst die Stufe der Toleranztestung durchlaufen [49-51].

### **1.2.2 B-Zell-Toleranz: Zentrale und periphere Toleranz**

Überschießende Immunreaktionen gegen körpereigene Zellen resultieren häufig aus dem Verlust der immunologischen Toleranz, bestehend aus der zentralen und peripheren Toleranz. Die zentrale Toleranz findet in den primären lymphatischen Organen, d. h. für B-Zellen im Knochenmark, statt. Der zentralen Toleranz liegen die Mechanismen der Rezeptor-Editierung, der klonalen Deletion und der Anergie zugrunde [52]. Als Rezeptor-Editierung wird die sekundäre Rekombination der V- und J-Gensegmente der leichten Kette von autoreaktiven IgM-positiven-unreifen-B-Zellen bezeichnet. Dadurch können neue, nicht mehr autoreaktive, B-Zell-Rezeptoren entstehen und es wird verhindert, dass autoreaktive B-Zellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf austreten können [53-56]. Des Weiteren können autoreaktive unreife B-Zellen im Knochenmark über die klonale Deletion eliminiert werden, dabei werden Apoptosesignale durch Bindung von körpereigenen Antigenen an den B-Zell-Rezeptor induziert. Bei der zentralen

Toleranz spielen, laut Analysen des B-Zell-Repertoires und dessen Reaktivität bei Patienten mit monogenen Defekten (primäre Immundefekte), Signalwege des B-Zell-Rezeptors und der Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Selektion der B-Zellen. Diese werden durch intrinsische B-Zellfaktoren reguliert. Die unreifen B-Zellen, die den Prozess der zentralen Toleranz überstehen und aus dem Knochenmark in die Peripherie wandern, werden dann Transitional-B-Zellen genannt [57]. Die periphere B-Zell-Toleranz besteht aus der Anergie, der fehlenden zellulären Aktivierbarkeit, unter anderem durch das Fehlen kostimulatorischer Signale, und dem Ausschluss aus den Lymphfollikeln mit anschließender Apoptose. Dieses Konzept wurde in einigen Mausmodellen bestätigt [58-60].

### **1.2.3 B-Zell-Reifung und Keimzentrumsreaktion in der Milz**

Nach Austritt der unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark und nach erfolgreichem zentralen Toleranzprozess bezeichnet man diese als Transitional-B-Zellen. Diese wandern durch die Blut- und Lymphgefäße und passieren verschiedene sekundäre lymphatische Organe, wie die Lymphknoten, die Tonsillen, die Peyer-Plaques, die Schleimhäute und die Milz, wobei in dieser Arbeit die Vorgänge im Blut und in der Milz im Vordergrund stehen.

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass außerhalb des Knochenmarks die Milz den Hauptreifungsort der konventionellen B2-Zellen, die aus dem Knochenmark stammen, darstellt. Die aus der fetalen Leber stammenden B1-Zellen, reifen hingegen in Peritoneal- und Pleurahöhlen [61, 62]. Für die Migration der B-Zellen in die Follikel der Milz, für die Ausbildung der Keimzentren, und für den Austritt aus Geweben in Blut oder Lymphe sind Adhäsionsmoleküle und Wechselwirkungen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Bedeutung [63, 64].

Weiterhin konnte in Mäusen gezeigt werden, dass die Marginalzone und die Follikel der Milz von B-Zellen nach Verlassen des Knochenmarks besiedelt werden, um dort die vollständige Reifung in folliculäre B-Zellen oder B-Zellen der Marginalzone zu vollziehen. Beide gehören zur Gruppe der naiven bzw. reifen B-Zellen [57]. Die B-Zellen der Marginalzone und Mukosa sind eng mit der T-Zell-

unabhängigen Immunantwort verknüpft. In der Marginalzone der Milz stellen die B-Zellen die erste Abwehr gegen aus dem Blut stammende Antigene wie z. B. Zellwandbestandteile (Polysaccharide, Glykolipide) von Bakterien dar. Dabei werden innerhalb der ersten drei Tage einer bakteriellen Infektion vermehrt kurzlebige Plasmazellen produziert mit Hilfe von Signalen aus der Bindung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPS) an Toll-like-Rezeptoren. Diese kurzlebigen Plasmazellen bilden, neben einigen IgG-Subtypen, hauptsächlich IgM-Antikörper und besitzen eine relativ geringe Affinität zum Antigen [45, 57, 65].

Die meisten reifen B-Zellen werden auch als folliculäre B-Zellen bezeichnet. Sie sitzen in den Follikeln der sekundären lymphatischen Organe und werden dort durch Protein-Antigene aktiviert. Häufig wechseln die folliculären B-Zellen zwischen den lymphatischen Organen und werden auch als rezirkulierende B-Zellen bezeichnet. Dabei finden die Transitional-B-Zellen den Weg in die Follikel durch Wechselwirkungen mit ihrem Chemokinrezeptor und den Chemokinen, die z. B. von den folliculären dendritischen Zellen und Stromazellen sezerniert werden [45]. Beim Menschen sind die Transitional-B-Zellen sowohl durch IgM- als auch IgD-B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet, wobei beide Membran-Immunglobuline die gleiche Antigen-spezifität aufweisen. Das Oberflächenmolekül CD27 wird auf diesen Zellen nicht exprimiert [66]. Die Immunglobulin-Rezeptoren werden direkt durch gelöste Proteinantigene, oder indirekt durch Präsentation von Protein-Antigenen der Antigen-präsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen, aktiviert. Die folliculären B-Zellen internalisieren und verarbeiten das gebundene Antigen weiter, wandern anschließend in die T-Zell-Zone des lymphatischen Organs und präsentieren ihr gebundenes Protein-Antigen über den Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC-II) an T-Helfer-Zellen, die dann zusätzliche Aktivierungsstoffe, wie Zytokine, ausschütten [45, 57].

Nach der Aktivierung der folliculären B-Zellen durch die T-Zell-abhängige Immunantwort migrieren diese wieder zurück in die Follikel und bilden dort die sogenannten Keimzentren aus. In diesen vermehren und differenzieren sich die

aktivierten folliculären B-Zellen. Des Weiteren finden hier auch die Affinitätsreifung und der Immunglobulinklassenwechsel statt. Beim letzteren werden die Isotypen der schweren Kette von aktivierten IgM- und IgD-exprimierenden Zellen verändert, um über unterschiedliche Klassen an schweren Ketten weitere Immunglobuline, wie IgA, IgE oder IgG, bilden zu können. Aus dem Vorgang der Affinitätsreifung ergibt sich eine Erhöhung der Bindungsaffinität von Antikörpern zu einem bestimmten Antigen. Dies wird durch eine somatische Mutation der Immunglobulin-Gene, mit sich anschließender Selektion der am stärksten bindenden Antikörper, erreicht. Schließlich sind die Keimzentren auch der Ort der Bildung der Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten. Ein Teil dieser kurzlebigen und antikörperbildenden Plasmablasten differenziert weiter zu langlebigen Plasmazellen [45, 67, 68].

### **1.2.3 B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen**

Die humorale Immunabwehr mit der Bildung der Antikörper wird über die Erkennung von Antigenen an den naiven (reifen) B-Zellen initiiert. Bei der primären Immunantwort binden Antigene an die membrangebundenen IgM- und IgD-Antigen-Rezeptoren auf naiven B-Zellen und aktivieren diese, wenn zwei oder mehr Antigen-Rezeptoren durch ein multivalentes Antigen überbrückt werden. Die auf diese Weise, oder mit Hilfe von dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen, aktivierten naiven B-Zellen können daraufhin in Keimzentren proliferieren oder sich über die Zwischenstufe der Plasmablasten zu Plasmazellen differenzieren [45]. Plasmazellen produzieren und sezernieren die Antikörper und sind somit die zelluläre Grundlage der humoralen Abwehr des Körpers. Durch diese Antikörper werden bestimmte Antigene in einer Antigen-Antikörper-Reaktion neutralisiert [69].

Anhand von Untersuchungen von mit dem B-Zell-Therapeutikum Rituximab behandelten Patienten wurde festgestellt, dass sowohl kurzlebige Plasmablasten und Plasmazellen, als auch langlebige Plasmazellen im Menschen vorhanden sind [70, 71]. Letztere überleben hauptsächlich in speziellen Nischen des Knochenmarks und entzündetem Gewebe [67, 72] oder differenzieren nach kontinuierlicher Antigen-Exposition [72, 73]. Des Weiteren wird angenommen,

dass sich die langlebigen Plasmazellen aus B-Zellen, in Verbindung mit folliculären T-Helferzellen, in der Keimzentrumsreaktion entwickeln [74]. Da die langlebigen Plasmazellen einen Teil der Abwehr vor Reinfektion darstellen, werden Sie auch Gedächtnis-Plasmazellen genannt, um den Bezug zu den Gedächtnis-B-Zellen herzustellen [75]. Hierbei sezernieren die langlebigen Plasmazellen, die sich als nicht-teilende Zellen im Knochenmark befinden, spezielle Antikörper über Zeiträume von bis zu einem Jahr, unabhängig von B-Zell-Aktivierung, T-Zellen oder Antigenexposition [76]. Darüber hinaus wurden auch in entzündetem Gewebe langlebige Plasmazellen gefunden, die durch Autoantikörperbildung die Entzündung vor Ort weiter verstärken können [77]. Allgemein scheinen die langlebigen Plasmazellen sehr resistent gegenüber Bestrahlung, Immunsuppressiva oder Rituximab zu sein [67]. Die kurzlebigen Plasmablasten und Plasmazellen exprimieren vermehrt das humane Leukozyten Antigen (HLA-DR) auf ihrer Zelloberfläche [78, 79]. Diese kurzlebigen Zellen sind für die Therapie mit konventionellen Immunsuppressiva wie z. B. Rituximab oder Cyclophosphamid, leichter zugänglich, wohingegen die langlebigen Gedächtnisplasmazellen für die Chronizität und Therapierefraktärität von Autoimmunerkrankungen mitverantwortlich sind [67].

### **1.2.4 B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen**

Die Gedächtnis-B-Zellen, wie auch die Plasmazellen, differenzieren sich aus naiven B-Zellen des Keimzentrums nach Einwirkung durch verschiedene Signale [80]. Sie sind an der sekundären Immunantwort, d. h. dem Erkennen und Bekämpfen von bereits bekannten Antigenen, beteiligt. Dabei können sie sehr schnell und leicht aktiviert werden und bilden nach Differenzierung in Plasmazellen sehr schnell eine große Menge von Antikörpern. Weitere Merkmale der Gedächtnis-B-Zellen sind Isotypen- bzw. Immunglobulin-Klassenwechsel und Affinitätsreifung [45, 69]. Die Ausbildung von sogenannten „switched memory B cells“, also Gedächtnis-B-Zellen mit einem Klassenwechsel des Ig-Isotyps, und Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel findet hauptsächlich in den Keimzentren der Milz und Lymphknoten statt. Dies wird durch eine Antigen-induzierte T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung ermöglicht [81, 82]. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass

Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel teilweise T-Zell-unabhängig und nicht nur in Keimzentrumsreaktionen entstehen [83, 84].

Im Allgemeinen benötigen die Gedächtnis-B-Zellen eine erneute Antigen-Stimulation und können je nach Menge des Antigens reguliert werden [69]. Zum Teil können die Gedächtnis-B-Zellen auch über Jahrzehnte nach Antigen-Kontakt persistieren, z. B. nach Impfungen [85, 86]. Als Grund dafür werden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, z. B. da die Gedächtnis-B-Zellen, die durch persistierende Antigene ständig aktiviert werden und in kurzlebige Plasmazellen differenzieren, eine lange Immunität aufrechterhalten [87]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bildung von Ersatzrezeptoren für den B-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche von z. B. mit Epstein-Barr-Virus (EBV) infizierten Zellen [88]. Dadurch wird das Überleben der Gedächtnis-B-Zellen auch ohne extrinsische Faktoren ermöglicht [89, 90]. Des Weiteren überleben und ruhen Gedächtnis-B-Zellen in speziellen „Nischen“ im Körper. Sie verbleiben dabei in sekundären lymphatischen Organen, v.a. in der Milz, oder migrieren in das Knochenmark [91].

### **1.2.5 Durchflusszytometrische Phäotypisierung von B-Zell-Subpopulationen beim Menschen**

Die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks exprimieren auf der Zelloberfläche CD34, aber noch kein CD10. Dieses ist hingegen bei der folgenden Stufe, den Pro-B-Zellen zusammen mit CD34 zu finden. Des Weiteren finden sich die V-preB und terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) als intrazelluläre Marker und vermehrt CD38, sowie der klassische B-Zell-Marker CD19, auf der Zelloberfläche. Die entstehenden Pre-B-Zellen tragen die gleichen Marker. An der Oberfläche wird hier außerdem vermehrt CD20 exprimiert. Die danach gebildeten unreifen B-Zellen sind durch Verlust der oben genannten intrazellulären Marker und die Expression von IgM und CD21 auf der Zelloberfläche charakterisiert [92]. Die ins Blut abgegebenen Transitional-B-Zellen tragen, im Vergleich zu den unreifen B-Zellen, weniger CD10 auf der Zelloberfläche und zeigen neben einer hohen Expression von IgM eine niedrige (beginnende) Expression von IgD. Die in der Milz befindlichen Marginalzone-B-Zellen tragen

zusätzlich noch IgD auf der Oberfläche und die Follikulären-B-Zellen noch den Oberflächenmarker CD22 [49].

Beim Durchlaufen der Keimzentrumsreaktion wird die CD27 Expression auf den B-Zelloberflächen induziert [93]. Nach Herkunft und mit Hilfe von spezifischen Oberflächenmarkern lassen sich die Gedächtnis-B-Zellen in drei Untergruppen einteilen: Die CD27- und IgG+ Gedächtnis-B-Zellen aus der Milz, die CD27+IgM+IgD- und die CD27+IgM-IgD- IgG+ oder IgA+ Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel aus den Keimzentren sowie die CD27-IgA+ Gedächtnis-B-Zellen aus dem Darm. Zum Teil finden sich geringe Mengen an CD27-IgG+ und CD27-IgA+ Gedächtnis-B-Zellen rezirkulierend im Blut [84, 94]. Die Verteilung der einzelnen Subpopulationen innerhalb der CD27+ Gedächtnis-B-Zellen im Blut stellt sich folgendermaßen dar: CD27+IgM+IgD- Gedächtnis-B-Zellen (ca. 20 %), CD27+IgM+IgD+ Gedächtnis-B-Zellen (ca. 40 %) und CD27+IgM-IgD- Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel (ca. 40 %) [95, 96]. Des Weiteren gibt es eine CD27+ B-Zell Untergruppe, die nur IgD und kein IgM exprimiert und im Blutkreislauf detektiert werden kann, deren Vorkommen aber nur mit < 1 % beschrieben ist [95]. Die sich weiter aus Aktivierung und Differenzierung bildenden antikörperproduzierenden Plasmazellen und Plasmablasten sind durch vermehrte Expression von CD27, CD38 und HLA-DR gekennzeichnet [49, 97].

Eine vollständige Liste aller für diese Arbeit relevanten immunphänotypischen Marker befindet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1: Intrazelluläre- und Oberflächenmarker in der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung.**

Zellklassen	Intrazell. Marker		Oberflächenmarker												
	TdT	VpreB	CD 10	CD 19	CD 20	CD 21	CD 22	CD 27	CD 34	CD 38	Ig M	Ig D	Ig A	Ig G	HLA-DR
Hämatopoetische Stammzelle									CD 34						
Pro-B-Zelle	TdT	VpreB	CD 10	CD 19	CD 20 low				CD 34	CD 38 ++					
Pre-B-Zelle	TdT	VpreB	CD 10	CD 19	CD 20					CD 38 ++					
Unreife B-Zelle			CD 10 ++	CD 19	CD 20	CD 21				CD 38	Ig M				
Transitional B-Zelle			CD 10 +	CD 19	CD 20	CD 21				CD 38	Ig M				
Reife B-Zelle				CD 19	CD 20						Ig M				
Marginalzone B-Zelle				CD 19	CD 20	CD 21					Ig M	Ig D			
Follikuläre B-Zelle				CD 19	CD 20	CD 21	CD 22				Ig M	Ig D			
Gedächtnis B-Zelle				CD 19	CD 20	CD 21		CD 27			Ig M		Ig A	Ig G	
Plasmazelle				CD 19 low	CD 20 low			CD 27 ++		CD 38 ++					HLA-DR
Plasmablast				CD 19				CD 27 ++		CD 38					HLA-DR <sup>+</sup>

### **1.3 Arbeitsthema: Veränderungen der B-Zellreihe in der chronischen ITP**

Die chronische ITP stellt eine komplexe Immunerkrankung dar, bei der hauptsächlich autoreaktive Antikörper des IgG-Typs eine Rolle spielen. Die genaue Pathophysiologie der ITP ist allerdings noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt Indizien dafür, dass bei ITP-Patienten eine Erhöhung der B-Zellzahl insgesamt und auch einiger B-Zell-Untergruppen wie z. B. der Plasmazellen vorliegt [98]. Es lassen sich, vor allem in der Milz, erhöhte Proliferationsraten und Vorkommen von B-Zellen nachweisen [99, 100]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Milz, neben dem Knochenmark, auch bei der Ausbildung autoreaktiver IgG-Antikörper beteiligt ist [15].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll untersucht werden, ob Unterschiede in der B-Zell Entwicklung und -Differenzierung zwischen Patienten mit chronischer ITP und Gesunden bestehen. Zur Untersuchung der Verteilung von einzelnen Subpopulationen innerhalb der B-Zellreihe wurden deshalb Knochenmark-, Blut- und Milzproben analysiert. Dafür wurden die einzelnen Gewebeprobe aufbereitet, die B-Zell-Subpopulationen anhand immunphänotypischer Marker gefärbt und mittels durchflusszytometrischer Vermessung charakterisiert. Dadurch ist es möglich, Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Entwicklung, wie auch der Differenzierung, von B-Zellen bei chronischen ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesundkontrollen herauszustellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle verwendeten Materialien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 2: Geräte.**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem	HLC Biotech, Pforzheim
BD FACSCanto® II	BD Biosciences, Heidelberg
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
EASYstrainer® Zellsiebe 70 µm: 542070	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Flüssigstickstofftank	German-cryo, Jüchen
Forma Scientific -86C Freezer, Gefrierschrank: -80 °C	Forma Scientific, Marjetta, Ohio ( USA)
Gelaire® Type BSB6, Laminar-AirFlow-Werkbank	Flow Laboratories, Meckenheim
Hund Wilovert S Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
IKA Minishaker® MS2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Liebherr® KUw 1740, Kühlschrank: 2 °C-8 °C	Liebherr-International AG, Bulle (Schweiz)
Mr.Frosty® Nalgene Cryo 1C Freezing Container: 5100-0001	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Neubauer Zählkammer Thoma, Kammertiefe 0,1 mm: 0640710	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen
pH- Meter 09070190	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
PIPETBOY acu	Integra Biosciences AG, Zizers (Schweiz)
Pipetten: 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Scotsman® AF 103 Eismaschine	Scotsman Frimon, Mailand (Italien)
Zentrifuge Hettich Mikro 120	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

**Tabelle 3: Einwegmaterialien.**

<b>Einwegmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Biosphere® FilterTips, Pipettenspitzen mit Filter: 0.5–20 µl, 2–100 µl, 100–1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar® Pipette sterile 5 ml, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CRYO.S® Gefrier Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	VWR, Darmstadt
Handschuhe: SensiCareIce® Nitrile Peha-soft® Nitrile	Medline International Germany GmbH, Kleve Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz
Pasteurpipetten Glas	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen: 0.5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg
SafeSeal® Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell Nr. 22	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
S-Monovette® Ammonium-Heparin-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® EDTA –Röhrchen (Ethylendiamintetraacetat)	Sarstedt, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel VB20	Hartenstein, Würzburg

**Tabelle 4: Labormaterialien.**

<b>Labormaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
3M® Schutzbrille	3M Deutschland GmbH, Neuss
Glaspipetten: 5 ml, 10 ml	Brand, Wertheim
Halterung für Zentrifugenröhrchen	neoLab, Heidelberg
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt
Laborflaschen: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	Schott, Mainz
Reagenzglasgestell	Hartenstein, Würzburg
Universal-Rack, Halterung für Reagiergefäße	Hartenstein, Würzburg

**Tabelle 5: Antikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
APC anti-human CD21 Antibody, Klon: Bu32	BioLegend, Koblenz	354905
APC anti-human TdT Antibody, Klon: 41A	BioLegend, Koblenz	368807
APC/Cy7 anti-human CD19 Antibody, Klon: HIB19	BioLegend, Koblenz	302218
Brilliant Violet 421 anti-human IgM Antibody, Klon: MHM-88	BioLegend, Koblenz	314515
FITC anti-human CD20 Antibody, Klon: 2H7	BioLegend, Koblenz	302303
FITC anti-human CD22 Antibody, Klon: S-HCL-1	BioLegend, Koblenz	363507
FITC anti-human CD24 Antibody, Klon: ML5	BioLegend, Koblenz	311103
Goat Anti-Human IgA FITC	SouthernBiotech, Eching	2050-02
Goat Anti-Human IgG PE	SouthernBiotech, Eching	2040-09
PE anti-human CD179a (VpreB) Antibody, Klon: HSL96	BioLegend, Koblenz	347404
PerCP/Cy5.5 anti-human CD27 Antibody, Klon: M-T271	BioLegend, Koblenz	356407
PerCP/Cy5.5 anti-human CD34 Antibody, Klon: 561	BioLegend, Koblenz	343611
PE/Cy7 anti-human CD10 Antibody, Klon: HI10a	BioLegend, Koblenz	312213
PE/Cy7 anti-human CD38 Antibody, Klon: HIT2	BioLegend, Koblenz	303515
PE Mouse Anti-Human IgD, Klon: IA6-2	BD Biosciences, Heidelberg	555779

**Tabelle 6: Chemikalien und Lösungen.**

<b>Chemikalien/Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Aqua ad iniectabilia 1000ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	160618061
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München	A9647
DMSO (Dimethylsulfoxid) >99,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A994.2
eBioscience® Fixation/ Permeabilization Diluent	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	00-5223-56
eBioscience® Permeabilization Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	00-8333

## Materialien

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Katalognummer
FicoLite-H (Human), Dichte: 1,077 g/ml	Linaris, Wertheim	GTF1511KYA
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin	S 0615
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl-Lösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg	6096595.00.00
PBS Tablets	Life technologies, Darmstadt	003002
RPMI-1640 MEDIUM (mit L-Glutamine und NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, München	R8758

**Tabelle 7: Puffer und Arbeitslösungen.**

Puffer/ Arbeitslösungen	Zusammensetzung
FACS-Puffer (1x PBS, 0,5 % BSA)	0,5 % BSA PBS-Lösung, pH 7,4 bei 2-8 °C gelagert
RPMI-1640 MEDIUM + 10 % FBS + 1 % PS	10 % FBS 1 % Penicillin/ Streptomycin in RPMI-1640 MEDIUM (mit L-Glutamine und NaHCO <sub>3</sub> ) bei 2-8°C gelagert

**Tabelle 8: Software.**

Software	Hersteller
BD FACSDIVA®6	BD Biosciences, Heidelberg
Endnote® X8	Thomson Reuters, Philadelphia, PA (USA)
FlowJo®10	FlowJo, LLC, Ashland, OR (USA)
GraphPad® Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA (USA)
Office Excel® 2010 Office PowerPoint® 2010 Office Visio® 2010 Office Word® 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probengewinnung

Die verwendeten Blut-, Knochenmark- und Milzproben wurden zunächst mittels der Dichtegradientenzentrifugationsmethode in die einzelnen Blutbestandteile aufgetrennt, um so die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) zu separieren. Außerdem wurden dabei die im Plasma gelösten Immunglobuline abgetrennt, die die folgende Immunfärbung der B-Zellen nachteilig beeinflussen könnten.

#### 2.2.1.1 Gewinnung von Blut- und Knochenmarkproben

Die venösen Blutproben von ITP-Patienten und den Gesundkontrollen, ebenso wie die Knochenmarkproben, wurden mit S-Monovette® Ammonium-Heparin-Röhrchen oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) -Röhrchen antikoaguliert und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Hierzu wurden zunächst in einem 50 ml Tube 15 ml Ficoll® (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer)-Hypaque-Zuckerlösung (FicoLite-H®) vorgelegt. Ein zweites 50 ml Tube wurde mit dem Patientenblut befüllt und mit der gleichen Menge 0,9 %-iger isotonischer NaCl-Lösung verdünnt und vermischt. Im nächsten Schritt wurde in einer 5 ml Pipette das Blut-Medium-Gemisch aufgezogen und langsam vom Rand aus auf die Oberfläche des schräg gestellten Tubes mit der Ficoll®-Lösung appliziert bis das Blutgemisch die Ficoll®-Flüssigkeit überlagerte. Zur Trennung des Blutgemisches wurde nun ein Zentrifugationsschritt angeschlossen. Hierbei wurde für 25 min bei 1500 rpm und 21°C ohne Bremse zentrifugiert. Danach ergab sich folgendes Bild:

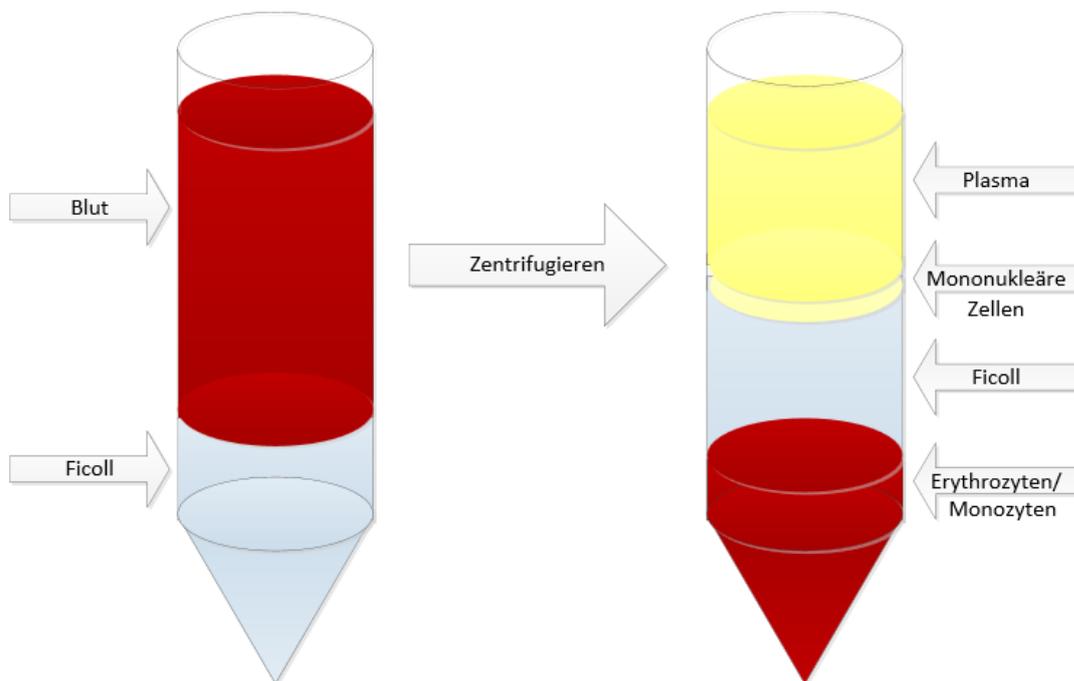


Abbildung 2: Trennung der mononukleären Zellen aus einer Blutprobe durch die Dichtegradientenzentrifugationsmethode.

Die Blutprobe wird über eine vorgelegte Ficoll®-Hypaque-Lösung mit einer definierten Dichte (1,077g/ml) geschichtet. Durch das anschließende Zentrifugieren wandern bestimmte Zellen des Blutes, je nach Dichtegradienten, durch das Medium bis zu der Stelle, an der die Dichte der Zellen mit der des Mediums übereinstimmt. Dabei ergibt sich folgendes Bild: Zellen, die eine höhere Dichte als die Ficoll®-Lösung haben, wie Erythrozyten und neutrophile Granulozyten, kommen ganz unten im Röhrchen zum Liegen. Dagegen verbleiben Zellen mit einer geringeren Dichte als die Ficoll®-Lösung, wie die Thrombozyten und das flüssige Plasma mit gelösten Stoffen, oben im Röhrchen. Zwischen dieser obersten Schicht und der Ficoll®-Lösung bildet sich eine dünne Schicht mit mononukleären Zellen, d. h. Monozyten und Lymphozyten.

Die mit mononukleären Zellen durchsetzte Schicht zwischen dem Plasma und der Ficoll®-Flüssigkeit wurde mit einer 5 ml Plastikpipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Tube überführt. Dieses Gemisch von mononukleären Zellen wurde in einem sich anschließenden Waschschrift mit RPMI-Puffer + 10 % Fötale Bovines Serum (FBS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (PS) bis auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Danach wurde 10 min lang bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der sich dadurch ergebende Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde, je nach gewünschter Weiterverwendung, das übrig gebliebene Zellpellet mit unterschiedlichen Puffern versehen. Im Falle der

sich direkt anschließenden Färbungen und FACS-Messungen wurde nach dem unter 2.2.2.1 aufgeführten Schema verfahren.

Für den Fall der langfristigen Lagerhaltung in einem Tank mit ca. -200 °C kaltem Flüssigstickstoff wurden folgende vorbereitende Schritte durchgeführt. Das Zellpellet wurde mit einer definierten Menge von 30 ml RPMI-Puffer +10 % FBS und 1 % PS versetzt und resuspendiert. Nun wurden 10 µl der Lösung mittels der Eppendorf®-Pipette nach kurzem Mischen entnommen und mit 10 µl 3 %-iger Essigsäure vermischt um verbleibende Erythrozyten zu lysieren. Dann wurden hieraus 10 µl der Mischung entnommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Daraus lässt sich die Gesamtzellzahl im Medium berechnen. Erneut wurde wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand abgesaugt um das Zellpellet anschließend im Einfriermedium (1 Teil Dimethylsulfoxid (DMSO) mit 9 Teilen FBS) zu resuspendieren. Dabei wurde die Menge Medium verwendet, um ungefähr auf folgende mononuklearen Zellzahlen im Gefrierröhrchen zu kommen: ca.  $5-7 \times 10^6$ /ml bei Blutproben, je  $1 \times 10^7$ /ml bei Knochenmark- und Milzproben. Im Folgenden wurden die jeweiligen Zellsuspensionen mittels Eppendorf®-Pipette in ein CRYO.S®-Gefrierröhrchen überführt und entsprechend beschriftet. Dann wurden diese Gefrierröhrchen in einem mit Isopropanol befüllten Gefriercontainer eingestellt und für drei Tage bei ca. -80 °C gelagert. Abschließend wurden die Proben im Flüssigstickstoff-Tank bei ca. -200 °C platziert.

### **2.2.1.2 Gewinnung von Milzproben**

Das Milzgewebe der einzelnen Proben wurde mit einem Skalpell zerkleinert und auf ein Sieb mit der Maschenweite 70 µm, das auf ein 50 ml Tube angebracht wurde, gegeben. Danach wurde das Milzgewebe durch das Sieb gerieben und mit dem RPMI-Puffer (+ 1 % PS + 10 % FBS) nachgespült. Die so erhaltene Suspension wurde, wie bereits oben beschrieben, mittels der Dichtezentrifugationsmethode und einer Ficoll®-Lösung weiterverarbeitet.

## **2.2.2 Erstellen von Färbeschemata für die durchflusszytometrische Analyse**

In der Arbeit wurden geeignete Färbeschemata für die Blut-, Knochenmark- und Milzproben etabliert. Dabei wurden Vortestungen mit Blut- oder Tonsillengewebe vorgenommen, um die passenden Färbemischungen zu erhalten. Die jeweiligen Färbeschemata der Gewebeproben wurden entsprechend dem untenstehenden Ablauf angewandt und sind im Folgenden exemplarisch anhand der Blutproben ausgeführt.

### **2.2.2.1 Vorbereitung der Blutproben für die durchflusszytometrische Analyse**

Es wurden die eingefrorenen mononukleären Zellen (ca.  $5-7 \times 10^6$  in 1 ml) aus dem Stickstoff-Tank entnommen und zügig unter warmem Wasser aufgetaut. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein 15 ml Tube mit 3 ml vorgelegtem RPMI-Puffer (+ 10 % FBS + 1 % PS) überführt. Hängengebliebene Zellreste an der Wandung des 1,5 ml Reagiergefäßes wurden mit 1 ml RPMI-Puffer gewaschen und ebenfalls in das Tube überführt. Die nun entstandene 5 ml RPMI-Zellsuspension wurde 10 min bei 4 °C mit 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand unter der Sicherheitswerkbank mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Daraufhin wurde das Pellet mit 1 ml FACS-Puffer (PBS + 0,5 % Bovines Serum Albumin (BSA)) aufgenommen und resuspendiert. Nun erfolgte nochmals der gleiche Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben und das erneute Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 40 µl FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in ein beschriftetes 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

Parallel zum ersten Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde die Oberflächenfärbung nach der Zusammensetzung der Färbemischung vorbereitet. Dazu wurde die jeweils benötigte Menge an FACS-Puffer (ad 20 µl) im Reagiergefäß vorgelegt und im Anschluss die fluoreszenzmarkierten Antikörper der Färbemischung zugegeben (Tabelle 9). Die fertige Färbelösung wurde mit 40 µl der Zellsuspension gut vermischt, im Kühlschrank bei 4 °C für 15 min inkubiert und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert, in ein Rundboden-Röhrchen überführt und bis zu der anschließenden durchflusszytometrischen Vermessung auf Eis gelagert.

**Tabelle 9: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Blutproben.**

Ziel	Fluorochrom	Menge ( $\mu$ l)
CD24	FITC	1,0
IgD	PE	0,5
CD21	APC	0,5
CD27	PerCP-Cy5.5	0,5
CD38	PE-Cy7	0,5
CD19	APC-Cy7	0,5
IgM	BV421	0,3

#### 2.2.2.2 Vorbereitung der Knochenmarkproben für die durchflusszytometrische Analyse

Die Knochenmarkproben wurden analog zu den Blutproben aufgetaut, und mit RPMI bzw. FACS Puffer gewaschen, wie bei den Blutproben beschrieben. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 40  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in ein beschriftetes 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

Die Antikörperverdünnungslösungen wurden wie in Tabelle 10 beschrieben vorbereitet und mit FACS-Puffer auf 20  $\mu$ l ergänzt. Im Anschluss wurde die Färbelösung mit 40  $\mu$ l der Zellsuspension gut vermischt und im Kühlschrank bei 4 °C für 15 min gelagert. Danach wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und das Röhrchen bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 300  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. in ein Rundboden-Röhrchen überführt und bis zur durchflusszytometrischen Messung auf Eis gelagert.

**Tabelle 10: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Knochenmarkproben.**

Ziel	Fluorochrom	Menge (ul)
CD20	FITC	0,3
IgD	PE	1,5
CD21	APC	0,5

CD34	PerCP-Cy5.5	1,5
CD10	PE-Cy7	0,5
CD19	APC-Cy7	0,5
IgM	BV421	0,3

### 2.2.2.3 Vorbereitung der Milzproben für die durchflusszytometrische Analyse

Die Färbung der Oberflächenstrukturen der Milzproben erfolgte wie bei den Blut- und Knochenmarkproben beschrieben. Die Herstellung der Färbemischung hierfür ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Milzproben.**

Ziel	Fluorochrom	Menge ( $\mu$ l)
CD24	FITC	1,0
CD86	PE	1,0
CD19	APC-Cy7	1,5
CD27	PerCP-Cy5.5	0,5
CD20	PE-Cy7	0,1
HLA-DR	APC-Cy	0,3
CD38	BV421	0,3

Für die intrazelluläre Färbung und die Färbung der Oberflächenstrukturen wurden statt 40  $\mu$ l der gewaschenen Zellsuspension (s.o.) 80  $\mu$ l Zellsuspension verwendet. Diese größere Menge war nötig, da darin zunächst die Oberflächenfärbung durchgeführt wurde. Dafür wurden die Zellsuspension und die Oberflächenfarbstoffe aus der Färbemischung in einem 1,5 ml Reagiergefäß vermischt und im Kühlschrank bei 4 °C für 15 min inkubiert. Dann wurde 1 ml FACS-Puffer hinzupipettiert und gewaschen. Schließlich wurde bei

Raumtemperatur mit 1500 rpm über 5 min zentrifugiert und der entstehende Überstand abgesaugt, um mit dem Zellpellet weiterzuarbeiten. Dieses Pellet wurde mit 200 µl Fixations-/Permeabilisierungspuffer versetzt (50 µl + 150 µl), vermischt und über 20 min bei 4 °C im Kühlschrank stehen gelassen. Dies diente dem Fixieren der abgelaufenen Oberflächenfärbung. Dann wurden 500 µl des Permeabilisierungspuffers (10x Puffer 150 µl + 1350 µl Aqua dest.) hinzugegeben, resuspendiert und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Erneut wurden 500 µl Permeabilisierungspuffer hinzupipettiert und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Der Permeabilisierungspuffer erfüllt hier die Aufgabe, die B-Zellen aufzuschließen, damit die intrazellulären Farbstoffe an die sonst in der Zelle schwer zu erreichenden Strukturen binden können. Beim Absaugen wurde ein Überstand von ca. 50 µl belassen, um damit die intrazelluläre Färbung durchzuführen. Dazu wurde die Färbemischung, die für die Oberflächenfärbung verwendet worden war, mit den intrazellulären Farbstoffen versetzt und so gebrauchsfertig gemacht. Die eventuell nötigen Vorverdünnungen für die Antikörperfärbungen wurden mit 1:10 Permeabilisierungspuffer angefertigt. Die ca. 50 µl Überstand wurden mit dem Zellpellet resuspendiert und komplett in die nun fertige Färbemischung überführt, vermischt und für 20 min im Kühlschrank bei 4 °C färben gelassen. Schließlich wurde ein letztes und drittes Mal mit 500 µl Permeabilisierungspuffer gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Ein vorsichtiges Absaugen des Überstandes und Resuspendieren in 300 µl FACS-Puffer mit Überführung der Zellsuspension in das FACS-Glasröhrchen komplettierten diesen letzten Arbeitsschritt.

**Tabelle 12: Färbemischung für die intrazelluläre- und Oberflächenfärbung von Milzproben.**

Ziel	Fluorochrom	Menge (µl)
IgA intrazellulär	FITC	0,05
IgG intrazellular	PE IgG Southern B.	0,05
CD 19	APC-Cy7	1,5

---

CD 27	PerCP-Cy5.5	0,5
CD 38	PE-Cy7	0,3
HLA-DR	APC-Cy	0,3
IgM intrazellulär	BV421	0,2

### 2.2.3 Datenerhebung und Analysestrategie der durchflusszytometrischen Messungen

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mittels des Durchflusszytometers BD FACSCanto® II durchgeführt. Dabei wurden die Rohdaten mit der Software BD FACSDiva® 6 aufgenommen und zur weiteren Verarbeitung gespeichert. Vorher wurden mit dem Programm Anpassungen an der Einstellung des Durchflusszytometers vorgenommen und eine Kompensationsmethode entwickelt, damit die Ergebnisse mit möglichst hoher Trennschärfe in den gewünschten Zielbereichen lagen. Dies wurde mittels Vortestungen an Blut- und Tonsillenproben mit den gleichen Färbeschemata wie später verwendet erreicht.

Die Aufbereitung der Messdaten der FACS-Messungen wurde mit Hilfe des Programmes FlowJo® Version 10 durchgeführt. Hierfür wurden die Daten zunächst importiert und entsprechend bearbeitet. Ausgehend hier von konnten die relevanten Zielbereiche der jeweils zu untersuchenden Zellpopulation, nach Gegenüberstellung von bestimmten Oberflächen- bzw. intrazellulären Markern, erhalten werden. Die Ergebnisse der in FlowJo® angefertigten Zielbereiche der Zellmessungen wurden in Microsoft Office Excel® exportiert und bearbeitet, um anschließend die Resultate mittels Graphpad Prism® 5 grafisch darzustellen und zu analysieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Darstellung der Patientenkohorte

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die klinischen Daten der untersuchten ITP-Patienten.

Tabelle 13: Klinische Daten der Patientenkohorte.

Pseudonym	Alter	m/w	Medikation		SE	Thromboz.	Untersuchte Biomaterialien		
			Aktuelle	Vorherige			KM	Blut	Milz
ITP W4	9,6	m	keine	keine	nein	26.000	ja	ja	nein
ITP W5	4,5	m	IVIG	IVIG	nein	23.000	ja	ja	nein
ITP W6	4,6	w	keine	GK, IVIG	nein	20.000	ja	nein	nein
ITP W7	32,3	w	GK, ROM	GK, ROM	ja	100.000	nein	ja	ja
ITP W12	28,2	w	ROM	AZA, GK, IVIG	ja	133.000	nein	ja	ja
ITP W13	17,8	w	keine	keine	nein	62.000	nein	ja	nein
ITP W14	40,8	w	ELT	GK, IVIG, RTX	ja	70.000	nein	ja	ja
ITP W15	19,5	m	keine	GK, IVIG	nein	n. b.	nein	ja	nein
ITP W16	1,4	w	keine	IVIG	nein	16.000	nein	ja	nein
ITP W17	19	w	GK	CSA, GK, IVIG, MMF	nein	102.000	nein	ja	nein
ITP W18	16,6	w	GK, ELT	GK, ROM	nein	188.000	nein	ja	nein
ITP W19	2,9	m	keine	n. b.	nein	n. b.	nein	ja	nein
ITP W20	47,2	w	GK, IVIG	keine	ja	82.000	nein	ja	ja
ITP W22	5,6	m	keine	keine	nein	7000	nein	ja	nein
ITP W23	17,8	w	keine	keine	nein	48.000	nein	ja	nein
ITP W24	10	m	keine	GK	nein	30.000	nein	ja	nein
ITP W25	49,6	w	GK, IVIG	GK, IVIG	ja	42.000	nein	ja	ja
ITP W27	8,6	w	keine	keine	nein	3000	nein	ja	nein

## Ergebnisse

Pseudonym	Alter	m/w	Medikation		SE	Thromboz.	Untersuchte Biomaterialien		
			Aktuelle	Vorherige			KM	Blut	Milz
ITP W28	44,2	w	ROM	GK, IVIG	ja	25.000	nein	ja	ja
ITP W30	64,0	m	GK, IVIG	GK	ja	69000	nein	ja	ja
ITP W31	21,2	w	GK	GK	ja	40.000	nein	ja	ja
ITP W32	42,8	w	GK	GK	ja	80.000	nein	ja	ja
ITP W33	6,2	w	keine	GK, IVIG	nein	3.000	nein	ja	nein
ITP W34	15,5	w	keine	n. b.	nein	n. b.	nein	ja	nein
ITP W35	10,3	m	keine	n. b.	nein	n. b.	nein	ja	nein
ITP W36	26,2	w	GK, IVIG	GK, IVIG	ja	61.000	nein	ja	ja
ITP W40	2,4	w	keine	keine	nein	n. b.	nein	ja	nein
ITP W41	15,8	m	keine	keine	nein	59.000	nein	ja	nein
ITP W42	15,2	m	IVIG	IVIG	nein	23.000	nein	ja	nein
ITP W44	3,8	m	GK	GK, IVIG	nein	11.000	nein	ja	nein
ITP W45	17,4	w	keine	GK	nein	53.000	nein	ja	nein
ITP W46	10,6	m	keine	keine	nein	113.000	nein	ja	nein
ITP W49	6,0	m	GK	GK, IVIG	nein	n. b.	ja	nein	nein
ITP W50	4,8	w	n. b.	n. b.	nein	n. b.	ja	nein	nein
ITP W51	2,3	w	keine,	IVIG	nein	n. b.	ja	nein	nein
ITP W52	2,2	m	IVIG	IVIG	nein	30.000	ja	nein	nein
ITP W53	14,5	w	keine	keine	nein	34.000	ja	nein	nein

AZA (Azathioprim), CSA (Ciclosporin A), ELT (Eltrombopag); GK (Glukokortikoide); IVIG (Intravenöse Immunglobuline); KM (Knochenmark); m (Männlich), MMF (Mycophenolatmofetil); n. b. (nicht bekannt); ROM (Romiplostim); RTX (Rituximab), SE (Splenektomie); Thromboz. (Thrombozyten/  $\mu$ l)); w

### 3.2 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Blutes

Um die B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung bei ITP-Patienten mit den von gesunden Individuen zu vergleichen, wurden B-Zell-Subpopulationen unterschiedlicher Entwicklungsstadien des Blutes, des Knochenmarks und der Milz durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurden Blutproben von 28 ITP-

Patienten mit Referenzwerten von altersentsprechenden, gesunden Individuen verglichen.

### **3.2.1 Durchflusszytometrische Analysestrategien der B-Zell-Subpopulationen von Blutproben**

Die Aufbereitung der Messdaten der durchflusszytometrischen Messungen wurde mit Hilfe des Programmes FlowJo® Version 10 durchgeführt. Hierfür wurden die Daten zunächst importiert und wie in Abbildung 3 exemplarisch für eine Blutprobe von ITP-Patienten dargestellt, bearbeitet. Zuerst wurden die Messpunkte der durchflusszytometrischen Messung auf den relevanten Lymphozyten-Bereich (R1) hin aus der Menge der vermessenen mononukleären Zellen eingegrenzt (= „Gating“). Um nur einzelne Zellen zu analysieren, wurden mögliche Dupletten bzw. Agglomerate von der Analyse ausgeschlossen, indem der Bereich einzelner Zellen jeweils im Seitwärtsstreulicht (SSC=Side Scatter) mit SSC-H gegen SSC-W (R2) und im Vorwärtsstreulicht (FSC= Forward Scatter) mit FSC-H gegen FSC-W (R3) definiert wurde. Die so erhaltene Population von einzelnen Lymphozyten wurde mit der Auftragung von CD19 gegen CD27 auf die B-Zell-Population (R4) begrenzt. Ausgehend hiervon konnten die relevanten B-Zell-Subpopulationen durch Gegenüberstellung von bestimmten Oberflächenmarkern erhalten werden.

## Ergebnisse

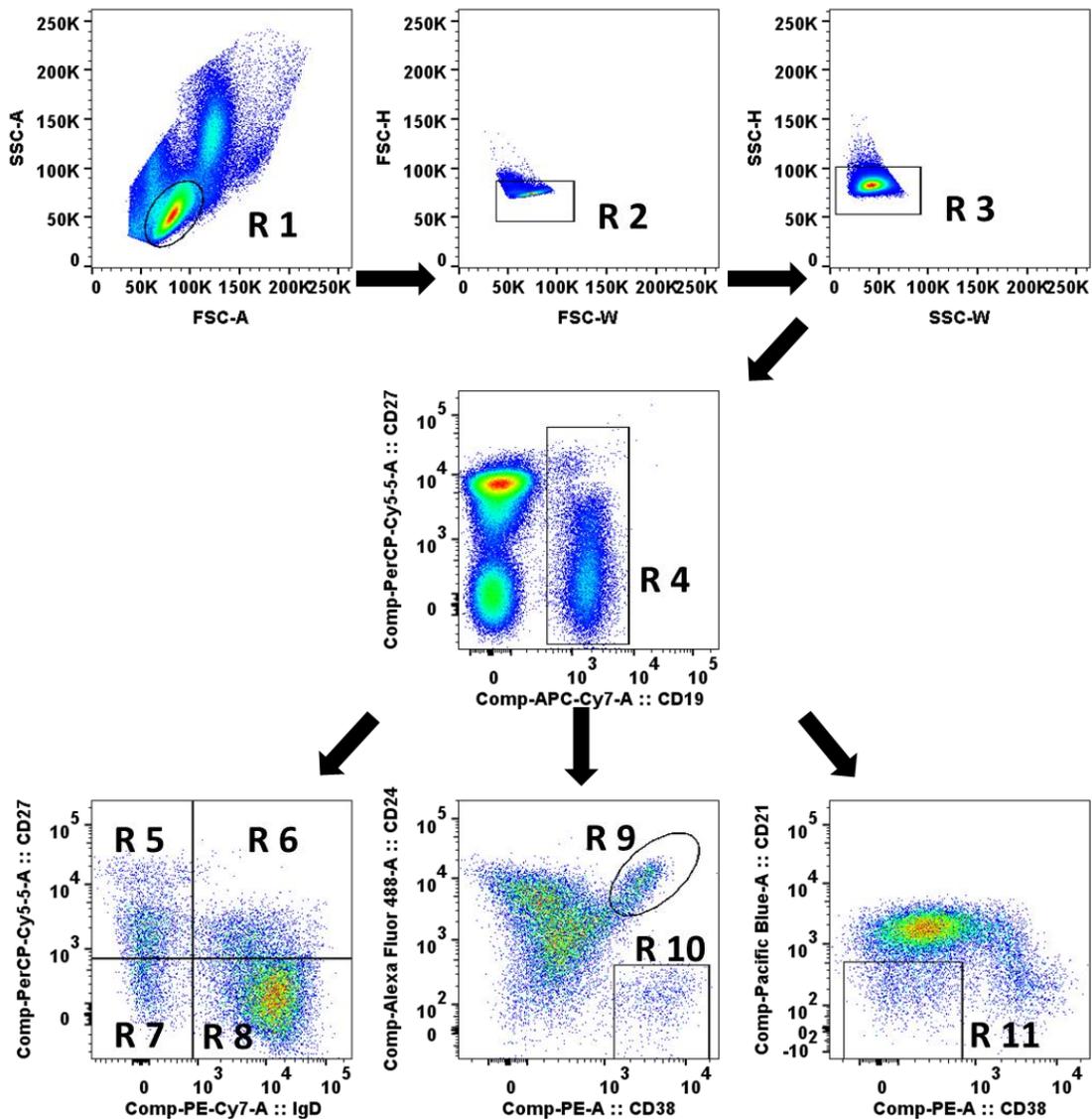


Abbildung 3: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen im Blut.

Die Population der Lymphozyten wurde anhand der Signale des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A, entspricht Größe) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC-A, entspricht Granularität) festgelegt (R1, Lymphozyten). Die Einzelzellen der Lymphozyten wurden im Vorwärtsstreulicht mit FSC-H gegen FSC-W (R2) und im Seitwärtsstreulicht mit SSC-H gegen SSC-W (R3) von Dupletten/Aggregaten getrennt. Die B-Zellen wurden als CD19+ und CD27+ sowie CD27- Zellen definiert (R4, B-Zellen). Es wurden folgende B-Zell-Populationen definiert: CD27+IgD- (R5, Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel), CD27+IgD+ (R6, Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel), CD27-IgD- (R7, atypische Gedächtnis-B-Zellen), CD27-IgD+ (R8, naive B-Zellen), CD24++CD38++ (R9, Transitional-B-Zellen), CD24-CD38++ (R10, Plasmablasten/Plasmazellen) und CD21low CD38low (R11, CD21low CD38low B-Zellen).

### 3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Blutproben

Die B-Zell-Subpopulationen von 28 ITP-Patienten im peripheren Blut wurden mit laboreigenen Normwerten von 220 Gesunden, aus der Publikation „Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood“ von Morbach et al. verglichen [101]. Dabei wurden die ITP-Patienten und Gesundkontrollen nach Alter in etwa drei gleich große Kohorten eingeteilt. Die erste Kohorte, im Weiteren als „Kinder“ bezeichnet, besteht aus 8 ITP-Patienten und 105 Gesundkontrollen mit einer Altersstruktur von 0-8 Lebensjahren. Die zweite Kohorte „Jugendliche“ setzt sich aus 11 ITP-Patienten und 52 Gesunden zusammen, die eine Altersverteilung von 9-18 Lebensjahren aufweist. Die dritte Kohorte, die „Erwachsenen“, besteht aus 9 ITP-Patienten und 63 Gesunden mit einer Altersstruktur von 19-65 Lebensjahren. Zum Vergleich der Proben wurden aus der jeweiligen Kohorte die Mittelwerte mit Standardabweichungen (+/-SD) berechnet und die unabhängigen, normalverteilten Ergebnisse der Gesundkontrollen mit den Ergebnissen der ITP-Patienten mittels ungepaartem t-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt, und somit die Werte mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

Zunächst wurden die relativen Häufigkeiten der B-Zell-Gesamtpopulation (CD19+) innerhalb der Lymphozyten im Blut von ITP-Patienten und Gesunden in den verschiedenen Alterskohorten verglichen (Abbildung 4). Dabei zeigten sich bei den ITP-Patienten der ersten Kohorte „Kinder“ ein Mittelwert an gemessenen B-Zellen von 10,6 % (+/-3,4) und bei den Gesundkontrollen ein Mittelwert von 16,8 % (+/-6,8). Hierbei lag der Mittelwert bei den ITP-Patienten um 6,2 % niedriger als bei den Gesunden und war damit statistisch signifikant ( $p = 0,012$ ). In der zweiten Kohorte „Jugendliche“ lag der Mittelwert bei den ITP-Patienten bei 12,3 % (+/-6,8), bei den Gesunden bei 13,7 % (+/-5,4) und in der dritten Kohorte „Erwachsene“ in der ITP-Gruppe bei 9,4 % (+/-7,1) und bei den Gesunden bei 9,2 % (+/-2,8). Die Auswertung der zweiten und dritten Kohorte zeigte somit keine signifikanten Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der B-Zellen innerhalb der Lymphozyten, mit  $p = 0,433$  in der zweiten Kohorte und mit  $p = 0,876$  in der

## Ergebnisse

dritten Kohorte. In der Gesamtschau ist eine stetige Abnahme der B-Zell-Häufigkeit über die Alterskohorten bei den Gesunden zu verzeichnen, im Vergleich dazu ist keine eindeutige Tendenz bei den ITP-Gruppen zu beobachten.

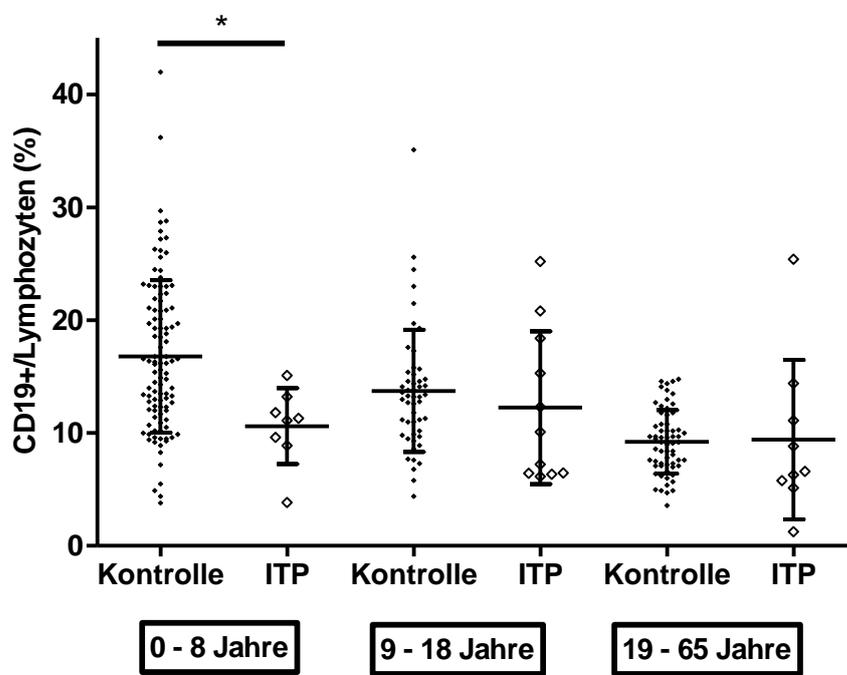


Abbildung 4: Relativer Anteil der B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter. Vergleich des Anteils von B-Zellen (CD19+) innerhalb der Lymphozyten von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die kurzlebige Population der Transitional-B-Zellen wurde anhand der Oberflächenmarker CD24 und CD38, die auf diesen vermehrt exprimiert werden, vermessen (Abbildung 5). Im Gesamtbild ergaben sich bei den ITP-Gruppen, im Vergleich zu den Gesunden, in den Kohorten der Kinder und Jugendlichen signifikante Verminderungen der relativen Häufigkeiten dieser Zellgruppe mit  $p = 0,001$  und  $p < 0,0001$ . In der Kohorte der Erwachsenen ließ sich die gleiche Tendenz erkennen, die aber mit  $p = 0,052$  nicht signifikant ist. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ITP-Gruppen lagen nach Alterskohorten aufsteigend bei 4,1 % ( $\pm 4,7$ ), 1,7 % ( $\pm 2,2$ ) und 1,9 % ( $\pm 1,7$ ). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesund-Gruppen lagen nach Alterskohorten aufsteigend bei 8,9 % ( $\pm 5,0$ ), 5,8 % ( $\pm 2,6$ ) und 3,3 % ( $\pm 2,1$ ).

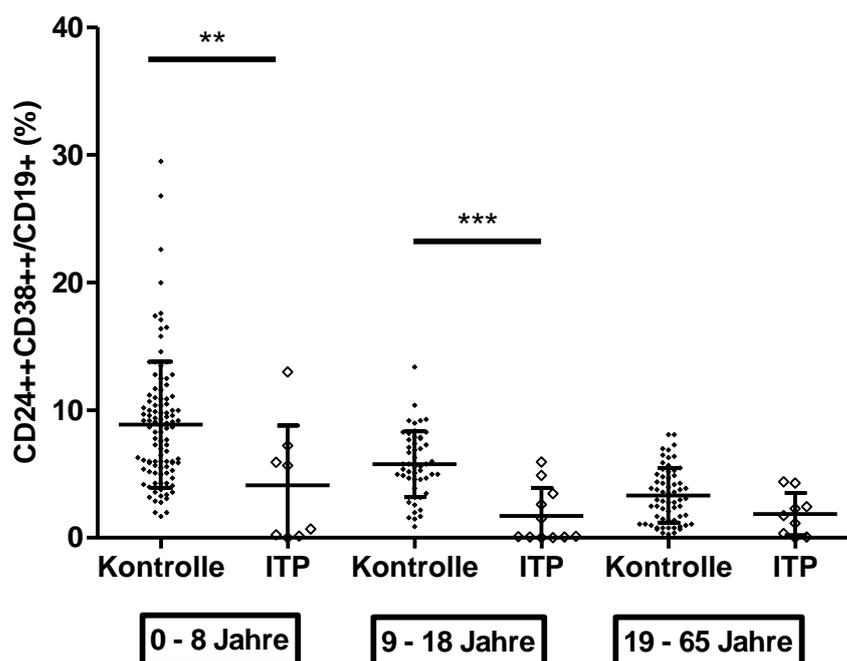


Abbildung 5: Relativer Anteil der Transitional-B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der Transitional-B-Zellen (CD24++CD38++) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Population der reifen bzw. naiven B-Zellen wurde bei Blutproben der ITP-Patienten untersucht und ebenfalls mit den B-Zell-Normwerten der gesunden Alterskohorten verglichen (Abbildung 6). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede bei den ITP-Gruppen und Kontrollgruppen in den jeweiligen Kohorten. Die Mittelwerte lagen in der Kinderkohorte bei 79,2 % (+/-7,7) in der ITP-Gruppe und bei 84,4 % (+/-9,5) in der Kontrollgruppe ( $p = 0,133$ ). In der Kohorte der Jugendlichen betrug die Werte 79,5 % (+/-12,0) in der ITP-Gruppe und 79,0 % (+/-10,3) in der Gruppe der Gesunden ( $p = 0,883$ ). Die Erwachsenenkohorte zeigte einen Mittelwert von 72,7 % in der ITP-Gruppe (+/-18,2) und 67,8 % (+/-12,7) in der Gruppe der Gesunden ( $p = 0,404$ ).

## Ergebnisse

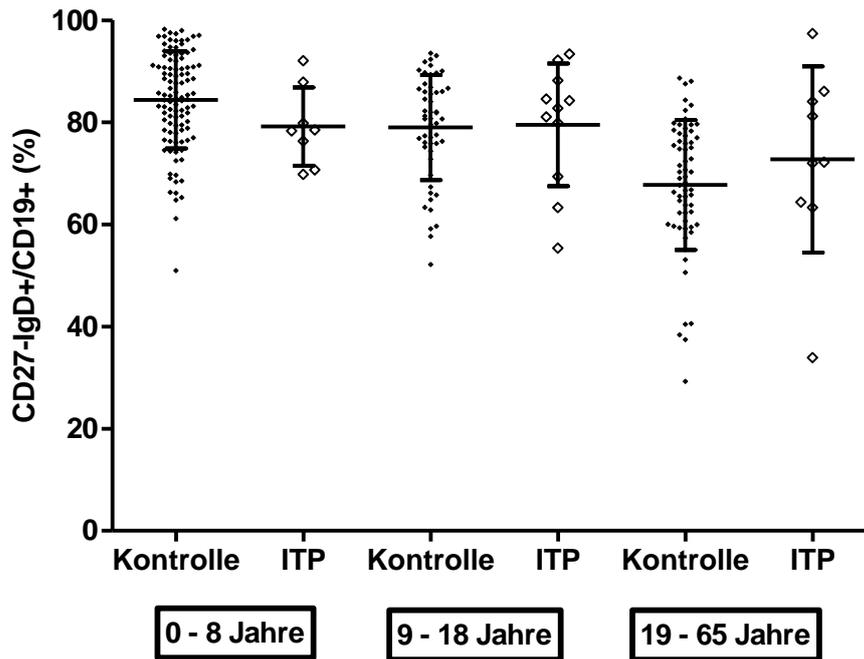


Abbildung 6: Relativer Anteil der naiven B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils naiver B-Zellen (CD27-IgD+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Gedächtnis-B-Zellen lassen sich durchflusszytometrisch in drei Gruppen einteilen. Eine Gruppe mit Immunglobulin (Ig)-Klassenwechsel, die sich durch die Expression des Gedächtnis B-Zell Markers CD27 und der fehlenden Expression von IgD auszeichnet, eine Gruppe ohne Ig-Klassenwechsel (CD27+IgD+) und die Gruppe der doppelt negativen Gedächtnis-B-Zellen mit fehlender CD27- und IgD-Expression. Diese B-Zell-Subpopulationen wurden ebenso durchflusszytometrisch untersucht.

Bei den Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel (Abbildung 7) zeigten sich in der Kohorte der Kinder keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,777$ ) zwischen den ITP-Patienten mit 5,9 % ( $\pm 3,1$ ) im Mittel und der Kontrollgruppe mit 6,3 % ( $\pm 3,8$ ). Die Kohorte der Jugendlichen zeigte signifikant niedrigere Häufigkeiten bei der ITP-Gruppe mit 4,8 % ( $\pm 2,2$ ) als bei den Gesunden mit 8,3 % ( $\pm 4,7$ ), bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,019$ . Bei der Kohorte der

## Ergebnisse

Erwachsenen lagen die Werte bei 9,6 % ( $\pm 9,1$ ) in der ITP-Gruppe und bei 14,6 % ( $\pm 7,0$ ) in der Gesundheitskontrolle, bei  $p = 0,056$ . Insgesamt konnte man hier eine Tendenz zur geringeren Häufigkeit des Auftretens dieser B-Zell-Subpopulation bei ITP-Patienten im Vergleich zu Gesundheitskontrollen beobachten, mit signifikanten Unterschieden bei den Jugendlichen- und Erwachsenenkohorten.

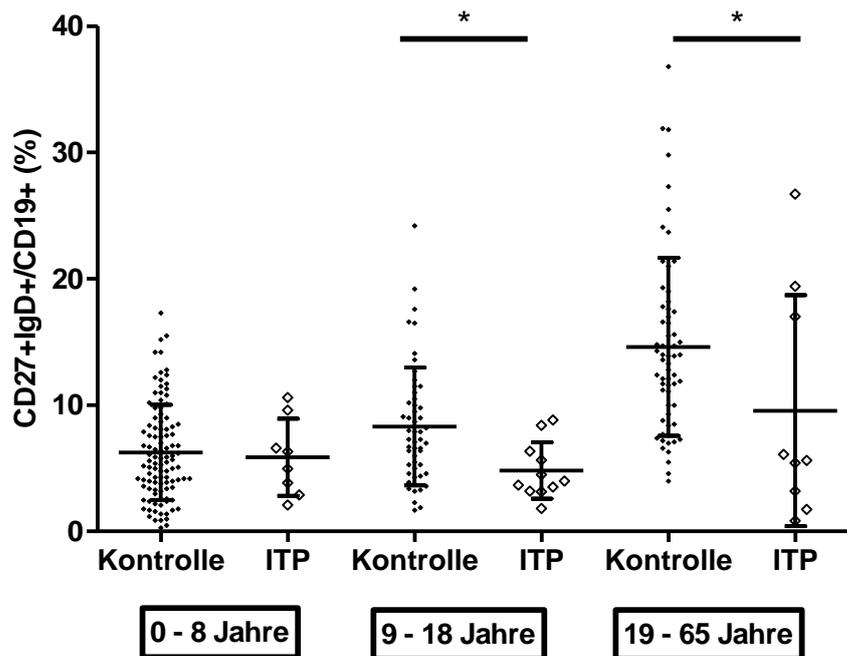


Abbildung 7: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel (CD27+IgD+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Häufigkeit der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel (Abbildung 8) zeigte bei der Kohorte der 0-8 Jährigen eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,0326$ ) der ITP-Gruppe mit dem Mittelwert 7,5 % ( $\pm 3,6$ ) gegenüber der Kontrollgruppe mit 4,2 % ( $\pm 4,2$ ). Die Kohorte der 9-18 Jährigen zeigte bei den ITP-Patienten mit einem Mittel von 8,7 % ( $\pm 6,6$ ) und 7,2 % ( $\pm 4,8$ ) bei den Gesunden keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,385$ ). Ebenso geringe Unterschiede lieferten die Ergebnisse der Kohorte der 19-65 Jährigen mit 13,2 % ( $\pm 9,3$ ) in der ITP-Gruppe

## Ergebnisse

und 12,7 % (+/-6,5) in der Kontrollgruppe bei einem  $p = 0,855$ . Insgesamt lässt sich eine leicht erhöhte Häufigkeit von CD27+IgD- Gedächtnis-B-Zellen bei ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen feststellen, wobei nur in der Kinderkohorte der Unterschied signifikant war.

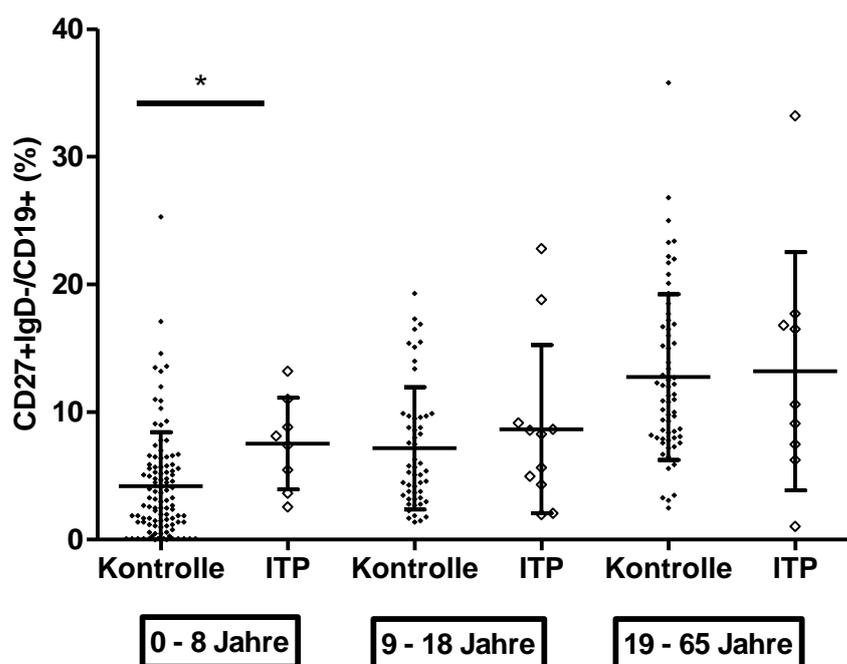


Abbildung 8: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel (CD27+IgD-) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Als weitere B-Zell-Subpopulation wurde die Gruppe der CD27-IgD- atypischen Gedächtnis-B-Zellen untersucht (Abbildung 9). Die Kohorte der Kinder mit  $p = 0,001$  und die Kohorte der Jugendlichen mit  $p = 0,004$  zeigten jeweils signifikant erhöhte Häufigkeiten bei den gemittelten Werten der ITP-Gruppen mit 7,5 % (+/-3,6) und 7,0 % (+/-4,2). Dagegen lagen die Mittelwerte der Gesundgruppen im Vergleich bei 3,7 % (+/-3,0) und 4,3 % (+/-2,5). In der Kohorte der Erwachsenen lag der Mittelwert der ITP-Gruppe mit 4,5 % (+/-3,8) über dem Wert der Kontrollgruppe mit 3,6 % (+/-1,9), diese waren aber mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,253$  nicht signifikant.

## Ergebnisse

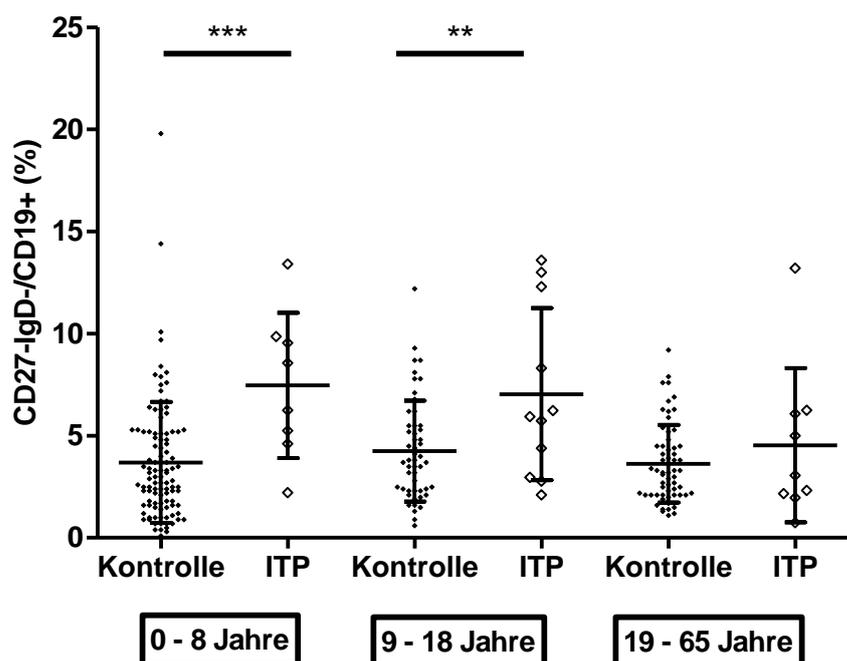


Abbildung 9: Relativer Anteil der atypischen Gedächtnis-B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der atypischen Gedächtnis-B-Zellen (CD27-IgD-) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Im Weiteren wurde die Häufigkeit von sogenannten anergen B-Zellen in Blutproben von ITP-Patienten im Vergleich zu Gesundkontrollen untersucht (Abbildung 10). Diese B-Zell-Subpopulation ist durch eine verminderte Expression von CD21 und CD38 charakterisiert. Sie reagieren vermindert auf eine Aktivierung über den B-Zell-Rezeptor und werden daher auch anerge B-Zellen genannt. In der Kohorte der Kinder ( $p < 0,0001$ ) und der Jugendlichen ( $p = 0,009$ ) fanden sich signifikant höhere Mittelwerte bei den ITP-Gruppen im Vergleich zu den Gesunden. Die Mittelwerte der Kinder-Kohorte lagen bei der ITP-Gruppe bei 6,3 % (+/-2,5), bei den Gesunden bei 2,6 % (+/-1,5), bei der ITP-Gruppe der Jugendlichen Kohorte bei 6,8 % (+/-3,7), dagegen bei der Kontrollgruppe nur bei 2,1 % (+/-1,3). Die Kohorte der Erwachsenen zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,054$ ) mit Mittelwerten von 4,7 % (+/-2,8) bei ITP-Patienten und 3,0 % (+/-1,8) bei den Gesunden. Zusammenfassend liegen die Mittelwerte

## Ergebnisse

der relativen Häufigkeiten der anergen B-Zellen bei allen Kohorten bei der ITP-Gruppe höher als bei den Gesundkontrollen, wenn auch bei der dritten Kohorte der Unterschied nicht signifikant ist.

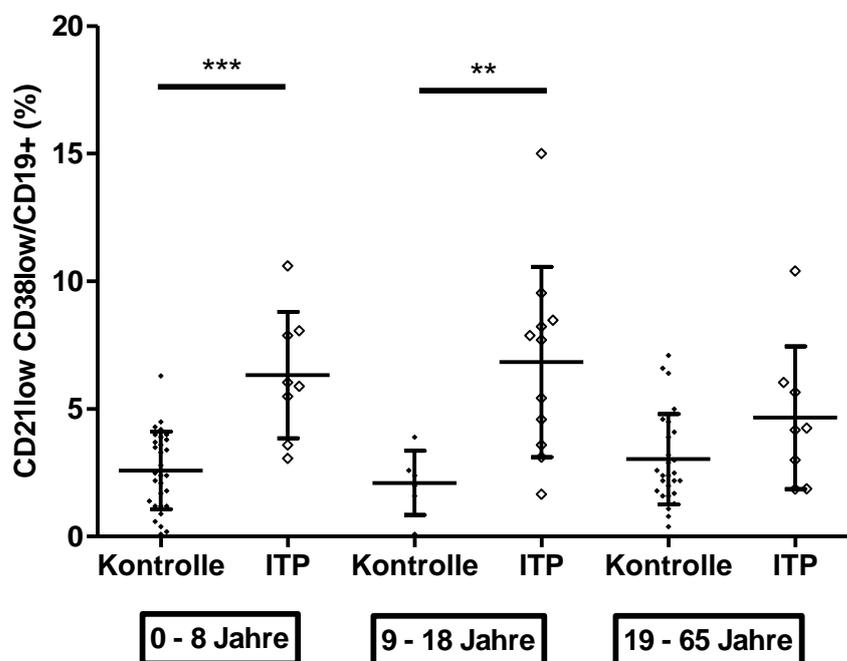


Abbildung 10: Relativer Anteil der anergen B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der anergen B-Zellen (CD21low CD38low) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Zuletzt wurde bei den Blutproben noch die Gruppe der antikörperproduzierenden Zellen, bestehend aus den Plasmablasten und den Plasmazellen, untersucht (Abbildung 11). Nur die Mittelwerte der Kohorte der Jugendlichen zeigte eine signifikant erniedrigte Häufigkeit bei der ITP-Gruppe im Vergleich zur Gesundgruppe mit 0,17 % (+/-0,25) zu 1,3 % (+/-1,3) bei  $p = 0,0037$ . Die Kinder- und Erwachsenenkohorten zeigten die gleiche Tendenz ( $p = 0,30$  und  $p = 0,21$ ), die aber nicht signifikant war. Die Mittelwerte der ITP-Gruppe lagen bei 1,0 % (+/-1,1) und 0,83 % (+/-0,74), die der Gesundgruppen bei 1,6 % (+/-1,6) und 1,3 % (+/-1,1).

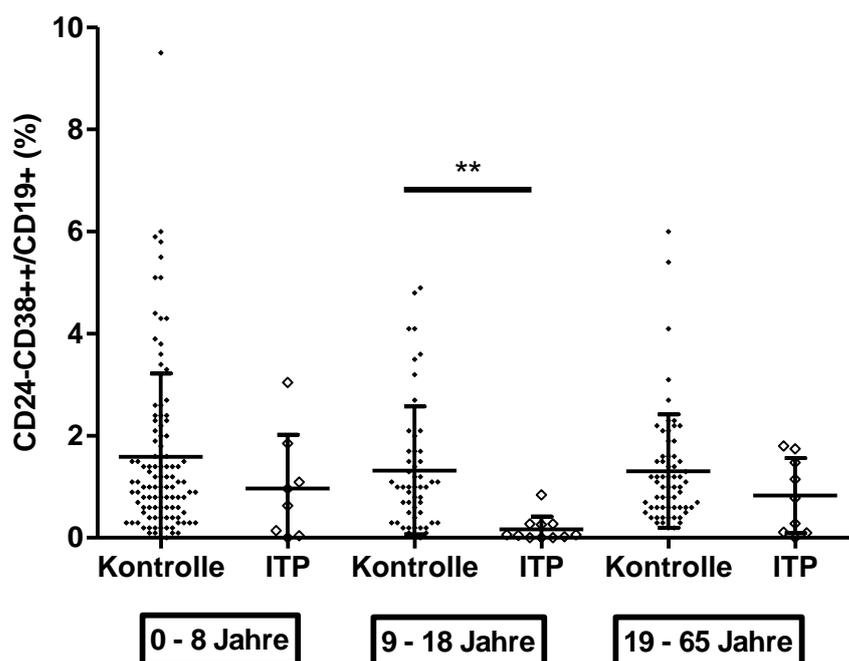


Abbildung 11: Relativer Anteil der antikörperproduzierenden Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.

Vergleich des relativen Anteils der antikörperproduzierenden Zellen (CD24-CD38++) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten (= ITP) in den Alterskohorten von 0-8 Jahren, 9-18 Jahren und 19-65 Jahren.. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Insgesamt zeigten sich somit bei der Analyse der B-Zell Subpopulationen des Blutes quantitative Veränderungen, die vor allem die CD21-CD38- atypischen Gedächtnis-B-Zellen und die CD27+IgD+ Gedächtnis-B-Zellen, sowie die Transitional-B-Zellen betreffen.

### 3.3 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Knochenmarks

Es wurden Knochenmarkproben von 7 ITP-Patienten mit Kontrollen von 5 Gesunden durchflusszytometrisch vermessen und anschließend analysiert.

### 3.3.1 Durchflusszytometrische Analysestrategien von B-Zell-Subpopulationen von Knochenmarkproben

Im Folgenden wird die durchflusszytometrische Analysestrategie exemplarisch an einer Knochenmarkprobe erläutert (Abbildung 12). Dabei wurde zuerst der Lymphozyten-Bereich (R1) aus der Menge der vermessenen mononukleären Zellen eingegrenzt. Anschließend wurden mögliche Agglomerate eliminiert, indem der Bereich einzelner Zellen jeweils im Seitwärtsstreulicht mit SSC-H gegen SSC-W (R2) und im Vorwärtsstreulicht mit FSC-H gegen FSC-W (R3) festgesetzt wurde. Die so erhaltene Population von einzelnen Lymphozyten wurde durch die Auftragung von CD19 gegen CD34 auf die CD19+ B-Zell-Population (R4) begrenzt. Ausgehend hiervon konnten die relevanten B-Zell-Subpopulationen der B-Zell-Entwicklung durch Gegenüberstellung von bestimmten Oberflächen- bzw. intrazellulären Markern erhalten werden.

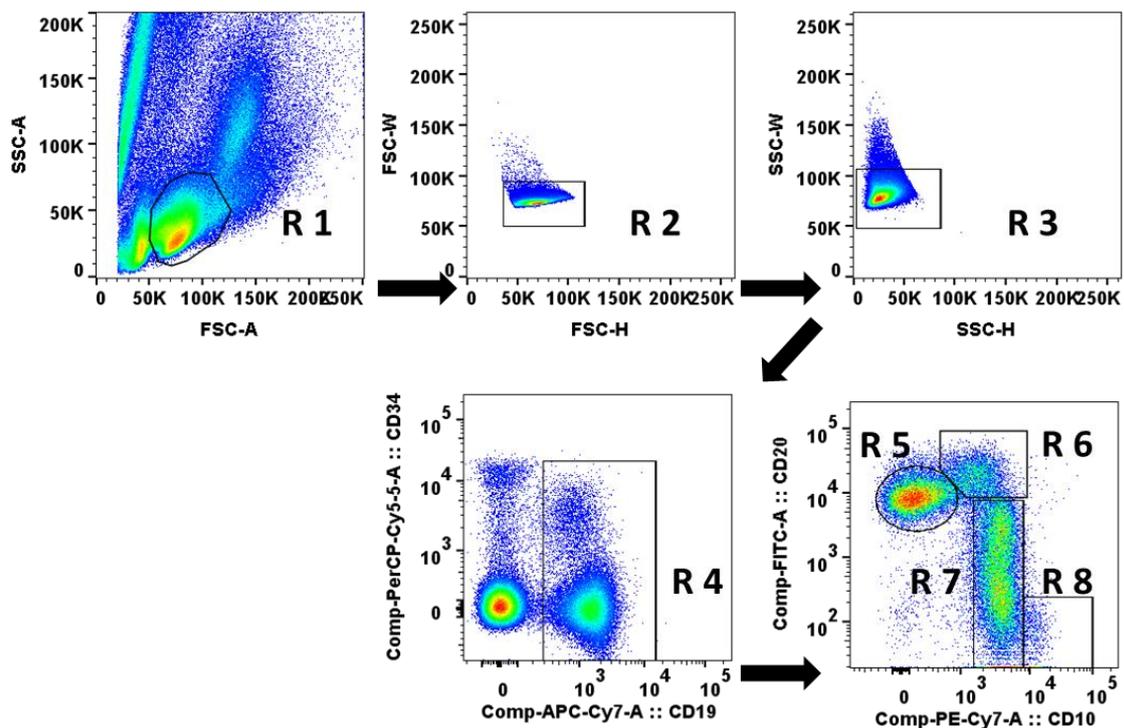


Abbildung 12: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.

Die Population der Lymphozyten wurde anhand der Signale des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A, entspricht Größe) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC-A, entspricht Granularität) festgelegt (R1, Lymphozyten). Die Einzelzellen der Lymphozyten wurden im Vorwärtsstreulicht mit FSC-H gegen FSC-W (R2) und im

Seitwärtsstreulicht mit SSC-H gegen SSC-W (R3) von Dupletten/Aggregaten getrennt. Die B-Zellen wurden als CD19+ und CD34+ sowie CD34- Zellen definiert (R4). Die B-Zellen wurden nach den Oberflächenmarkern CD20 gegen CD10 untersucht. Es wurden folgende B-Zell-Populationen definiert: CD20+CD10-- (R5, naive B-Zellen), CD20+CD10+ (R6, unreife B-Zellen), CD20+/-CD10+ (R7, Pre-B-Zellen), CD20-CD10++(R8, Pro-B-Zellen).

### 3.3.2 Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Knochenmarkproben

Das Knochenmark stellt den Ort der B-Zell-Entwicklung dar. Es werden aus den hämatopoetischen Stammzellen über verschiedene B-Zell-Vorstufen reife B-Zellen gebildet. In dieser Arbeit wurden die B-Zell-Entwicklungsstufen der Pro-B-Zellen (CD34+CD19+), der Pre-B-Zellen (CD34-CD19+CD20-CD10+), der unreifen B-Zellen (CD34-CD19+CD20+CD10+) und der reifen B-Zellen (CD34-CD19+CD20+CD10-) untersucht (Abbildung 13). Dafür wurden 7 Knochenmarkproben von ITP-Patienten mit 5 Proben von immunologisch/hämatologisch Gesunden durchflusszytometrisch vermessen. Anschließend wurden in der jeweiligen B-Zell-Entwicklungsstufe innerhalb der CD19+ B-Zellen, die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichungen der ITP-Gruppe und der Gesund-Gruppe verglichen und mittels ungepaartem t-Test auf Signifikanz hin analysiert. Die frühe Entwicklungspopulation der Pro-B-Zellen zeigte eine relative Häufigkeit von 3,5 % (+/-3,4) in der ITP-Gruppe und 2,3 % (+/-1,2) in der Gesundgruppe und damit keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,493$ ). Bei der Analyse der nächsten Entwicklungsstufe (Pre-B-Zellen) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,727$ ) festgestellt werden, bei Mittelwerten von 19,4 % (+/-16,1) in der ITP-Gruppe und 16,1 % (+/-14,9) in der Kontrollgruppe. Die beiden frühen B-Zell-Entwicklungsstadien (Pro- und Pre-B-Zellen) zeigten bei den ITP-Patienten eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante Tendenz in der Häufigkeit. Bei den Populationen der unreifen ( $p = 0,700$ ) und reifen ( $p = 0,735$ ) B-Zellen konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe und den Gesundkontrollen festgestellt werden, wobei hier eine Tendenz zu leicht erniedrigten Mittelwerten bei den ITP-Patienten zu sehen war. Die Mittelwerte der ITP-Gruppe lagen bei den unreifen B-

## Ergebnisse

Zellen bei 8,1 % (+/-4,8) und bei den reifen B-Zellen bei 63,7 % (+/-19,9). Die Werte der Kontrollgruppe lagen entsprechend bei 9,6 % (+/-8,1) und 67,6 % (+/-18,3). Insgesamt ergeben sich somit keine Hinweise auf eine quantitativ veränderte frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark der ITP-Patienten.

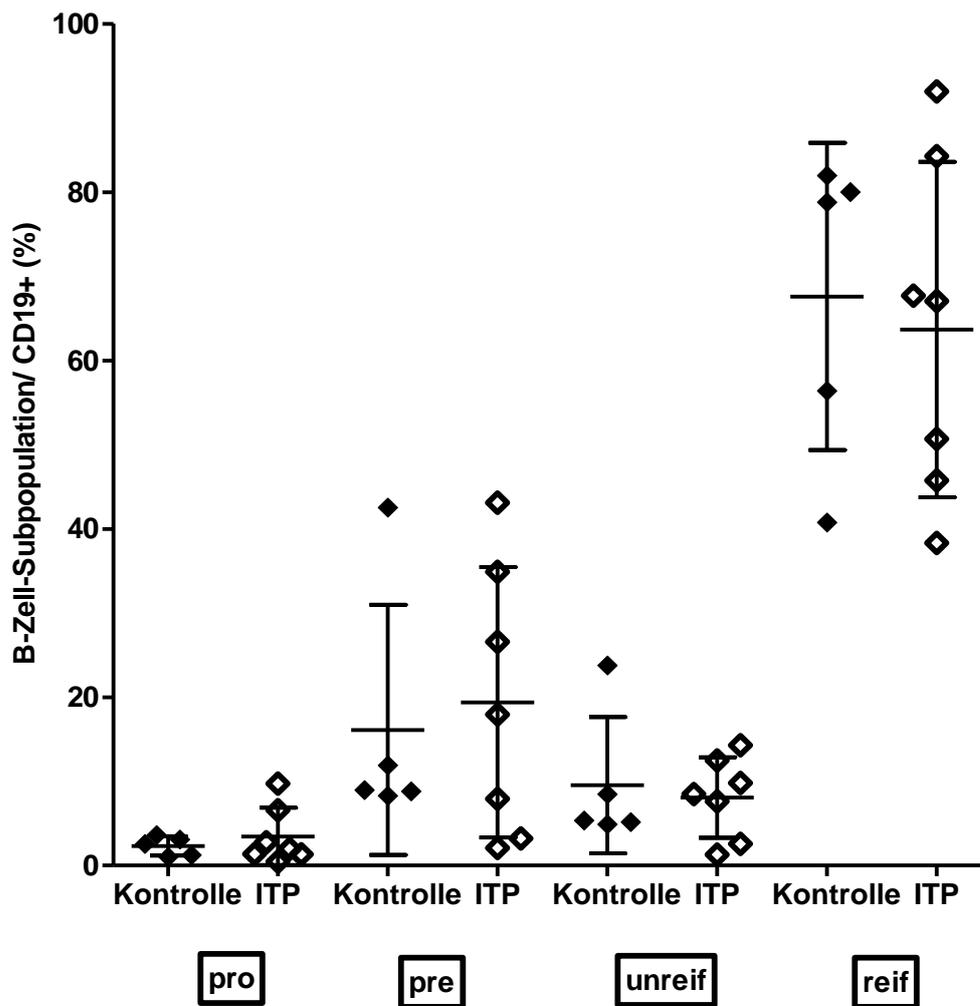


Abbildung 13: B-Zell-Subpopulationen im Knochenmark.

Vergleich der B-Zell-Subpopulationen innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten in den Populationen der Pro-B-Zellen (= pro), der Pre-B-Zellen (= pre), der unreifen B-Zellen (= unreif) und der reifen B-Zellen (= reif). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.4 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen der Milz

Es wurden Milzproben von 12 ITP-Patienten mit Kontrollen von 10 Gesunden durchflusszytometrisch vermessen und analysiert.

#### 3.4.1 Durchflusszytometrische Analysestrategien der B-Zell-Subpopulationen von Milzproben

Die Abbildung 14 zeigt die Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen in der Milz. Dabei wurde zunächst der gesamte Bereich der Lymphozyten (R1) aus der Menge der vermessenen mononukleären Zellproben eingegrenzt. Danach wurde der Bereich einzelner Zellen jeweils im Seitwärtsstreulicht mit SSC-H gegen SSC-W (R2) und im Vorwärtsstreulicht mit FSC-H gegen FSC-W (R3) festgesetzt, um mögliche Agglomerate von Zellen zu eliminieren. Die Population der Gesamt-B-Zellen (R4) wurde durch die Auftragung von CD19 gegen CD27 erhalten. Ausgehend hiervon konnten die relevanten B-Zell-Subpopulationen durch Gegenüberstellung von bestimmten Oberflächen- bzw. intrazellulären Markern erhalten werden.

## Ergebnisse

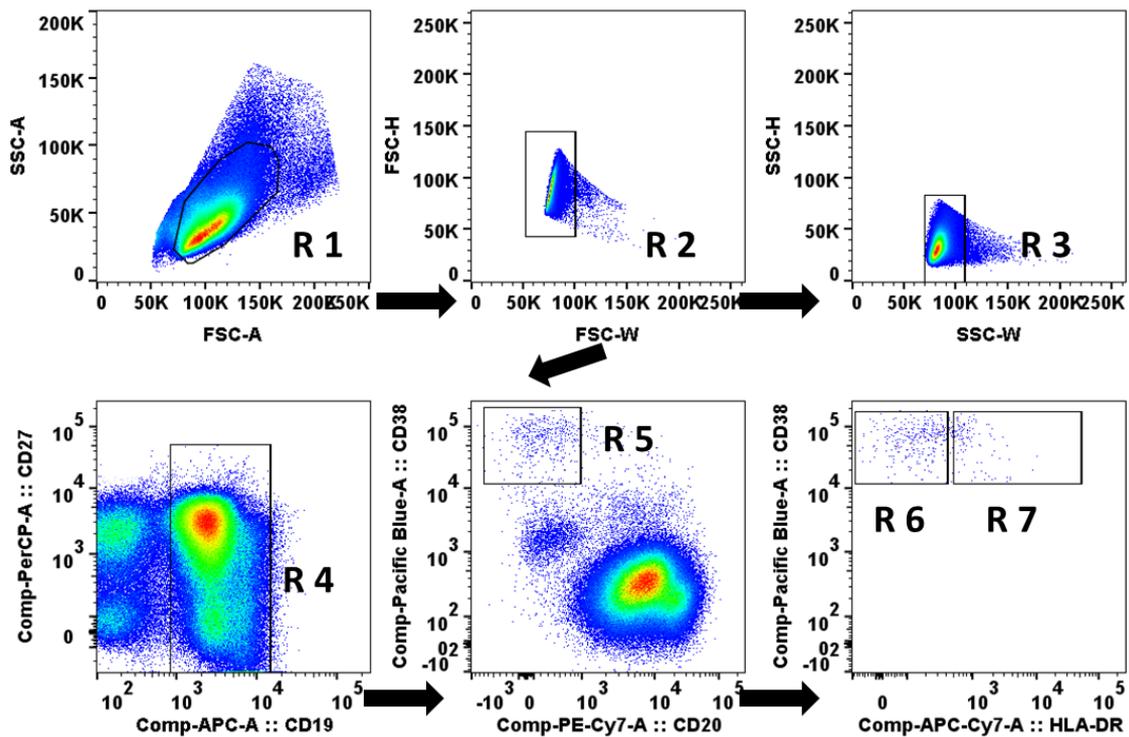


Abbildung 14: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen in der Milz.

Die Population der Lymphozyten wurde anhand der Signale des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A, entspricht Größe) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC-A, entspricht Granularität) festgelegt (R1, Lymphozyten). Die Einzelzellen der Lymphozyten wurden im Vorwärtsstreulicht mit FSC-H gegen FSC-W (R2) und im Seitwärtsstreulicht mit SSC-H gegen SSC-W (R3) von Dupletten/Aggregaten getrennt. Die B-Zellen wurden als CD19+, CD27+ sowie CD27- Zellen definiert (R4). Die B-Zellen wurden nach den Oberflächenmarkern CD38 gegen CD20 untersucht. Es wurden folgende B-Zell-Population definiert: CD38+CD20- (R5, antikörperproduzierende Zellen), CD38+HLA-DR- (R6, Plasmazellen) und CD38+HLA-DR+ (R7, Plasmablasten).

### 3.4.2 Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen von Milzproben

Die Milz ist der Hauptreifungsort der Transitional-B-Zellen zu reifen, naiven B-Zellen. Werden die reifen B-Zellen durch Antigen-Kontakt aktiviert, bilden diese nach Vermehrung, Differenzierung und Affinitätsreifung die Keimzentren aus. Dabei werden Sie dann als Keimzentrum-B-Zellen bezeichnet. In diesen werden die kurzlebigen Plasmablasten, die sich zum Teil weiter zu Plasmazellen differenzieren, sowie die Gedächtnis-B-Zellen gebildet. Letztere lassen sich in zwei

Untergruppen einteilen, diejenigen mit Immunglobulinklassenwechsel und diejenigen ohne. In dieser Arbeit wurden die B-Zell-Subpopulationen der Milz von naiven B-Zellen, von Keimzentrum-B-Zellen, von antikörperproduzierenden Plasmablasten und von Plasmazellen, sowie von Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel und Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel analysiert.

### 3.4.2.1 Vergleich ITP-Patienten gegen Gesundheitskontrollen

Zunächst wurde die Population der naiven B-Zellen durch IgM-positive und CD27-negative Marker charakterisiert. Hierbei zeigten sich bei der Kontrollgruppe mit einer gemittelten Häufigkeit von 46,0 % (+/-19,7), im Vergleich zu 49,1 % (+/-24,3) bei den ITP-Patienten keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,758$ ) (Abbildung 15).

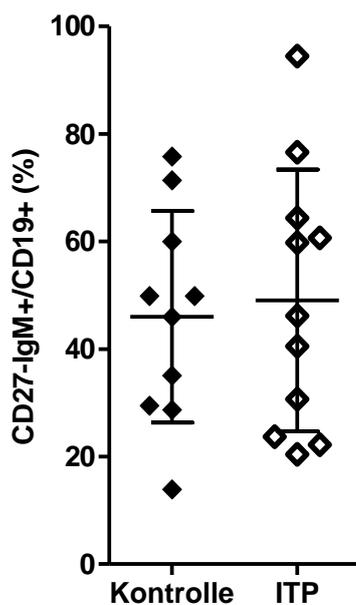


Abbildung 15: Relativer Anteil der naiven B-Zellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils reifer (naiver) B-Zellen (CD27-IgM+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten in der Milz. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

In der weiteren Analyse wurden die sogenannten Keimzentrum-B-Zellen untersucht (Abbildung 16). Diese wurden als CD24-CD38+ Zellen charakterisiert. Die Mittelwerte dieser Population lagen bei den ITP-Patienten mit 0,74 % (+/-

0,7) gegenüber 0,48 % (+/-0,5) bei den Gesunden etwas höher. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant mit  $p = 0,315$ .

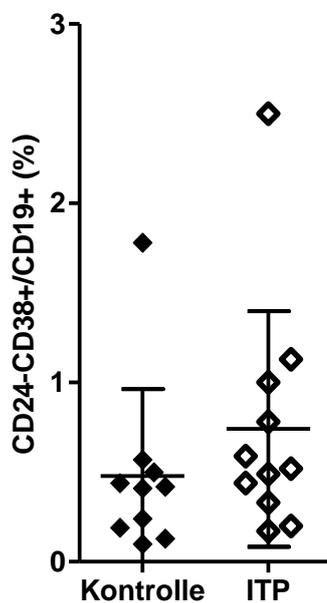


Abbildung 16: Relativer Anteil der Keimzentrum-B-Zellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der Keimzentrum-B-Zellen (CD24-CD38+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Gedächtnis-B-Zellen der Milz lassen sich in eine Population mit Ig-Klassenwechsel (CD27+IgM-) (Abbildung 17) und eine ohne Ig-Klassenwechsel (CD27+IgM+) (Abbildung 18) einteilen. Dabei zeigte sich in der Gruppe mit Ig-Klassenwechsel bei der Kontrollgruppe ein Wert von 20,5 % (+/-11,8) und bei der ITP-Gruppe ein Mittelwert von 19,4 % (+/-12,9). Die Werte waren allerdings statistisch nicht signifikant erhöht mit einem  $p = 0,845$ .

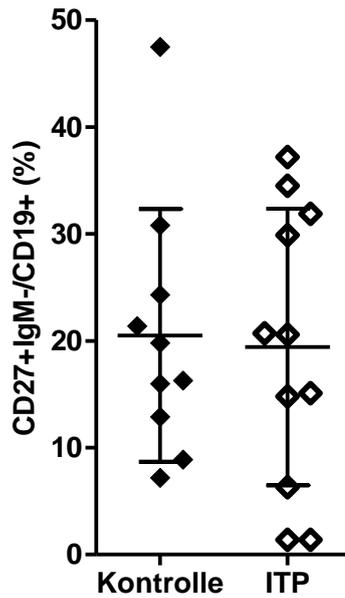


Abbildung 17: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel in der Milz.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel (CD27+IgM-) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Ebenso zeigten sich die Unterschiede der Mittelwerte in der Gruppe ohne Klassenwechsel als nicht statistisch signifikant mit  $p = 0,465$ . Hierbei lagen die Mittelwerte der Gesunden bei 27,6 % (+/-9,9) und bei 23,7 % (+/-13,5) bei den ITP-Patienten.

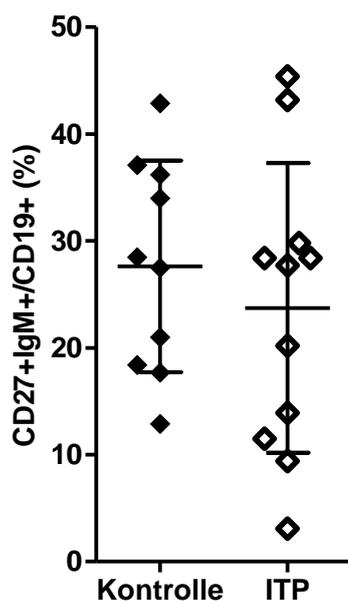


Abbildung 18: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel in der Milz.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel (CD27+IgM+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Innerhalb der CD27+IgM- Gedächtnis-B-Zellen wurde die Verteilung von IgA+ bzw. IgG+ B-Zellen genauer untersucht. Der relative Anteil IgG+ B-Zellen innerhalb der CD27+IgM- Gedächtnis-B-Zellen war zwischen den ITP-Patienten und den Kontrollen nicht signifikant ( $p = 0,632$ ) unterschiedlich ((ITP 27,0 % (+/-14,4); Kontrolle 23,7 % (+/-16,4)) (Abbildung 19).

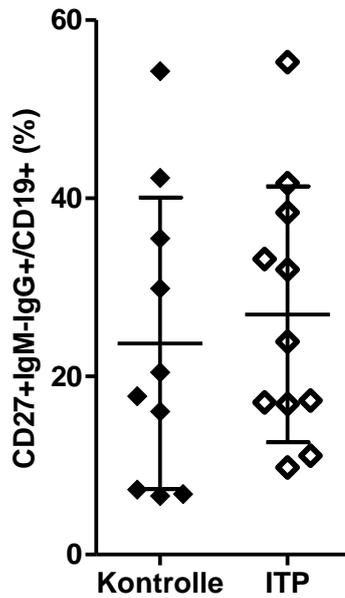


Abbildung 19: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit IgG-Klassenwechsel in der Milz.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen mit IgG-Klassenwechsel (CD27+IgM-IgG+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich in der IgA-Klasse mit 13,1 % (+/-5,7) bei der ITP-Gruppe und 18,8 % (+/-7,7) bei der Kontrollgruppe. Hier war jedoch eine, wenn auch nicht signifikante Tendenz, im Sinne eines leicht erhöhten Mittelwertes der Gesunden zu den ITP-Patienten mit  $p = 0,066$  zu erkennen (Abbildung 20).

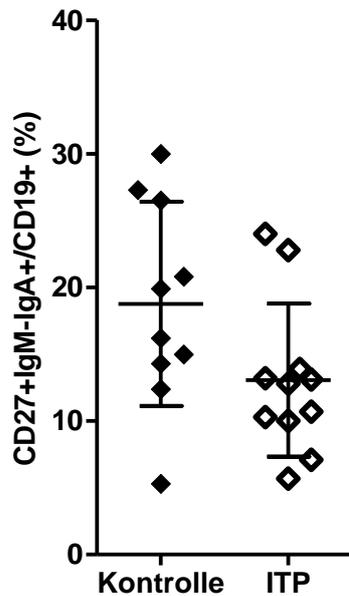


Abbildung 20: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit IgA-Klassenwechsel in der Milz.

Vergleich des relativen Anteils der Gedächtnis-B-Zellen mit IgA-Klassenwechsel (CD27+IgM-IgA+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Eine zusätzliche B-Zell-Subpopulation wurde mit der Gruppe der atypischen B-Zellen, d. h. B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel (IgM-), aber ohne Expression des klassischen Gedächtnis-B-Zell Markers CD27, analysiert (Abbildung 21). In dieser Gruppe lagen die Mittelwerte bei 5,9 % (+/-3,5) bei den Gesunden und bei 7,8 % (+/-4,7) bei den ITP-Patienten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ( $p = 0,315$ ).

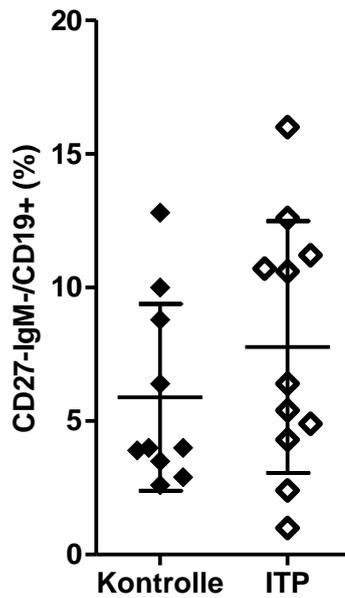


Abbildung 21: Relativer Anteil der atypischen B-Zellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der atypischen B-Zellen (CD27-IgM-) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Gruppe der atypischen B-Zellen lässt sich weiter in zwei Untergruppen mit IgG positiven (Abbildung 22) bzw. IgA positiven (Abbildung 23) Zellen unterteilen. In der erweiterten Analyse der IgG positiven Untergruppe der atypischen B-Zellen lag der Mittelwert der Kontrollgruppe bei 2,5 % (+/-1,2), sowie bei 4,2 % (+/-3,3) in der ITP-Gruppe bei einem  $p = 0,147$ .

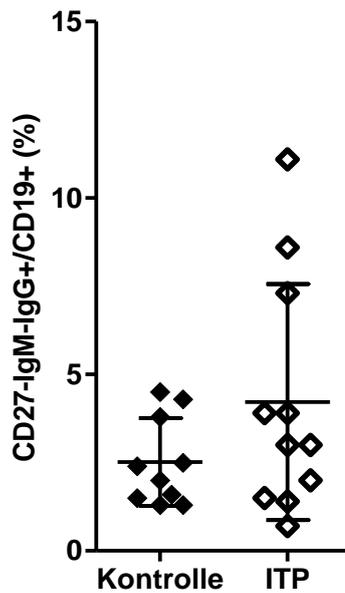


Abbildung 22: Relativer Anteil der IgG+ atypischen B-Zellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der IgG+ atypischen B-Zellen (CD27-IgM-IgG+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

In der IgA-Untergruppe zeigten sich Mittelwerte der Gesundkontrollen von 1,2 % (+/-0,8) und 1,0 % (+/-0,8) bei den ITP-Patienten. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden ( $p = 0,655$ ).

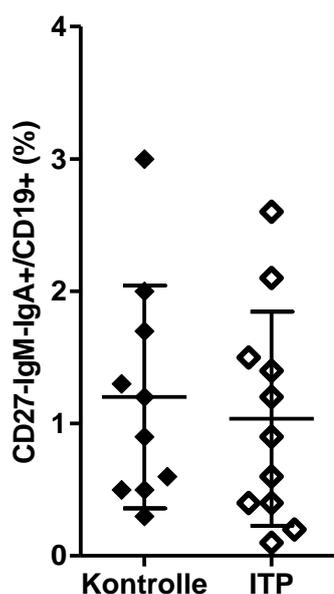


Abbildung 23: Relativer Anteil der IgA+ atypischen B-Zellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der IgA+ atypischen B-Zellen (CD27-IgM-IgA+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.4.2.2 Vergleich der antikörperproduzierenden Zellen in der Milz bei ITP-Patienten

Zu der Gruppe der antikörperproduzierenden Zellen gehören die kurzlebigen Plasmablasten (CD19+CD20-CD38++HLA-DR+) und die langlebigen Plasmazellen (CD19+CD20lowCD38++HLA-DR-). Beide tragen zur Antikörperbildung gegen spezifische Antigene bei, wobei die Plasmablasten, im Gegensatz zu den Plasmazellen, noch proliferieren.

Innerhalb der CD19+ B-Zellen zeigte sich bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 24) ein statistisch signifikant ( $p = 0,044$ ) erhöhter Anteil an Plasmablasten (ITP 0,84 % (+/-1,0); Kontrolle 0,15 % (+/-0,1)).

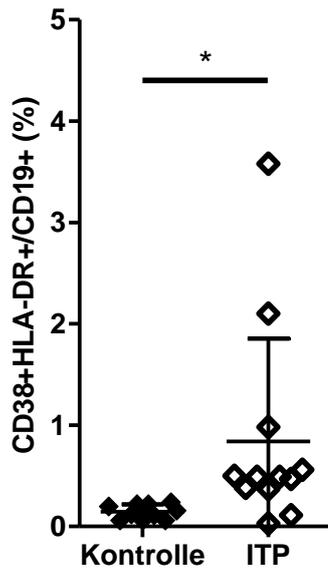


Abbildung 24: Relativer Anteil der Plasmablasten in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der Plasmablasten (CD38+HLA-DR+) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Bei den Plasmazellen (Abbildung 25) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede mit  $p = 0,754$ . In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei 0,17 % (+/-0,2) und 0,21 % (+/-0,3) in der ITP-Gruppe.

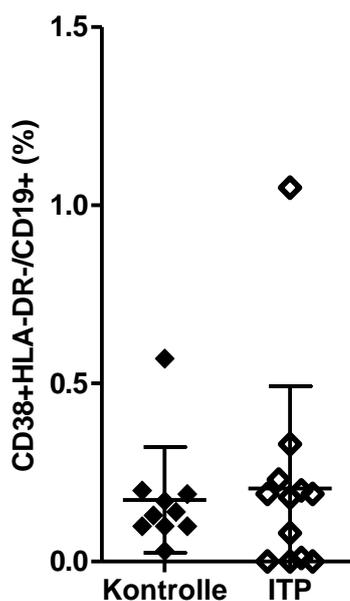


Abbildung 25: Relativer Anteil der Plasmazellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der Plasmazellen (CD38+HLA-DR-) innerhalb der CD19+ B-Zellen von Gesunden (= Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Es wurden die Populationen der Plasmablasten noch weiter entsprechend dem Isotyp ihres produzierten Antikörpers in IgM+, IgG+ oder IgA+ Zellen unterteilt (Abbildung 26). Hierbei zeigten sich bei den verschiedenen Isotypen zwischen Gesundkontrollen und ITP-Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Mittelwerte in der IgM-Gruppe lagen bei 28,7 % (+/-11,3) bei den Gesunden und bei 28,2 % (+/-10,5) bei den ITP-Patienten ( $p = 0,938$ ). In der IgG-Gruppe lagen die Mittelwerte bei 49,7 % (+/-14,3) bei den Gesunden und 42,6 % (+/-10,7) bei den ITP-Patienten ( $p = 0,352$ ). Schließlich zeigten sich in der IgA-Gruppe Mittelwerte von 15,1 % (+/-6,3) bei den Gesunden und 14,3 % (+/-10,0) bei den ITP-Patienten ( $p = 0,871$ ).

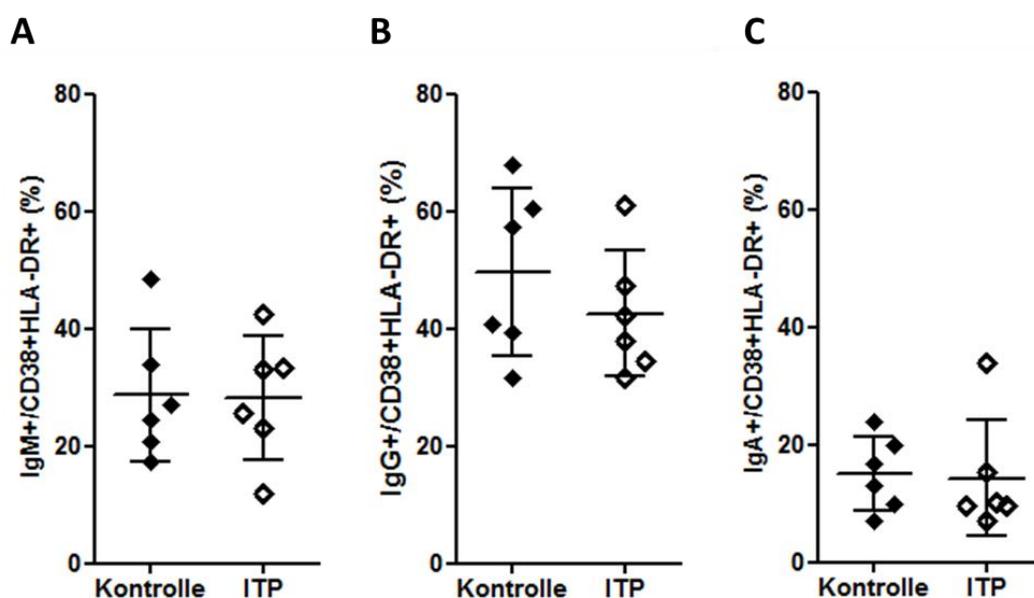


Abbildung 26: Isotypenverteilung der Plasmablasten in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der (A) IgM+ Plasmablasten (CD38+HLA-DR+), (B) IgG+ Plasmablasten (CD38+HLA-DR+) und (C) IgA+ Plasmablasten (CD38+HLA-DR+) von Gesunden (=Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Gruppe der Plasmazellen wurde ebenso nach dem Isotyp ihres produzierten Antikörpers in IgM+, IgG+ oder IgA+ Zellen unterteilt und danach zwischen Gesunden und ITP-Patienten verglichen (Abbildung 27). Dabei lagen die Mittelwerte des IgM-Rezeptors bei 12,4 % (+/-1,8) in der Kontrollgruppe und bei 20,4 % (+/-9,1) in der Patientengruppe. Es zeigte sich somit eine leichte, wenn auch nicht signifikante ( $p = 0,062$ ) Tendenz zu erhöhten Werten von IgM positiven Zellen bei der ITP-Gruppe. Bei den IgG positiven Zellen lagen die Mittelwerte der Kontrollgruppe bei 64,5 % (+/-6,2) und 58,9 % (+/-11,5) in der ITP-Gruppe. Mit  $p = 0,315$  war hier kein signifikanter Unterschied vorhanden. Schließlich lag in der Gruppe der IgA-positiven Zellen der Mittelwert der Gesunden bei 20,7 % (+/-5,8) und der ITP-Patienten bei 18,0 % (+/-10,4). Daraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,595$ ).

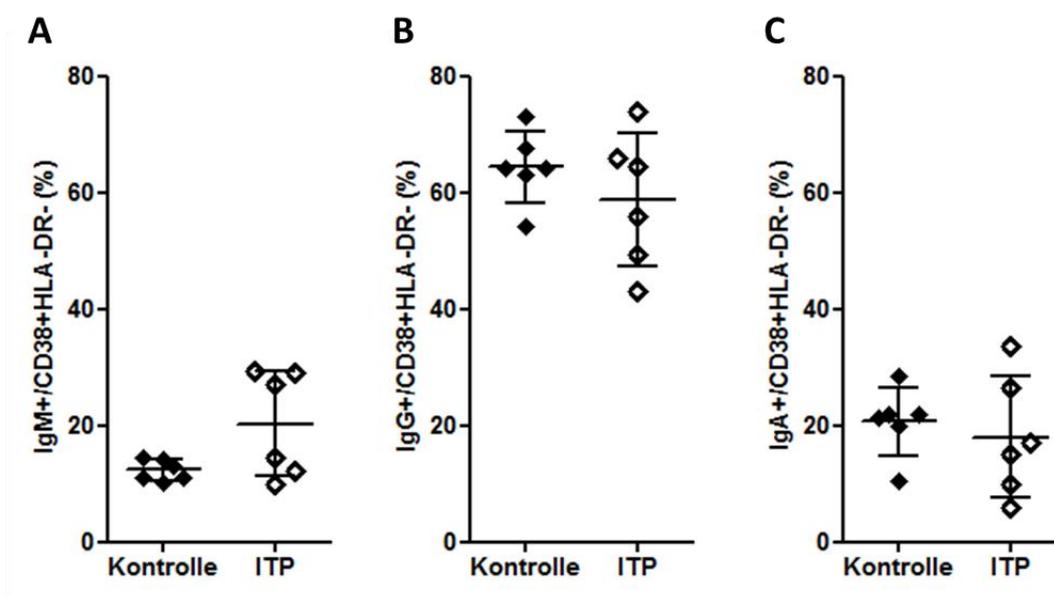


Abbildung 27: Isotypenverteilung der Plasmazellen in der Milz. Vergleich des relativen Anteils der (A) IgM+ Plasmazellen (CD38+HLA-DR-), (B) IgG+ Plasmazellen (CD38+HLA-DR-) und (C) IgA+ Plasmazellen (CD38+HLA-DR-) von Gesunden (=Kontrolle) und ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Für den direkten Vergleich der Isotypenverteilung IgM, IgG und IgA in den Populationen der Plasmazellen und der Plasmablasten innerhalb der antikörperproduzierenden Zellen der ITP-Patienten wurden diese in Abbildung 28 gegenübergestellt. Hierbei wurde zur statistischen Auswertung innerhalb der ITP-Proben der gepaarte t-Test herangezogen. Dabei lag der Mittelwert der IgM-positiven Plasmablasten mit 28,2 % (+/-10,5) statistisch signifikant höher ( $p = 0,026$ ) gegenüber dem der Plasmazellen mit 20,4 % (+/-9,1). Bei der Gruppe der IgG-positiven Zellen zeigten sich dagegen die Häufigkeitswerte der Plasmazellen im Mittel mit 58,9 % (+/-11,5) signifikant höher als die der Plasmablasten mit 42,6 % (+/-10,7). Der p-Wert lag hier bei 0,014. Die Gruppe der IgA-positiven Plasmablasten und Plasmazellen zeigte im Vergleich keine signifikanten Unterschiede mit  $p = 0,148$ . Die Mittelwerte lagen entsprechend bei 14,3 % (+/-10,0) und 18,0 % (+/-10,4).

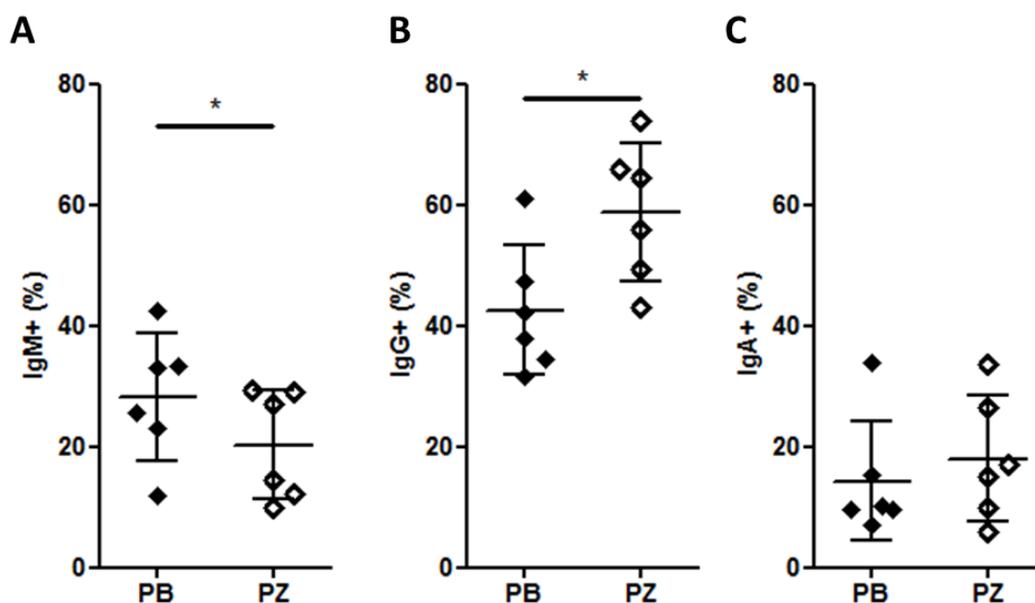


Abbildung 28: Isotypenverteilung der exprimierten Immunglobuline bei Plasmablasten und Plasmazellen in der Milz.

Vergleich der relativen Anteile der (A) IgM+ Plasmablasten (PB) gegen Plasmazellen (PZ), (B) IgG+ Plasmablasten gegen Plasmazellen und (C) IgA+ Plasmablasten gegen Plasmazellen in der Milz von ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Plasmablasten sind im Vergleich zu Plasmazellen kürzlich aktivierte Zellen. Um den Aktivierungszustand der in dieser Arbeit untersuchten Populationen der Plasmablasten und Plasmazellen zu ermitteln, wurde als Indikator des Aktivierungsstatus die durchschnittliche Expressionsstärke (MFI = mittlere Fluoreszenzintensität) von CD86, einem auf aktivierten B-Zellen exprimierten kostimulatorischen Molekül, verglichen (Abbildung 29). Zur statistischen Auswertung wurde der gepaarte t-Test herangezogen. Der Mittelwert der MFI von CD86 lag bei den Plasmablasten der ITP-Patienten bei 392,7 (+/-173,0) und bei den Plasmazellen bei 189,4 (+/-55,6). Damit lagen die MFI-Werte für CD86 bei den Plasmablasten im Mittel signifikant höher als bei den Plasmazellen ( $p = 0,020$ ).

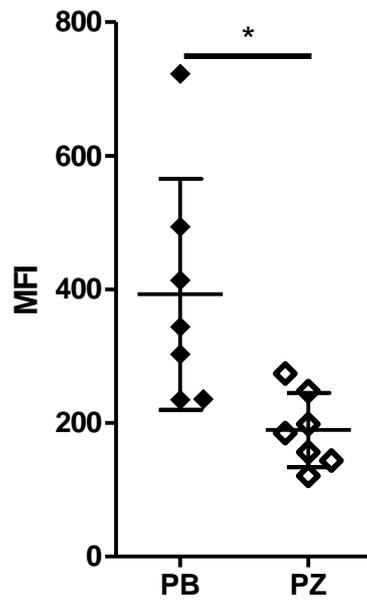


Abbildung 29: Expressionsstärke von CD86 bei Plasmablasten und Plasmazellen in der Milz.

Vergleich der durchschnittlichen Expressionsstärke (MFI) von Plasmablasten (PB) und Plasmazellen (PZ) bei ITP-Patienten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 4 Diskussion

In meiner Arbeit untersuchte ich die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen in unterschiedlichen Reifungsstadien von Patienten mit primärer, chronischer ITP im Vergleich zu Gesundkontrollen, mit dem Ziel, eventuelle Störungen in der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung bei ITP-Patienten zu charakterisieren sowie die Ebene, auf der diese Störungen auftreten, zu definieren. Eine wichtige Grundlage für diese Studien bildet hierbei die Untersuchung verschiedener Gewebeproben von Organen, die an der B-Zell-Entwicklung beteiligt sind, wie die Milz, das Knochenmark und das Blut. Blut- und zu einem gewissen Grad Knochenmarkproben sind in großen Mengen verfügbar. Milzgewebe ist allerdings nur eher selten untersuchbar, da zum einen die Splenektomie lediglich als Ultima ratio in der ITP-Therapie angewandt wird und zum anderen die Milzen der Gesundkontrollen von verunfallten Patienten mit Milzrupturen stammen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Untersuchung einer Autoimmunkrankheit, wie der primären, chronischen ITP, sich als schwierig gestaltet, da es sich um eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 9,5 auf 100 000 Erwachsenen handelt [12, 13]. Zudem ist die primäre bzw. idiopathische und mit mehr als 12 Monaten bestehende, chronische Form der ITP nicht so häufig anzutreffen. In dieser Arbeit ist es dennoch gelungen, Proben von 22 Patienten mit chronischer ITP zu analysieren und somit signifikante Aussagen bezüglich der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung zu treffen. Um die Proben zu charakterisieren wurden 11 verschiedene Oberflächenmarker verwendet, die es ermöglichten 15 verschiedene B-Zell-Subpopulationen zu unterscheiden und so einen detaillierten Überblick über die B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung zu erhalten. Allerdings sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Dadurch könnten sich eventuelle Probleme in der Zuordnung von Oberflächenmarkern zu neuen Subpopulationen und deren Abgrenzung ergeben.

Erschwerend kommt hinzu, dass die Wechselwirkungen zwischen den B-Zell-Subpopulationen und den in der ITP-Therapie eingesetzten Medikamenten schwierig vorherzusehen sind. Da alle untersuchten Patienten medikamentös

vorbehandelt worden waren, könnten Unterschiede der in der Arbeit untersuchten B-Zell-Subpopulationen potentiell auch hierdurch hervorgerufen worden sein. Eine Kontrollgruppe, anhand derer diese Hypothese verfolgt werden könnte (behandelte Gesunde bzw. nicht behandelte Erkrankte), stand jedoch nicht zur Verfügung. Mögliche Einflüsse im Zusammenhang mit Medikamenteneinnahmen bei den Gesundkontrollen sind auch nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, da bei einem kleinen Teil der Gesundkontrollen diese Information nicht vorlag.

### 4.1 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Blutes

Es zeigte sich bei der Analyse der Blutproben der Gesundkontrollen in der Kohorte der Kinder (0-8 Jahren) eine signifikante Erhöhung des relativen Anteils der B-Zellen im Vergleich zu den ITP-Patienten. In den anderen beiden Alterskohorten waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Studie von Talaat et al. [102], der B-Zell-Subpopulationen bei Kindern mit ITP im Vergleich zu Gesunden untersuchte. In dieser Studie lag der Mittelwert der B-Zellen bei den an ITP erkrankten Kindern statistisch nicht signifikant höher als bei den Gesundkontrollen, allerdings war eine Erhöhung als Tendenz auszumachen. Beachtet werden muss aber zum einen die unterschiedliche Altersstruktur der Kinderkohorte mit 1-12 Jahren in dieser Studie im Vergleich zu 0-8 Jahren in meiner Arbeit und zum anderen, dass in dieser Studie auch akute ITP-Patienten mit eingeschlossen worden waren. Dabei stellte sich heraus, dass vermehrt akute ITP-Patienten, nicht aber Patienten mit chronischer ITP, eine erhöhte Zahl an B-Zellen aufwiesen. Im Gegensatz zu meiner Arbeit gibt es auch Studien, die bei Erwachsenen ein signifikant erhöhten Anteil an B-Zellen bei ITP-Patienten im Blut gegenüber Gesunden zeigten [103, 104]. Bei Flint et al. waren, ebenso wie in meiner Arbeit, bei der dort untersuchten Erwachsenenkohorte keine signifikanten Unterschiede zwischen den ITP-Patienten und den Gesundkontrollen vorhanden [105].

Bei den Transitional-B-Zellen lagen die Anteile der Gesundkontrollen in der Kohorte der Kinder und der Kohorte der Jugendlichen (9-18 Jahren) signifikant höher als bei den ITP-Patienten. Bei der Erwachsenenkohorte waren keine

## Diskussion

---

Unterschiede vorhanden. Im Zusammenhang mit einer Studie über CD19+CD24+CD38+ Transitional-B-Zellen, die möglicherweise auch regulatorische B-Zellen beinhalten, wurden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den erwachsenen ITP-Patienten und den Gesunden gefunden. Die einzige Ausnahme stellte dort die Untergruppe der nicht-splenektomierten ITP-Patienten mit weniger als 50 000 Thrombozyten/ $\mu$ l dar. Dort konnte eine signifikante Erniedrigung der Transitional-B-Zellen in der ITP-Gruppe im Vergleich zu den Gesundheitskontrollen beobachtet werden [106].

Bei der Analyse der Anteile der naiven B-Zellen zeigten sich in meiner Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den ITP-Patienten und Gesunden. Laut einer Studie von Lyu et al. war der Mittelwert der naiven B-Zellen der Erwachsenenkohorte bei Patienten mit aktiver ITP, d. h. mit einer Thrombozytenzahl unter 50 000/ $\mu$ l, gegenüber den Gesundheitskontrollen signifikant erniedrigt [104]. Eine weitere Studie von Martinez-Gamboa et al. zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen der naiven B-Zellen der Erwachsenenkohorte bei ITP-Patienten im Vergleich zu Gesundheitskontrollen und stimmt somit mit den Ergebnissen meiner Arbeit überein. In dieser Studie wurde zusätzlich der Einfluss einer Splenektomie auf einige B-Zell-Untergruppen untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb der Gruppe der ITP-Patienten, als auch der Gruppe der Gesunden, ein signifikanter Anstieg der naiven B-Zellen in den Blutproben vor der Splenektomie verglichen mit Blutproben, die zwei Jahre nach der Splenektomie entnommen wurden [107]. Die Ergebnisse meiner Arbeit werden ebenso von einer Studie von Flint et al. unterstützt. Hier waren bei erwachsenen ITP-Patienten, im Vergleich zu Gesunden, in den Blutproben auch keine signifikanten Unterschiede bei den Mittelwerten der naiven B-Zellen nachweisbar [105].

Des Weiteren zeigten sich in meiner Arbeit bei den Kohorten der Jugendlichen und Erwachsenen bei den Anteilen der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel signifikante Erniedrigungen bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesundheitskontrollen. Die Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel waren bei den ITP-Patienten in der Kinderkohorte hingegen signifikant erhöht im Vergleich zu

den Gesundkontrollen. Auch zeigten sich statistisch signifikante Erhöhungen bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesunden in den Kohorten der Kinder und Jugendlichen bei den atypischen Gedächtnis-B-Zellen. Lyu et al. untersuchte auch die Gedächtnis-B-Zell-Subpopulation, definiert als CD19+CD27+ Zellen, bei erwachsenen Patienten mit aktiver ITP. Im Vergleich zu meiner Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung dieser B-Zell-Subpopulation bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesundkontrollen festgestellt werden [104]. Allerdings untersuchte Lyu et al. die gesamte Gedächtnis B-Zell-Population und unterschied nicht zwischen den einzelnen Untergruppen in der Population wie in meiner Arbeit. Eine Studie von Martinez-Gamboa et al. untersuchte unter anderem die verschiedenen Gedächtnis-B-Zellen-Subpopulationen bei erwachsenen ITP-Patienten und Gesunden. Es wurde hier der Einfluss der Splenektomie auf die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen untersucht. Bei den ITP-Patienten konnte nur bei den atypischen Gedächtnis-B-Zellen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Gesundkontrollen in der jeweiligen Kohorte vor der Splenektomie beobachtet werden. Die Splenektomie hatte keinen Einfluss auf den relativen Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit oder ohne Klassenwechsel bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesunden. Interessanterweise konnte aber ein Einfluss des Zeitpunkts der Blutprobenentnahme innerhalb der Gruppe der ITP-Patienten im Hinblick auf die Splenektomie beobachtet werden. Dabei zeigte sich bei den Blutproben, die sechs Monate bzw. mehr als zwei Jahre nach Splenektomie abgenommen wurden, eine signifikante Erniedrigung der Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen mit oder ohne Klassenwechsel im Vergleich zu den Proben, die vor der Splenektomie entnommen wurden [107]. Die Ergebnisse einer Studie von Flint et al. zeigten in der Kohorte der erwachsenen ITP-Patienten im Vergleich zu Gesunden bei den relativen Anteilen der Gedächtnis-B-Zellen mit oder ohne Klassenwechsel sowie den atypischen Gedächtnis-B-Zellen, keine statistisch signifikanten Unterschiede [105]. Dies war auch in meiner Arbeit bei den Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel, sowie den atypischen B-Zellen nachweisbar, nicht jedoch bei den Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel.

In meiner Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der anergen (CD21low CD38low) B-Zellen bei den Kohorten der Kinder und Jugendlichen innerhalb der

ITP-Patienten festgestellt werden. Die Studie von Flint et al. betrachtete das Auftreten von anergen B-Zellen etwas differenzierter. In dieser Studie wurden Veränderungen der anergen Zellen in den verschiedenen B-Zell-Subpopulationen bei erwachsenen ITP-Patienten und Gesunden untersucht. Im Gegensatz zu der Erwachsenenkohorte in meiner Arbeit, bei der sich eine nicht signifikante Tendenz eines erhöhten Mittelwerts bei den ITP-Patienten zeigte, lagen in dieser Studie statistisch signifikante Erhöhungen der anergen B-Zellen in der großen Untergruppe der naiven B-Zellen, sowie den CD27+IgD+Gedächtnis-B-Zellen, bei den ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesundkontrollen vor. Es stellte sich heraus, dass diese Erhöhungen der anergen B-Zellen bei den naiven B-Zellen jedoch nur für die ITP-Patienten mit messbaren Autoantikörpern gegen Thrombozyten zutrafen und die Werte sich tendenziell wieder den Gesundheitswerten durch Therapien mit Rituximab oder nach Splenektomie angleichen. Weiterhin zeigte sich in dieser Studie kein Zusammenhang zu der Krankheitsaktivität, gemessen an dem Ausmaß der Thrombozytopenie [105].

Bei den antikörperproduzierenden Zellen, bestehend aus den Plasmablasten und den Plasmazellen, war in meiner Arbeit eine statistisch signifikante Erhöhung dieser nur bei den Gesundkontrollen in der Kohorte der Jugendlichen feststellbar. Die Studie von Flint et al. zeigt ebenso keine signifikanten Unterschiede bei der Erwachsenenkohorte bei den im Blut befindlichen Plasmablasten zwischen ITP-Patienten und Gesundkontrollen [105].

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse aus der Untersuchung von Blutproben von ITP-Patienten, dass diese auf der Ebene der frühen B-Zell-Entwicklung und -Reifung keine wesentlichen Auffälligkeiten aufzuweisen scheinen, und dass bei der primären ITP in diesem Entwicklungsabschnitt möglicherweise keine für die B-Zell-Pathogenese relevanten Störungen auf zellulärer Ebene vorliegen. Ein Hinweis hierfür ist, dass bei den Erwachsenen keine signifikanten Unterschiede bei den frisch aus dem Knochenmark kommenden Transitional-B-Zellen und den naiven B-Zellen, übereinstimmend mit der Literatur, erkennbar sind. Bei den Kindern und Jugendlichen zeigte sich jedoch ein verminderter Anteil an Transitional-B-Zellen, sodass sich die Pathogenese der chronischen ITP bei Kindern/Jugendlichen und

Erwachsenen möglicherweise unterscheidet. Bei den ITP-Patienten fiel ein erhöhter Anteil an anergen und atypischen Gedächtnis-B-Zellen auf, von denen allgemein angenommen wird, dass diese aus einer chronischen bzw. dysregulierten antigen-abhängigen B-Zell-Aktivierung stammen. Somit finden sich, zumindest im Blut von chronischen ITP-Patienten, erste Abweichungen von der Norm auf zellulärer Ebene erst in den B-Zell-Differenzierungsstadien, von denen angenommen wird, dass sie nach Antigenkontakt entstanden sind, nicht aber in den pre-immunen B-Zell-Populationen. Der Vergleich meiner Ergebnisse, hinsichtlich der Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen und der anergen B-Zellen zur Literatur gestaltet sich schwierig, da deren relativen Anteile stark von der durchgeführten Therapie wie der Splenektomie oder der Gabe von Rituximab abhängen. Außerdem sollten bereits publizierte Studien kritisch hinterfragt werden, da selten vorangegangene Therapien in die Interpretation der Untersuchungen miteinbezogen werden.

### **4.2 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen des Knochenmarks**

Um mögliche Veränderungen der frühen, pre-immunen B-Zell-Entwicklung genauer analysieren zu können, wurde die Verteilung von B-Zell-Vorläufer-Populationen im Knochenmark von ITP-Patienten untersucht. Die Analyse der Knochenmarkproben von Gesundkontrollen und ITP-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen (Pro-, Pre-, unreife und reife B-Zellen). Eine Studie von Alavi et al. untersuchte die Expression von Markern unreifer B-Zellen (CD10) sowie reifer B-Zellen (CD19, CD20 und CD22) des Knochenmarks. Es zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression von CD10, CD19 und CD20 bei ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesundkontrollen. Es wurden aber nur Kinder, die im Schnitt vier Jahre alt waren und unter Prednisolon- sowie Immunglobulintherapie standen, rekrutiert. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Expression von CD22 [108]. Eine weitere Studie von Guizir et al. unterstützt diese Ergebnisse mit einer signifikanten Erhöhung von CD19 und CD10 auf den unreifen B-Zellen im Knochenmark von ITP-Patienten im Kindesalter zwischen 2-13 Jahren [109].

Aufgrund meiner Ergebnisse, die keinen signifikanten Unterschied zwischen der ITP-Gruppe und den Gesunden zeigen konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark und damit verbunden möglicherweise auch die zentralen Toleranzmechanismen bei ITP-Patienten nicht gestört werden und somit nicht Teil der Pathogenese sind. Es sei angemerkt, dass die Untersuchung von Knochenmarkproben wegen der geringen Aussagekraft standardmäßig nicht zur Diagnose oder Verlaufskontrolle der ITP genutzt wird [110, 111].

### **4.3 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen der Milz**

Um die späten Stadien der B-Zell-Differenzierung (auch nach Antigenkontakt) von Patienten mit chronischer ITP hinsichtlich möglicher Veränderungen zu analysieren wurden Milzproben von splenektomierten ITP-Patienten für die Untersuchungen herangezogen. Die Milz gilt nicht nur als Ort des Abbaus von Thrombozyten, sondern auch als der Ort der Entstehung autoantikörper-sezernierender Zellen. Der genaue Phänotyp der autoantikörper-sezernierenden Zellen ist bei der ITP jedoch nicht bekannt. Die Analyse der Milzproben zeigte bei den naiven B-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gesundkontrollen und ITP-Patienten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Aslam et al [112]. Eine Studie von Olsson et al. zeigt lediglich in der roten Pulpa der Milz von ITP-Patienten erhöhte Anteile an B-Zellen im Vergleich zu Gesunden [99].

Ebenso zeigten sich in meiner Arbeit keine signifikanten Unterschiede bei den Keimzentrum-B-Zellen, den Gedächtnis-B-Zellen mit oder ohne Klassenwechsel, den IgG+ oder IgA+ Gedächtnis-B-Zellen, sowie den IgG+ oder IgA+ atypischen Gedächtnis-B-Zellen. Im Unterschied hierzu steht eine Studie, die eine signifikante Erhöhung von Keimzentrum-B-Zellen in der Milz bei der Gruppe der ITP-Patienten gegenüber den Gesundkontrollen zeigt [113].

Beim Vergleich der antikörperproduzierenden Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Plasmablasten bei den ITP-Patienten gegenüber den Gesundkontrollen. Außerdem zeigte sich beim Vergleich der Expressionsstärke von CD86, als Indikator des Aktivierungsstatus, bei den Plasmablasten und

Plasmazellen bei ITP-Patienten eine statistisch signifikant höhere Expression bei den Plasmablasten. Die vermehrte Expression von CD86 auf diesen Zellen im Vergleich zu Plasmazellen lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine erst kürzlich aktivierte Zellpopulation handelt. Die Analyse der relativen Häufigkeiten der Plasmazellen bei den ITP-Patienten im Vergleich zu Gesunden lieferte dagegen keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis stimmt mit der wissenschaftlichen Literatur überein. Eine Studie von Mahevas et al. zeigte ebenso eine statistisch signifikante Erhöhung der Plasmablasten bei der Gruppe der ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesunden. Des Weiteren konnten in dieser Studie, übereinstimmend mit meiner Arbeit, keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl von Plasmazellen beobachtet werden [113].

Es zeigte sich in meiner Arbeit bei dem Vergleich der Isotypenverteilung zwischen den Plasmablasten und Plasmazellen in der Milz von ITP-Patienten eine signifikante Erhöhung des IgM+ Anteils innerhalb der Plasmablasten, wohingegen bei den Plasmazellen ein signifikant vermehrter Anteil IgG exprimiert wurde. Bei dem Anteil IgA positiver Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Plasmablasten und Plasmazellen. In der Literatur konnte ebenso gezeigt werden, dass in den Plasmazellen der Milz hauptsächlich der IgG-Isotyp nachweisbar ist und kaum IgM- und IgA-Isotypen [113]. Als Anmerkung muss hier jedoch aufgeführt werden, dass in dieser Studie die Milzproben von vorher fehlgeschlagenen Therapien mit Rituximab zur Analyse der Plasmazellzahlen und deren Isotypenverteilung herangezogen wurden. Die Autoren bezeichnen diese hauptsächlich IgG+ Plasmazellen als langlebige Plasmazellen, die vermehrt nach einer Rituximab-Therapie in der Milz auftreten. Die in meiner Arbeit untersuchten Patienten waren mit Ausnahme eines Patienten nicht mit Rituximab vorbehandelt.

Aus der Analyse der Milzproben in meiner Arbeit kann geschlossen werden, dass sich bei den chronischen ITP-Patienten auf Ebene der späten Phase der B-Zell-Differenzierung, nämlich bei der Aktivierung der B-Zelle und Differenzierung zu Plasmablasten, die meisten Auffälligkeiten zeigen. Deshalb stellt möglicherweise dies den zentralen Punkt der B-Zell-Pathogenese bei der chronischen ITP dar. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von naiven B-Zellen und

den Subpopulationen der verschiedenen Gedächtnis-B-Zellen zwischen der ITP-Gruppe und den Gesunden in meiner Arbeit sowie in der Literatur feststellbar. Dagegen zeigte sich bei den ITP-Patienten eine signifikante Erhöhung des Anteils von Plasmablasten, welche sich in der frühen Phase der B-Zell-Differenzierung unmittelbar nach antigen-abhängiger Aktivierung befinden. Diese stellen somit möglicherweise auch das zelluläre Korrelat der humoralen Immunantwort gegenüber thrombozytärer Antigene bei der ITP dar. Die vermehrte Aktivierung von B-Zellen und Differenzierung zu Plasmablasten könnten somit für einen Teil der fehlgeleiteten Antikörperproduktion bei der ITP verantwortlich sein. Bei einer weiteren Population innerhalb der antikörperproduzierenden Zellen, den Plasmazellen, zeigten sich in meiner Arbeit, wie auch in der Literatur keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise konnte in meiner Arbeit, in Übereinstimmung mit der Literatur, jedoch ein signifikant erhöhtes Auftreten von Plasmazellen mit IgG im Vergleich zu Plasmablasten bei den ITP-Patienten beobachtet werden. Die Vermehrung dieser IgG+ Plasmazellen ist laut Mahevas et al. [113] hauptsächlich nach erfolgter Rituximab-Therapie nachweisbar und mitverantwortlich für deren Misserfolg. Dieser mögliche Zusammenhang, auch hinsichtlich des Einflusses weiterer medikamentöser Therapien, auf die Ergebnisse lässt sich hier nicht abschließend klären und bedarf weitergehender Untersuchungen. Die Ergebnisse meiner Arbeit deuten auf eine fehlerhafte periphere Toleranz in der Milz als Pathomechanismus der ITP hin.

#### **4.4 Vergleich der B-Zell-Verteilung der primären ITP mit ausgewählten Beispielen der sekundären ITP**

Die genaue Entstehung und Ursachen der primären ITP sind nicht vollständig geklärt und Gegenstand dieser Arbeit sowie weiterer Forschung. Es leiden ca. 80 % aller ITP Patienten an der primären Form, aus, wohingegen ca. 20 % der sekundären Form angehören. Eine immunologisch vermittelte Thrombozytopenie kann als sekundäre ITP bei unterschiedlichen Krankheiten auftreten. Hierzu gehören unter anderem Autoimmunkrankheiten wie z. B. der Systemische Lupus Erythematoses (SLE), primäre Immundefekte wie z. B. das variable

Immundefektsyndrom (CVID), Lymphozytenproliferative Erkrankungen wie die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), Infektionskrankheiten durch z. B. *Helicobacter pylori* oder Hepatitis-C-Virus (HCV) aber auch Impfungen wie die Masern-Mumps-Röteln (MMR)-Impfung [10, 114-116]. Die Ergebnisse meiner Arbeit über die B-Zell-Verteilung der primären ITP möchte ich kurz mit zwei exemplarisch angeführten Krankheitsbildern, die häufig bei einer sekundären ITP vorliegen, vergleichen. Hierbei handelt es sich um den SLE und das CVID-Syndrom.

Das CVID-Syndrom stellt eine heterogene Gruppe von Immundefekten mit einer eingeschränkten Antikörperproduktion und daraus wiederkehrenden bakteriellen Infektionen dar [117]. Es ist häufig mit weiteren hämatologischen Autoimmunerkrankungen, vor allem der ITP, assoziiert [118]. Einige Veränderungen in der B-Zell-Reihe im Vergleich zu Gesunden sind bei der CVID bereits bekannt. Dazu gehört eine signifikante Verringerung der Plasmazellen im Knochenmark. Diese korreliert mit den niedrigen IgG-Blutspiegeln [119]. In meiner Arbeit habe ich die Plasmazellen und Plasmablasten als antikörperproduzierende Zellen im Blut untersucht und konnte nur bei den jugendlichen ITP-Patienten eine signifikante Verringerung der antikörperproduzierenden Zellen feststellen.

Bei der Untersuchung der CD21<sup>low</sup> bzw. anergen B-Zell-Subpopulation zeigte sich in einer Studie eine Erhöhung im Blut von CVID-Patienten im Vergleich zu Gesunden [120]. Eine andere Studie untersuchte diesen Sachverhalt genauer, indem sie eine zusätzliche Kohorte aus CVID-Patienten mit ITP hinzunahm. Dabei konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der anergen B-Zellen in der Kohorte der CVID positiven ITP-Patienten im Vergleich zu CVID-Patienten oder Gesunden gefunden werden [121]. Interessanterweise konnte in meiner Arbeit eine signifikante Erhöhung der anergen B-Zellen bei der Kohorte der Kinder und Jugendlichen beobachtet werden, obwohl bei diesen Patienten eine primäre ITP ohne CVID vorlag. Die Erwachsenen zeigten die gleiche Tendenz. Folglich stimmen die Ergebnisse der Literatur über das CVID und meiner Arbeit über die primäre ITP in diesem Punkt überein.

Des Weiteren zeigten sich die Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel (CD27+IgM-IgD-) im Blut der CVID-Patienten im Vergleich zu Gesunden in mehreren Studien vermindert [122, 123]. Dieses Ergebnis der Literatursuche zeigt sich gegenteilig zu meiner Arbeit, da hier zumindest bei den Kindern mit ITP eine statistisch signifikante Erhöhung der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel erkennbar war.

Eine weitere häufig mit der ITP vorkommende Erkrankung ist der SLE. Bei dem SLE tritt eine sekundäre ITP in ca. 7-30 % der Fälle auf [124, 125]. Umgekehrt entwickeln ca. 2-5 % der ITP-Patienten im Verlauf einen SLE [126]. Beim Vergleich der B-Zell-Subpopulationen des Blutes von SLE-Patienten und Gesundkontrollen konnten Arce et al. statistisch signifikante Verringerungen der naiven B-Zellen und der Gedächtnis-B-Zellen aufzeigen. In dieser Arbeit wurden allerdings nur Kinder untersucht [127]. Im Vergleich dazu waren in meiner Arbeit an der primären ITP signifikante Erhöhungen der Gedächtnis-B-Zellen, aber nur derer mit Ig-Klassenwechsel bei der Kinderkohorte festzustellen. Bei den naiven B-Zellen lagen dagegen keine signifikanten Unterschiede bei den Kindern vor. Allerdings sollte angemerkt werden, dass in mehreren Studien eine Korrelation der Gedächtnis-B-Zellen mit der Krankheitsaktivität des SLE beschrieben wurde [128, 129].

Des Weiteren wurden in der Studie von Arce et al. signifikante Erhöhungen der Plasmazell-Vorläuferzellen im Blut festgestellt [127]. Gestützt wird dieses Ergebnis durch eine signifikante Erhöhung der antikörperproduzierenden Zellen bei den SLE-Patienten im Vergleich zu den Gesunden [130]. Bei den in meiner Arbeit untersuchten antikörperproduzierenden Zellen ist dagegen keine Erhöhung bei den ITP-Patienten festzustellen. Meine Ergebnisse zur primären ITP unterscheiden sich somit sehr von den Ergebnissen zum SLE aus der Literatur.

Aus dem hier gezogenen Vergleich meiner Ergebnisse zur primären ITP mit CVID bzw. SLE als Beispiele der sekundären ITP könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bei der sekundären ITP zum einen Veränderungen in der Zelldifferenzierung vorhanden sind und zum anderen andere Mechanismen ursächlich sein könnten, die zur Entstehung von Autoantikörpern gegen Thrombozyten führen.

### 4.5 Zukünftige Therapieansätze bei chronischer ITP

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, gibt es verschiedene Therapieoptionen zur Behandlung der ITP, angefangen von Glucocorticoiden und der hochdosierten, polyvalenten Immunglobulingabe, über B-Zell-Depletion mittels Rituximab bis hin zur Splenektomie. Dabei möchte ich basierend auf meinen Ergebnissen aus der Analyse der Verteilung von B-Zell-Subpopulationen und der daraus resultierenden Charakterisierung der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung kurz den Therapieansatz der medikamentösen B-Zell-Depletion näher betrachten.

Als Therapieoption hat sich bei der ITP der monoklonale Antikörper Rituximab etabliert, der sich gegen den Oberflächenmarker CD20 von B-Zellen richtet. Dabei wird unter Rituximab-Therapie eine B-Zell-Depletion, die häufig 6-12 Monate andauert, beobachtet. Die Ansprechrate geht nach 5 Jahren Therapie allerdings um ca. 20-30 % zurück [131, 132]. In einer multizentrischen, randomisierten, doppelverblindeten und Placebo-kontrollierten-Studie von Ghanima et al. an 112 Patienten konnte nur eine geringfügig höhere Ansprechrate und -zeit für die Rituximab-Therapie im Vergleich zur Placebogabe beobachtet werden. Langfristig konnte kein positiver Einfluss von Rituximab im Vergleich zu der Gabe von Placebo festgestellt werden [133].

Die CD20 Oberflächenmarker adressierende Therapie richtet sich vor allem gegen unreife B-Zellen, naive B-Zellen, Transitional-B-Zellen sowie Gedächtnis-B-Zellen, nicht aber gegen Plasmablasten oder Plasmazellen, die per se kein CD20 exprimieren. In meiner Arbeit sind die naiven B-Zellen aber nicht signifikant verändert im Vergleich zu den Gesunden. Bei den Transitional-B-Zellen sind ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen erkennbar. Zieht man das Ergebnis der Gedächtnis-B-Zellen mit und ohne Ig-Klassenwechsel in Betracht, stellt man keine klare Tendenz einer Abweichung der ITP-Gruppe zu den Gesunden fest. Die im Knochenmark befindlichen unreifen B-Zellen zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Hingegen sind in meiner Arbeit die Plasmablasten in der Milz bei den ITP-Patienten signifikant erhöht. Bei den Plasmazellen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse

könnten eine Erklärung sein warum eine Therapie mit Rituximab langfristig einer Placebogabe nicht überlegen ist.

Ein für zukünftige Therapien interessantes Ergebnis wurde in einer Studie von Mahevas et al. beschrieben. In dieser Studie wurde ein erhöhter Anteil von antikörperproduzierenden, langlebigen Plasmazellen in der Milz von ITP-Patienten nach einer Therapie mit Rituximab, im Vergleich zu unbehandelten ITP-Patienten und Gesunden, festgestellt. Mahevas et al. sieht in dieser Therapie einer ungezielten B-Zell-Depletion mit Rituximab einen unterstützenden Faktor für die gezielte Selektion von langlebigen Plasmazellen [113]. Plasmazellen und Plasmablasten werden von Rituximab nicht erfasst, da sie CD20 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Als neuer Ansatzpunkt in der Plasmazell-Depletion könnte hier der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, der in der Therapie des multiplen Myeloms eingesetzt wird, eine Rolle spielen. Durch die Inhibition des Proteasoms fallen vermehrt Proteinabfallprodukte, z. B. in Plasmazellen an, die dann eine Stress induzierte Apoptose vollziehen. Bortezomib zeigte in mehreren Studien gute Ergebnisse mit einer Verringerung der Plasmazellzahl, z. B. bei Patienten mit SLE [134, 135]. Des Weiteren wurde in einer klinischen Einzelfallstudie von Beckman et al. ein erfolgreicher Therapieversuch mit Bortezomib bei einer nach Splenektomie und Rituximab therapierefraktären Patientin beschrieben [136]. Wie die hohen Refraktärraten bei der allgemeinen B-Zell-Depletion mittels Rituximab und die neuesten Ergebnisse der Literatur, sowie meiner Arbeit zeigen, könnte eine gezielte Fokussierung auf die kurzlebigen Plasmablasten und langlebigen Plasmazellen als neues Therapieziel entscheidende Fortschritte in der Therapie der chronischen ITP bringen.

### 5 Zusammenfassung

Die Immunthrombozytopenie ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, bei der sich Autoantikörper gegen Thrombozyten bilden. Dadurch werden diese, unter anderem in der Milz, vermehrt abgebaut und es treten Blutungskomplikationen auf. Der fehlgeleiteten Immunabwehr wird versucht mit medikamentösen Therapien wie z. B. mit Glucocorticoiden und Rituximab bis hin zur Splenektomie entgegenzuwirken.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich durchflusszytometrisch die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit chronischer, primärer ITP und Gesunden hinsichtlich einer möglichen Störung in der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung. Dabei wurden 7 Knochenmark-, 28 Blut- und 12 Milzproben von ITP-Patienten sowie 5 Knochenmark- und 10 Milzproben von Gesunden aufbereitet. Anschließend wurden die B-Zell-Subpopulationen mittels immunphänotypischer Marker gefärbt um die Proben danach durchflusszytometrisch zu vermessen und zu charakterisieren. Zusätzlich erfolgte der Vergleich zu laboreigenen, bereits etablierten Referenzwerten von 220 Blutproben von Gesunden.

Bei den Knochenmarkproben konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Vorläufer-B-Zellen zwischen den ITP-Patienten und den Gesunden beobachtet werden, d. h. die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark erscheint bei der ITP auf zellulärer Ebene nicht beeinträchtigt. Die Analyse der Blutproben zeigte, dass auch keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von naiven B-Zellen zwischen den ITP-Patienten und den Gesunden vorzufinden sind. Dies bekräftigt, dass bei der ITP auf zellulärer Ebene keine Abweichungen in der frühen pre-immunen B-Zell-Entwicklung vorzuliegen scheinen und eine intakte B-Zell-Reifung bis hin zur naiven B-Zelle stattfindet. Es zeigte sich jedoch bei den ITP-Patienten ein erhöhter Anteil an anergen B-Zellen und atypischen Gedächtnis-B-Zellen, von denen allgemein angenommen wird, dass sie aus einer chronischen bzw. dysregulierten antigen-abhängigen B-Zell-Aktivierung entstammen. Aus der Untersuchung der Milzproben zeigte sich zudem, dass bei den ITP-Patienten der Anteil der antikörperproduzierenden Plasmablasten im Vergleich zu den

## Zusammenfassung

---

Gesunden erhöht ist. Folglich lassen sich bei der ITP auf zellulärer Ebene vor allem Abweichungen in der späten Phase der B-Zell-Differenzierung nachweisen. Es kann somit angenommen werden, dass Störungen der B-Zell-Entwicklung, wie sie auf zellulärer Ebene bei verschiedenen mit sekundärer ITP einhergehenden Erkrankungen (systemischer Lupus erythematoses, variables Immundefektsyndrom) beschrieben wurden, bei der primären ITP nicht für die Produktion von antithrombozytären Antikörpern notwendig sind. Eine weitere detaillierte Aufarbeitung, auf welcher Ebene der B-Zell-Differenzierung der Toleranzverlust gegenüber thrombozytären Antigenen auftritt, ist entscheidend für die zukünftige Entwicklung spezifischer, zellgerichteter Therapien.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] N. Cooper, J. Bussel, The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura, *British journal of haematology* 133(4) (2006) 364-74.
- [2] H. Schulze, G. Gaedicke, Immune thrombocytopenia in children and adults: what's the same, what's different?, *Haematologica* 96(12) (2011) 1739-41.
- [3] C. Neunert, N. Noroozi, G. Norman, G.R. Buchanan, J. Goy, I. Nazi, J.G. Kelton, D.M. Arnold, Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 13(3) (2015) 457-64.
- [4] F. Rodeghiero, M. Ruggeri, Is splenectomy still the gold standard for the treatment of chronic ITP?, *American journal of hematology* 83(2) (2008) 91.
- [5] A. Zufferey, R. Kapur, J.W. Semple, Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP), *Journal of clinical medicine* 6(2) (2017).
- [6] F. Rodeghiero, R. Stasi, T. Gernsheimer, M. Michel, D. Provan, D.M. Arnold, J.B. Bussel, D.B. Cines, B.H. Chong, N. Cooper, B. Godeau, K. Lechner, M.G. Mazzucconi, R. McMillan, M.A. Sanz, P. Imbach, V. Blanchette, T. Kuhne, M. Ruggeri, J.N. George, Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group, *Blood* 113(11) (2009) 2386-93.
- [7] N.R. Shulman, V.J. Marder, R.S. Weinrach, Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies, *Annals of the New York Academy of Sciences* 124(2) (1965) 499-542.
- [8] T. Takahashi, T. Yujiri, K. Shinohara, Y. Inoue, Y. Sato, Y. Fujii, M. Okubo, Y. Zaitzu, K. Ariyoshi, Y. Nakamura, R. Nawata, Y. Oka, M. Shirai, Y. Tanizawa, Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, *British journal of haematology* 124(1) (2004) 91-6.
- [9] Z. Li, M.A. Nardi, S. Karpatkin, Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia, *Blood* 106(2) (2005) 572-6.
- [10] D.B. Cines, J.B. Bussel, H.A. Liebman, E.T. Luning Prak, The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity, *Blood* 113(26) (2009) 6511-21.
- [11] Y. Okubo, A. Handa, Nationwide Trend Analysis of Pediatric Inpatients With Immune Thrombocytopenia in the United States, *Journal of pediatric hematology/oncology* 40(3) (2018) e140-e144.
- [12] H. Frederiksen, K. Schmidt, The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age, *Blood* 94(3) (1999) 909-13.
- [13] D.R. Terrell, L.A. Beebe, S.K. Vesely, B.R. Neas, J.B. Segal, J.N. George, The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports, *American journal of hematology* 85(3) (2010) 174-80.

- [14] P.F. Fogarty, Chronic immune thrombocytopenia in adults: epidemiology and clinical presentation, *Hematology/oncology clinics of North America* 23(6) (2009) 1213-21.
- [15] A.L. Lightsey, Jr., R. McMillan, H.M. Koenig, J.E. Schanberger, J.E. Lang, In vitro production of platelet-binding IgG in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura, *The Journal of pediatrics* 88(3) (1976) 415-8.
- [16] J.W. Semple, Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura, *Blood reviews* 16(1) (2002) 9-12.
- [17] R. He, D.M. Reid, C.E. Jones, N.R. Shulman, Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, *Blood* 83(4) (1994) 1024-32.
- [18] M.N. Saleh, D.L. Moore, J.Y. Lee, A.F. LoBuglio, Monocyte-platelet interaction in immune and nonimmune thrombocytopenia, *Blood* 74(4) (1989) 1328-31.
- [19] S. Audia, K. Santegoets, A.G. Laarhoven, G. Vidarsson, O. Facy, P. Ortega-Deballon, M. Samson, N. Janikashvili, P. Saas, B. Bonnotte, T.R. Radstake, Fcγ receptor expression on splenic macrophages in adult immune thrombocytopenia, *Clinical and experimental immunology* (2017).
- [20] B. Nieswandt, W. Bergmeier, K. Rackebrandt, J.E. Gessner, H. Zirngibl, Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice, *Blood* 96(7) (2000) 2520-7.
- [21] K. Fujisawa, T.E. O'Toole, P. Tani, J.C. Loftus, E.F. Plow, M.H. Ginsberg, R. McMillan, Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura, *Blood* 77(10) (1991) 2207-13.
- [22] M. Chang, P.A. Nakagawa, S.A. Williams, M.R. Schwartz, K.L. Imfeld, J.S. Buzby, D.J. Nugent, Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro, *Blood* 102(3) (2003) 887-95.
- [23] R. McMillan, L. Wang, A. Tomer, J. Nichol, J. Pistillo, Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP, *Blood* 103(4) (2004) 1364-9.
- [24] E.J. Houwerzijl, N.R. Blom, J.J. van der Want, E. Vellenga, J.T. de Wolf, Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndromes and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death, *Leukemia* 20(11) (2006) 1937-42.
- [25] J.W. Semple, J. Freedman, Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia, *Blood* 78(10) (1991) 2619-25.
- [26] B. Olsson, P.O. Andersson, M. Jernas, S. Jacobsson, B. Carlsson, L.M. Carlsson, H. Wadenvik, T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, *Nature medicine* 9(9) (2003) 1123-4.

- [27] C. Zhao, X. Li, F. Zhang, L. Wang, J. Peng, M. Hou, Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies, *Haematologica* 93(9) (2008) 1428-30.
- [28] D.B. Cines, A. Cuker, J.W. Semple, Pathogenesis of immune thrombocytopenia, *Presse medicale* (Paris, France : 1983) 43(4 Pt 2) (2014) e49-59.
- [29] D. Provan, R. Stasi, A.C. Newland, V.S. Blanchette, P. Bolton-Maggs, J.B. Bussel, B.H. Chong, D.B. Cines, T.B. Gernsheimer, B. Godeau, J. Grainger, I. Greer, B.J. Hunt, P.A. Imbach, G. Lyons, R. McMillan, F. Rodeghiero, M.A. Sanz, M. Tarantino, S. Watson, J. Young, D.J. Kuter, International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia, *Blood* 115(2) (2010) 168-86.
- [30] J.W. Semple, J.E. Italiano, Jr., J. Freedman, Platelets and the immune continuum, *Nature reviews. Immunology* 11(4) (2011) 264-74.
- [31] C. Neunert, W. Lim, M. Crowther, A. Cohen, L. Solberg, Jr., M.A. Crowther, The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia, *Blood* 117(16) (2011) 4190-207.
- [32] A. Cuker, E.T. Prak, D.B. Cines, Can immune thrombocytopenia be cured with medical therapy?, *Seminars in thrombosis and hemostasis* 41(4) (2015) 395-404.
- [33] A.H. Lazarus, Monoclonal versus polyclonal anti-D in the treatment of ITP, *Expert opinion on biological therapy* 13(10) (2013) 1353-6.
- [34] A.R. Crow, A.H. Lazarus, Mechanistic properties of intravenous immunoglobulin in murine immune thrombocytopenia: support for FcγRIIB falls by the wayside, *Seminars in hematology* 53 Suppl 1 (2016) S20-2.
- [35] J. Li, Z. Wang, S. Hu, X. Zhao, L. Cao, Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, *Immunology letters* 154(1-2) (2013) 42-8.
- [36] X.H. Guo, F. Zhao, W. Shi, X.M. Ma, Q. Xu, A.B. Patiguli, Y.S. Halida, [Detection and clinical significance of Th1/Th2 cytokines in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura], *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 28(11) (2012) 1185-7.
- [37] Y. Guan, S. Wang, F. Xue, X. Liu, L. Zhang, H. Li, R. Yang, Long-term results of splenectomy in adult chronic immune thrombocytopenia, *European journal of haematology* 98(3) (2017) 235-241.
- [38] M. Kuwana, Y. Okazaki, J. Kaburaki, Y. Kawakami, Y. Ikeda, Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 168(7) (2002) 3675-82.
- [39] L.H. Thai, M. Mahevas, F. Roudot-Thoraval, N. Limal, L. Languille, G. Dumas, M. Khellaf, P. Bierling, M. Michel, B. Godeau, Long-term complications of splenectomy in adult immune thrombocytopenia, *Medicine* 95(48) (2016) e5098.

- [40] P. Mazza, C. Minoia, A. Melpignano, G. Polimeno, N. Cascavilla, N. Di Renzo, G. Specchia, The use of thrombopoietin-receptor agonists (TPO-RAs) in immune thrombocytopenia (ITP): a "real life" retrospective multicenter experience of the Rete Ematologica Pugliese (REP), *Annals of hematology* 95(2) (2016) 239-44.
- [41] F. Zaja, M. Bacarani, P. Mazza, M. Bocchia, L. Gugliotta, A. Zaccaria, N. Vianelli, M. Defina, A. Tieghi, S. Amadori, S. Campagna, F. Ferrara, E. Angelucci, E. Usala, S. Cantoni, G. Visani, A. Fornaro, R. Rizzi, V. De Stefano, F. Casulli, M.L. Battista, M. Isola, F. Soldano, E. Gamba, R. Fanin, Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia, *Blood* 115(14) (2010) 2755-62.
- [42] D. Grimaldi, F. Canoui-Poitrine, L. Croisille, K. Lee, F. Roudot-Thoraval, L. Languille, M. Khellaf, M. Michel, B. Godeau, P. Bierling, Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding, *Annals of hematology* 93(2) (2014) 309-15.
- [43] M.D. Cooper, M.N. Alder, The evolution of adaptive immune systems, *Cell* 124(4) (2006) 815-22.
- [44] A.M. Muller, A. Medvinsky, J. Strouboulis, F. Grosveld, E. Dzierzak, Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo, *Immunity* 1(4) (1994) 291-301.
- [45] A.H.L. Abul K. Abbas, Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology* 6, Saunders Elsevier (2010) S.236.
- [46] S. Tonegawa, [Molecular biology of immunologic recognition], Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme 32(3) (1987) 239-50.
- [47] P.G. Chu, D.A. Arber, CD79: a review, *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 9(2) (2001) 97-106.
- [48] E. ten Boekel, F. Melchers, A.G. Rolink, Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression, *Immunity* 8(2) (1998) 199-207.
- [49] K. Pieper, B. Grimbacher, H. Eibel, B-cell biology and development, *The Journal of allergy and clinical immunology* 131(4) (2013) 959-71.
- [50] M.C. van Zelm, T. Szczepanski, M. van der Burg, J.J. van Dongen, Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion, *The Journal of experimental medicine* 204(3) (2007) 645-55.
- [51] F. Melchers, The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire, *Nature reviews. Immunology* 5(7) (2005) 578-84.
- [52] T. Tsubata, B-cell tolerance and autoimmunity, *F1000Research* 6 (2017) 391.
- [53] D. Melamed, D. Nemazee, Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(17) (1997) 9267-72.

- [54] R. Pelanda, S. Schwers, E. Sonoda, R.M. Torres, D. Nemazee, K. Rajewsky, Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification, *Immunity* 7(6) (1997) 765-75.
- [55] E. Meffre, H. Wardemann, B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity, *Current opinion in immunology* 20(6) (2008) 632-8.
- [56] J.M. Jones, M. Gellert, The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system, *Immunological reviews* 200 (2004) 233-48.
- [57] H. Eibel, H. Kraus, H. Sic, A.K. Kienzler, M. Rizzi, B cell biology: an overview, *Current allergy and asthma reports* 14(5) (2014) 434.
- [58] C.C. Goodnow, J. Crosbie, S. Adelstein, T.B. Lavoie, S.J. Smith-Gill, R.A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J.S. Wotherspoon, R.H. Loblay, K. Raphael, R.J. Trent, A. Basten, Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(9) (2009) 5442-8.
- [59] C.C. Goodnow, J. Crosbie, S. Adelstein, T.B. Lavoie, S.J. Smith-Gill, D.Y. Mason, H. Jorgensen, R.A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, M. Loughnan, et al., Clonal silencing of self-reactive B lymphocytes in a transgenic mouse model, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 2 (1989) 907-20.
- [60] D.A. Nemazee, K. Burki, Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes, *Nature* 337(6207) (1989) 562-6.
- [61] T.D. Quach, T.J. Hopkins, N.E. Holodick, R. Vuyyuru, T. Manser, R.L. Bayer, T.L. Rothstein, Human B-1 and B-2 B Cells Develop from Lin-CD34+CD38lo Stem Cells, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197(10) (2016) 3950-3958.
- [62] K.L. Calame, Plasma cells: finding new light at the end of B cell development, *Nature immunology* 2(12) (2001) 1103-8.
- [63] G. Cinamon, M. Matloubian, M.J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R.L. Proia, J.G. Cyster, Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone, *Nature immunology* 5(7) (2004) 713-20.
- [64] J.P. Pereira, J. An, Y. Xu, Y. Huang, J.G. Cyster, Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids, *Nature immunology* 10(4) (2009) 403-11.
- [65] F. Martin, A.M. Oliver, J.F. Kearney, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens, *Immunity* 14(5) (2001) 617-29.
- [66] S. Buffa, M. Pellicano, M. Bulati, A. Martorana, D. Goldeck, C. Caruso, G. Pawelec, G. Colonna-Romano, A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38(-)CD24 (-) B cells in centenarian offspring and elderly people, *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35(5) (2013) 2009-24.
- [67] F. Hiepe, T. Alexander, R.E. Voll, [Plasma cells], *Zeitschrift fur Rheumatologie* 74(1) (2015) 20-5.
- [68] R.A. Manz, A.E. Hauser, F. Hiepe, A. Radbruch, Maintenance of serum antibody levels, *Annual review of immunology* 23 (2005) 367-86.

- [69] T. Yoshida, H. Mei, T. Dorner, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Fillatreau, B.F. Hoyer, Memory B and memory plasma cells, *Immunological reviews* 237(1) (2010) 117-39.
- [70] N. Warde, Rituximab targets short-lived autoreactive plasmablasts, *Nature reviews. Rheumatology* 6(5) (2010) 246.
- [71] M. Rizzi, R. Knoth, C.S. Hampe, P. Lorenz, M.L. Gougeon, B. Lemercier, N. Venhoff, F. Ferrera, U. Salzer, H.J. Thiesen, H.H. Peter, U.A. Walker, H. Eibel, Long-lived plasma cells and memory B cells produce pathogenic anti-GAD65 autoantibodies in Stiff Person Syndrome, *PloS one* 5(5) (2010) e10838.
- [72] R.A. Manz, M. Lohning, G. Cassese, A. Thiel, A. Radbruch, Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen, *International immunology* 10(11) (1998) 1703-11.
- [73] R.M. Zinkernagel, M.F. Bachmann, T.M. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet, H. Hengartner, On immunological memory, *Annual review of immunology* 14 (1996) 333-67.
- [74] A. Bortnick, I. Chernova, W.J. Quinn, 3rd, M. Mugnier, M.P. Cancro, D. Allman, Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(11) (2012) 5389-96.
- [75] R.A. Manz, A. Thiel, A. Radbruch, Lifetime of plasma cells in the bone marrow, *Nature* 388(6638) (1997) 133-4.
- [76] M.K. Slifka, R. Antia, J.K. Whitmire, R. Ahmed, Humoral immunity due to long-lived plasma cells, *Immunity* 8(3) (1998) 363-72.
- [77] C. Starke, S. Frey, U. Wellmann, V. Urbonaviciute, M. Herrmann, K. Amann, G. Schett, T. Winkler, R.E. Voll, High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice, *European journal of immunology* 41(7) (2011) 2107-12.
- [78] B.F. Hoyer, I.M. Mumtaz, K. Loddenkemper, A. Bruns, C. Sengler, K.G. Hermann, S. Maza, R. Keitzer, G.R. Burmester, F. Buttgereit, A. Radbruch, F. Hiepe, Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab, *Annals of the rheumatic diseases* 71(1) (2012) 75-9.
- [79] A.M. Jacobi, H. Mei, B.F. Hoyer, I.M. Mumtaz, K. Thiele, A. Radbruch, G.R. Burmester, F. Hiepe, T. Dorner, HLA-DR<sup>high</sup>/CD27<sup>high</sup> plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus, *Annals of the rheumatic diseases* 69(1) (2010) 305-8.
- [80] K.G. Smith, A. Light, G.J. Nossal, D.M. Tarlinton, The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response, *The EMBO journal* 16(11) (1997) 2996-3006.
- [81] Y.J. Liu, C. Arpin, Germinal center development, *Immunological reviews* 156 (1997) 111-26.

- [82] I.C. MacLennan, Germinal centers, *Annual review of immunology* 12 (1994) 117-39.
- [83] J.J. Taylor, K.A. Pape, M.K. Jenkins, A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response, *The Journal of experimental medicine* 209(3) (2012) 597-606.
- [84] M.A. Berkowska, G.J. Driessen, V. Bikos, C. Grosserichter-Wagener, K. Stamatopoulos, A. Cerutti, B. He, K. Biermann, J.F. Lange, M. van der Burg, J.J. van Dongen, M.C. van Zelm, Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways, *Blood* 118(8) (2011) 2150-8.
- [85] X. Yu, T. Tsibane, P.A. McGraw, F.S. House, C.J. Keefer, M.D. Hicar, T.M. Tumpey, C. Pappas, L.A. Perrone, O. Martinez, J. Stevens, I.A. Wilson, P.V. Aguilar, E.L. Altschuler, C.F. Basler, J.E. Crowe, Jr., Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors, *Nature* 455(7212) (2008) 532-6.
- [86] S. Crotty, P. Felgner, H. Davies, J. Glidewell, L. Villarreal, R. Ahmed, Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171(10) (2003) 4969-73.
- [87] A.F. Ochsenbein, D.D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(24) (2000) 13263-8.
- [88] R.G. Caldwell, J.B. Wilson, S.J. Anderson, R. Longnecker, Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals, *Immunity* 9(3) (1998) 405-11.
- [89] E. Kilger, A. Kieser, M. Baumann, W. Hammerschmidt, Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor, *The EMBO journal* 17(6) (1998) 1700-9.
- [90] O. Gires, U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, W. Hammerschmidt, Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule, *The EMBO journal* 16(20) (1997) 6131-40.
- [91] M. Mamani-Matsuda, A. Cosma, S. Weller, A. Faili, C. Staib, L. Garcon, O. Hermine, O. Beyne-Rauzy, C. Fieschi, J.O. Pers, N. Arakelyan, B. Varet, A. Sauvanet, A. Berger, F. Paye, J.M. Andrieu, M. Michel, B. Godeau, P. Buffet, C.A. Reynaud, J.C. Weill, The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells, *Blood* 111(9) (2008) 4653-9.
- [92] M.E. Hystad, J.H. Myklebust, T.H. Bo, E.A. Sivertsen, E. Rian, L. Forfang, E. Munthe, A. Rosenwald, M. Chiorazzi, I. Jonassen, L.M. Staudt, E.B. Smeland, Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179(6) (2007) 3662-71.
- [93] K. Agematsu, H. Nagumo, F.C. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, S. Ito, K. Sugita, T. Mori, T. Kobata, C. Morimoto, A. Komiyama, B cell subpopulations

separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production, *European journal of immunology* 27(8) (1997) 2073-9.

[94] T. Rasmussen, M. Lodahl, S. Hancke, H.E. Johnsen, In multiple myeloma clonotypic CD38- /CD19+ / CD27+ memory B cells recirculate through bone marrow, peripheral blood and lymph nodes, *Leukemia & lymphoma* 45(7) (2004) 1413-7.

[95] U. Klein, K. Rajewsky, R. Kuppers, Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells, *The Journal of experimental medicine* 188(9) (1998) 1679-89.

[96] U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans, *Blood* 89(4) (1997) 1288-98.

[97] S.A. Oracki, J.A. Walker, M.L. Hibbs, L.M. Corcoran, D.M. Tarlinton, Plasma cell development and survival, *Immunological reviews* 237(1) (2010) 140-59.

[98] J.F. Chen, L.H. Yang, L.X. Chang, J.J. Feng, J.Q. Liu, The clinical significance of circulating B cells secreting anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody and platelet glycoprotein IIb/IIIa in patients with primary immune thrombocytopenia, *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 17(5) (2012) 283-90.

[99] B. Olsson, B. Ridell, M. Jernas, H. Wadenvik, Increased number of B-cells in the red pulp of the spleen in ITP, *Annals of hematology* 91(2) (2012) 271-7.

[100] C. Daridon, C. Loddenkemper, S. Spieckermann, A.A. Kuhl, A. Salama, G.R. Burmester, P.E. Lipsky, T. Dorner, Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia, *Blood* 120(25) (2012) 5021-31.

[101] H. Morbach, E.M. Eichhorn, J.G. Liese, H.J. Girschick, Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood, *Clinical and experimental immunology* 162(2) (2010) 271-9.

[102] R.M. Talaat, A.M. Elmaghraby, S.S. Barakat, M. El-Shahat, Alterations in immune cell subsets and their cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), *Clinical and experimental immunology* 176(2) (2014) 291-300.

[103] J.F. Chen, L.H. Yang, C.X. Dong, J.J. Feng, X.E. Liu, Y.J. Lu, L.X. Chang, J.Q. Liu, [Significance of detection of anti-GPIIb/IIIa antibody secreting B cells and platelet-specific antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura], *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 31(9) (2010) 603-6.

[104] M. Lyu, Y. Hao, Y. Li, C. Lyu, W. Liu, H. Li, F. Xue, X. Liu, R. Yang, Upregulation of CD72 expression on CD19(+) CD27(+) memory B cells by CD40L in primary immune thrombocytopenia, *British journal of haematology* 178(2) (2017) 308-318.

[105] S.M. Flint, A. Gibson, G. Lucas, R. Nandigam, L. Taylor, D. Provan, A.C. Newland, C.O. Savage, R.B. Henderson, A distinct plasmablast and naive B-cell

phenotype in primary immune thrombocytopenia, *Haematologica* 101(6) (2016) 698-706.

[106] X. Li, H. Zhong, W. Bao, N. Boulad, J. Evangelista, M.A. Haider, J. Bussel, K. Yazdanbakhsh, Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia, *Blood* 120(16) (2012) 3318-25.

[107] L. Martinez-Gamboa, H. Mei, C. Loddenkemper, B. Ballmer, A. Hansen, P.E. Lipsky, F. Emmerich, A. Radbruch, A. Salama, T. Dorner, Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura, *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 130(2) (2009) 199-212.

[108] S. Alavi, Z. Aryan, F. Ghazizadeh, N. Arabi, M. Nikougoftar, M. Ebadi, The Immunophenotype of Bone Marrow Lymphocytes in Children with Immune Thrombocytopenic Purpura, *Pediatric Hematology and Oncology* 31(6) (2014) 548-554.

[109] D.E. Guiziry, G.W. El, N. Farahat, H. Hassab, Phenotypic analysis of bone marrow lymphocytes from children with acute thrombocytopenic purpura, *The Egyptian journal of immunology* 12(1) (2005) 9-14.

[110] S.J. Jubelirer, R. Harpold, The Role of the Bone Marrow Examination in the Diagnosis of Immune Thrombocytopenic Purpura: Case Series and Literature Review, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 8(1) (2002) 73-76.

[111] M.V. K., R. Catherine, P. Snezana, S.M. Lisa, B. Jacqueline, L. Wendy, G.J. N., W. Grace, C.R. J., T.L. J., N. Ishac, K.J. G., A.D. M., A blinded study of bone marrow examinations in patients with primary immune thrombocytopenia, *European journal of haematology* 90(2) (2013) 121-126.

[112] R. Aslam, G.B. Segel, R. Burack, S.A. Spence, E.R. Speck, L. Guo, J.W. Semple, Splenic lymphocyte subtypes in immune thrombocytopenia: increased presence of a subtype of B-regulatory cells, *British journal of haematology* 173(1) (2016) 159-60.

[113] M. Mahevas, P. Patin, F. Huetz, M. Descatoire, N. Cagnard, C. Bole-Feysot, S. Le Gallou, M. Khellaf, O. Fain, D. Boutboul, L. Galicier, M. Ebbo, O. Lambotte, M. Hamidou, P. Bierling, B. Godeau, M. Michel, J.C. Weill, C.A. Reynaud, B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells, *The Journal of clinical investigation* 123(1) (2013) 432-42.

[114] M. Swinkels, M. Rijkers, J. Voorberg, G. Vidarsson, F.W.G. Leebeek, A.J.G. Jansen, Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia, *Frontiers in immunology* 9 (2018) 880.

[115] E.K. France, J. Glanz, S. Xu, S. Hambidge, K. Yamasaki, S.B. Black, M. Marcy, J.P. Mullooly, L.A. Jackson, J. Nordin, E.A. Belongia, K. Hohman, R.T. Chen, R. Davis, Risk of immune thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella immunization in children, *Pediatrics* 121(3) (2008) e687-92.

[116] P.J. Pockros, A. Duchini, R. McMillan, L.M. Nyberg, J. McHutchison, E. Viernes, Immune thrombocytopenic purpura in patients with chronic hepatitis C virus infection, *The American journal of gastroenterology* 97(8) (2002) 2040-5.

- [117] N. Taubenheim, M. von Hornung, A. Durandy, K. Warnatz, L. Corcoran, H.H. Peter, H. Eibel, Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 175(8) (2005) 5498-503.
- [118] J. Wang, C. Cunningham-Rundles, Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID), *Journal of autoimmunity* 25(1) (2005) 57-62.
- [119] M.L. Ochtrop, S. Goldacker, A.M. May, M. Rizzi, R. Draeger, D. Hauschke, C. Stehfest, K. Warnatz, H. Goebel, K. Technau-Ihling, M. Werner, U. Salzer, H. Eibel, M. Schlesier, H.H. Peter, T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency, *Blood* 118(2) (2011) 309-18.
- [120] M. Rakhmanov, B. Keller, S. Gutenberger, C. Foerster, M. Hoenig, G. Driessen, M. van der Burg, J.J. van Dongen, E. Wiech, M. Visentini, I. Quinti, A. Prasse, N. Voelxen, U. Salzer, S. Goldacker, P. Fisch, H. Eibel, K. Schwarz, H.H. Peter, K. Warnatz, Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32) (2009) 13451-6.
- [121] G. Patuzzo, A. Barbieri, E. Tinazzi, D. Veneri, G. Argentino, F. Moretta, A. Puccetti, C. Lunardi, Autoimmunity and infection in common variable immunodeficiency (CVID), *Autoimmunity reviews* 15(9) (2016) 877-82.
- [122] K. Warnatz, A. Denz, R. Drager, M. Braun, C. Groth, G. Wolff-Vorbeck, H. Eibel, M. Schlesier, H.H. Peter, Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease, *Blood* 99(5) (2002) 1544-51.
- [123] C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt, B. Ferry, T. Witte, E. Eren, M. Vlkova, M. Hernandez, D. Detkova, P.R. Bos, G. Poerksen, H. von Bernuth, U. Baumann, S. Goldacker, S. Gutenberger, M. Schlesier, F. Bergeron-van der Cruyssen, M. Le Garff, P. Debre, R. Jacobs, J. Jones, E. Bateman, J. Litzman, P.M. van Hagen, A. Plebani, R.E. Schmidt, V. Thon, I. Quinti, T. Espanol, A.D. Webster, H. Chapel, M. Vihinen, E. Oksenhendler, H.H. Peter, K. Warnatz, The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency, *Blood* 111(1) (2008) 77-85.
- [124] J.C. Nossent, A.J. Swaak, Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus, *The Quarterly journal of medicine* 80(291) (1991) 605-12.
- [125] Y. Liu, S. Chen, Y. Sun, Q. Lin, X. Liao, J. Zhang, J. Luo, H. Qian, L. Duan, G. Shi, Clinical characteristics of immune thrombocytopenia associated with autoimmune disease: a retrospective study, *Medicine* 95(50) (2016).
- [126] S. Panzer, E. Penner, W. Graninger, E. Schulz, J.S. Smolen, Antinuclear antibodies in patients with chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia followed 2-30 years, *American journal of hematology* 32(2) (1989) 100-3.
- [127] E. Arce, D.G. Jackson, M.A. Gill, L.B. Bennett, J. Banchereau, V. Pascual, Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in

the blood of children with systemic lupus erythematosus, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 167(4) (2001) 2361-9.

[128] A.M. Jacobi, K. Reiter, M. Mackay, C. Aranow, F. Hiepe, A. Radbruch, A. Hansen, G.R. Burmester, B. Diamond, P.E. Lipsky, T. Dorner, Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95, *Arthritis and rheumatism* 58(6) (2008) 1762-73.

[129] A.M. Jacobi, M. Odendahl, K. Reiter, A. Bruns, G.R. Burmester, A. Radbruch, G. Valet, P.E. Lipsky, T. Dorner, Correlation between circulating CD27<sup>high</sup> plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis and rheumatism* 48(5) (2003) 1332-42.

[130] C.M. Tipton, C.F. Fucile, J. Darce, A. Chida, T. Ichikawa, I. Gregoret, S. Schieferl, J. Hom, S. Jenks, R.J. Feldman, R. Mehr, C. Wei, F.E. Lee, W.C. Cheung, A.F. Rosenberg, I. Sanz, Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus, *Nature immunology* 16(7) (2015) 755-65.

[131] V.L. Patel, M. Mahevas, S.Y. Lee, R. Stasi, S. Cunningham-Rundles, B. Godeau, J. Kanter, E. Neufeld, T. Taube, U. Ramenghi, S. Shenoy, M.J. Ward, N. Mihatov, V.L. Patel, P. Bierling, M. Lesser, N. Cooper, J.B. Bussel, Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia, *Blood* 119(25) (2012) 5989-95.

[132] N. Cooper, R. Stasi, S. Cunningham-Rundles, M.A. Feuerstein, J.P. Leonard, S. Amadori, J.B. Bussel, The efficacy and safety of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura, *British journal of haematology* 125(2) (2004) 232-9.

[133] W. Ghanima, A. Khelif, A. Waage, M. Michel, G.E. Tjonnfjord, N.B. Romdhan, J. Kahrs, B. Darne, P.A. Holme, Rituximab as second-line treatment for adult immune thrombocytopenia (the RITP trial): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* (London, England) 385(9978) (2015) 1653-61.

[134] T. Alexander, Q. Cheng, J. Klotsche, L. Khodadadi, A. Waka, R. Biesen, B.F. Hoyer, G.R. Burmester, A. Radbruch, F. Hiepe, Proteasome inhibition with bortezomib induces a therapeutically relevant depletion of plasma cells in SLE but does not target their precursors, *European journal of immunology* (2018).

[135] T. Alexander, R. Sarfert, J. Klotsche, A.A. Kuhl, A. Rubbert-Roth, H.M. Lorenz, J. Rech, B.F. Hoyer, Q. Cheng, A. Waka, A. Taddeo, M. Wiesener, G. Schett, G.R. Burmester, A. Radbruch, F. Hiepe, R.E. Voll, The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and ameliorates clinical manifestations of refractory systemic lupus erythematosus, *Annals of the rheumatic diseases* 74(7) (2015) 1474-8.

[136] J.D. Beckman, M.A. Rollins-Raval, J.S. Raval, Y.A. Park, M. Mazepa, A. Ma, Bortezomib for Refractory Immune-Mediated Thrombocytopenia Purpura, *American journal of therapeutics* 25(2) (2018) e270-e272.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung .....	6
Abbildung 2: Trennung der mononukleären Zellen aus einer Blutprobe durch die Dichtegradientenzentrifugationsmethode. ....	22
Abbildung 3: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen im Blut.....	32
Abbildung 4: Relativer Anteil der B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	34
Abbildung 5: Relativer Anteil der Transitional-B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	35
Abbildung 6: Relativer Anteil der naiven B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	36
Abbildung 7: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	37
Abbildung 8: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit Ig-Klassenwechsel im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	38
Abbildung 9: Relativer Anteil der atypischen Gedächtnis-B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	39
Abbildung 10: Relativer Anteil der anergen B-Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	40
Abbildung 11: Relativer Anteil der antikörperproduzierenden Zellen im Blut in Abhängigkeit vom Alter.....	41
Abbildung 12: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.....	42
Abbildung 13: B-Zell-Subpopulationen im Knochenmark.....	44
Abbildung 14: Gatingstrategie für die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen in der Milz.....	46
Abbildung 15: Relativer Anteil der naiven B-Zellen in der Milz.....	47

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 16: Relativer Anteil der Keimzentrum-B-Zellen in der Milz.....	48
Abbildung 17: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel in der Milz.....	49
Abbildung 18: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Ig-Klassenwechsel in der Milz.....	50
Abbildung 19: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit IgG-Klassenwechsel in der Milz.....	51
Abbildung 20: Relativer Anteil der Gedächtnis-B-Zellen mit IgA-Klassenwechsel in der Milz.....	52
Abbildung 21: Relativer Anteil der atypischen B-Zellen in der Milz.....	53
Abbildung 22: Relativer Anteil der IgG+ atypischen B-Zellen in der Milz.....	54
Abbildung 23: Relativer Anteil der IgA+ atypischen B-Zellen in der Milz.....	55
Abbildung 24: Relativer Anteil der Plasmablasten in der Milz.....	56
Abbildung 25: Relativer Anteil der Plasmazellen in der Milz.....	57
Abbildung 26: Isotypenverteilung der Plasmablasten in der Milz.....	58
Abbildung 27: Isotypenverteilung der Plasmazellen in der Milz.....	59
Abbildung 28: Isotypenverteilung der exprimierten Immunglobuline bei Plasmablasten und Plasmazellen in der Milz.....	60
Abbildung 29: Expressionsstärke von CD86 bei Plasmablasten und Plasmazellen in der Milz.....	61

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Intrazelluläre- und Oberflächenmarker in der B-Zell-Entwicklung und - Differenzierung.....	15
Tabelle 2: Geräte. ....	17
Tabelle 3: Einwegmaterialien. ....	18
Tabelle 4: Labormaterialien. ....	18
Tabelle 5: Antikörper. ....	19
Tabelle 6: Chemikalien und Lösungen.....	19
Tabelle 7: Puffer und Arbeitslösungen.....	20
Tabelle 8: Software.....	20
Tabelle 9: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Blutproben. ....	25
Tabelle 10: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Knochenmarkproben. .....	25
Tabelle 11: Färbemischung für die Oberflächenfärbung von Milzproben. ....	26
Tabelle 12: Färbemischung für die intrazelluläre- und Oberflächenfärbung von Milzproben. ....	27
Tabelle 13: Klinische Daten der Patientenkohorte.....	29

## Abkürzungsverzeichnis

### 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
%	Prozent
®	registrierte Warenmarke
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
APC	Allophycocyanin
Aqua ad iniectabilia	Wasser für Injektionszwecke
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AZA	Azathioprin
BSA	bovines Serum Albumin
BZ	B-Zelle
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation, Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CSA	Ciclosporin A
CVID	common variable Immunodeficiency= Variables Immundefektsyndrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELT	Eltrombopag
et al.	et alii
FACS	fluorescence-activated cell sorting= Durchflusszytometrie
FBS	fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein Isocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht (FSC= Forward Scatter)
FZ	follikuläre B-Zelle
g	Gramm
GC	Keimzentrumszelle

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Ged. BZ	Gedächtnis-B-Zelle
GK	Glukokortikoide
GP	Glykoprotein
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	humane Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITP	Immunthrombozytopenie
IVIG	intravenöse Immunglobuline
KM	Knochenmark
l	Liter
m	männlich
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMF	Mycophenolatmofetil
MMR	Masern-Mumps-Röteln
MZ	Marginalzone-B-Zelle
n. b.	nicht bekannt
PAMPS	pathogen-assoziierte molekulare Muster
PB	Plasmablast
PBS	phosphate buffered saline= Phosphatgepufferte Salzlösung
PE-Cy	Phycoerythrin/Cyanin
PS	Penicillin/ Streptomycin
Pre-BCR	Pre-B-Zell-Antigen-Rezeptor
PZ	Plasmazelle

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ROM	Romiplostim
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTX	Rituximab
SD	Standardabweichung
SE	Splenektomie
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Seitwärtsstreulicht (SSC= Side Scatter)
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzelle
Thromboz.	Thrombozyten
TLR	Toll-like-Rezeptor
TZ	Transitional-B-Zelle
V-preB	V-Pre-B-Zell-Ersatz-Leichtkette
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel

## 10 Anhang

### 10.1 Danksagung

## 10.2 Lebenslauf