

Diplomarbeit

**B-Zellsubpopulationen bei Patienten
mit Immundefizienz**

eingereicht von

Veronika Hagspiel

Mat.Nr.: 0433295

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Rheumatologie und Immunologie

unter der Anleitung von

a.o. Univ. Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek

Februar 2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Gleichheitsgrundsatz

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, geschlechtsspezifische Formulierungen zu verwenden. Jedoch wird ausdrücklich festgehalten, dass das bei Personen verwendete generische Maskulinum sich auf beide Geschlechter bezieht.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich sowohl bei der Erstellung der Diplomarbeit als auch während meines Studiums unterstützt haben.

In erster Linie danke ich **meiner Mama Angelika, sowie meinen Geschwistern Katharina, Johannes und David** für ihren Rückhalt, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

Ganz besonderen Dank gilt **meinem Freund Markus**, der mich in den letzten Jahren durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat, mich immer wieder aufgebaut und stets neu motiviert hat.

Weiters bedanke ich mich bei **meinen Freunden und Studienkollegen**, die mich während des Studiums unterstützt, motiviert und aufgemuntert haben. Danke für all die fröhlichen, bewegenden und unvergesslichen Momente!

Abschließend möchte ich meinem Betreuer **Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek** danken, durch den ich das spannende Fach der Immunologie näher kennengelernt habe und neben zahlreichen Fortbildungen an einem mehrtägigen Kongress in Istanbul teilnehmen konnte. Ich danke Ihnen vielmals für diese einmalige Gelegenheit!

*In Dankbarkeit und Andenken an
meine Schwester Stefanie
und meinen Papa!*

Zusammenfassung

Hintergrund: Die CVID (Common Variable Immunodeficiency) und die selektiven Immundefekte (sID) gehören zur Gruppe der Antikörpermangelsyndrome, die zu den klinisch am meisten anzutreffenden primären Immundefekten zählen. Betroffene, die sich meist mit rezidivierenden bakteriellen Infektionen des Atemwegstraktes präsentieren, weisen größtenteils eine normale B-Zellzahl auf, weshalb ein Entwicklungsblock in der Antigen-abhängigen B-Zellreifung angenommen wird. Mittels Durchflusszytometrie konnten bei CVID-Patienten bereits mehrere Defekte in der Differenzierung bestimmter B-Zellsubpopulationen festgestellt werden. Während diese Methode bei der CVID mittlerweile zur Routinediagnostik zählt, findet sie bei sID zum einen kaum Anwendung und zum anderen gibt es für diese Patientengruppe nur wenige Daten zur Häufigkeit der einzelnen B-Zellpopulationen.

Methoden: Bei dieser Studie nahmen 24 CVID-Patienten, 19 sID-Patienten (14 mit IgG-Subklassendefekt, 3 mit selektiver IgA-Defizienz und 2 mit selektivem IgM-Mangel) und 54 gesunde Probanden teil. Mittels 7-Kanal-Durchflusszytometrie (BD Canto II Zytometer, Software FACSDiva) wurden anhand der Oberflächenmarker folgende B-Zellsubpopulationen analysiert: Naive ($CD19^+IgD^+CD27^-$), IgD-Memory ($CD19^+IgD^+CD27^+$), Postswitch (Ps)-Memory ($CD19^+IgD^-CD27^+$) und doppelnegative B-Zellen ($CD19^+IgD^-CD27^-$), sowie transitionale B-Zellen ($CD19^+CD27^-IgD^+CD38^{++}CD24^{++}$) und $CD27^{high}$ Plasmablasten ($CD19^+IgD^-CD27^{++}$). Zudem wurde die Expression von CD38, CD80 und CD95 für jede Population bestimmt. Die statistische Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18.0.

Resultate: Die CVID-Patienten zeigten signifikant erniedrigte Plasmablasten (0,1%) und Ps-Memory (3,9%), sowohl im Vergleich zur sID Gruppe (0,5%, $p \leq 0,0005$; 20,7%, $p \leq 0,0005$) als auch zu den gesunden Probanden (0,6%, $p \leq 0,0001$; 17%, $p \leq 0,0001$). Zudem waren die $CD38^-/CD80^-$ -Ps-Memory B-Zellen (33,9%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (22,7%, $p \leq 0,001$) und die naiven B-Zellen (77%) im Vergleich zur sID-Gruppe (51%, $p \leq$

0,001) signifikant erhöht. Die CD38⁺/CD80⁺- Ps-Memory (12,1%) wie auch die CD38⁺/CD95⁺- Ps-Memory (13,0%) und CD38⁺/CD95⁺ naiven B-Zellen (1,3%) der sID-Patienten waren, verglichen mit den gesunden Probanden (20,4%, $p \leq 0,001$; 24,5%, $p \leq 0,001$; 2,5%, $p \leq 0,001$), signifikant erniedrigt.

Schlussfolgerung: Die drastisch erniedrigten Plasmablasten und Ps-Memory B-Zellen der COVID-Patienten unterstützen die Hypothese, dass der Antikörpermangel durch eine Störung bzw. einen Stopp während der B-Zelldifferenzierung im Keimzentrum bedingt ist. Die selektiven Immundefekte, welche normale Werte für diese Populationen aufweisen, scheinen hingegen viel eher Folge eines gestörten Isotypen-Wechsels zu sein.

Abstract

Background: Immunoglobulin deficiency syndromes, such as CVID (Common Variable Immunodeficiency) and selective immunodeficiencies (sID), are the most common symptomatic forms of primary immunodeficiency and are characterized by recurrent bacterial infections of the respiratory tract. Most patients have normal B cell counts, suggesting a role of blocks in antigen-dependent B cell differentiation. Flow cytometric analysis of peripheral B cells from patients with CVID revealed defects in the development of certain B cell subpopulations. Although it is a routine diagnostic evaluation in CVID patients, flow cytometry is uncommon in sID and there is only limited knowledge of the B cell subsets in these patients.

Methods: 24 CVID patients, 19 sID patients (14 with IgG subclass deficiency, 3 with selective IgA deficiency and 2 with selective IgM deficiency) and 54 healthy controls were included in the study. According to their surface expression the following B cell subsets were analyzed via seven-channel flow cytometry (BD Canto II cytometer, Software FACSDiva): naïve ($CD19^+IgD^+CD27^-$), IgD memory ($CD19^+IgD^+CD27^+$), post-switch (ps) memory ($CD19^+IgD^-CD27^+$) and double negative B cells ($CD19^+IgD^-CD27^-$). Furthermore transitional B cells ($CD19^+CD27^-IgD^+CD38^{++}CD24^{++}$), $CD27^{high}$ plasmablasts ($CD19^+IgD^-CD27^{++}$) and the expression of CD38, CD80 and CD95 in each population were determined. Statistical analysis and data presentation were performed using PASW Statistics software version 18.0.

Results: CVID patients had significantly less plasmablasts (0,1%) and ps memory (3,9%), compared to sID patients (0,5%, $p \leq 0,0005$; 20,7%, $p \leq 0,0005$) and controls (0,6%, $p \leq 0,0001$; 17%, $p \leq 0,0001$). Furthermore they had significantly higher $CD38^-/CD80^-$ ps memory (33,9%) compared to controls (22,7%, $p \leq 0,001$) and significantly higher naïve B cells (77%) compared to sID patients (51%, $p \leq 0,001$). sID patients had significantly less $CD38^+/CD80^+$ ps memory (12,1%), $CD38^+/CD95^+$ ps memory (13,0%) and

CD38⁺/CD95⁺ - naïve B cells (1,3%) compared to controls (20,4%, $p \leq 0,001$; 24,5%, $p \leq 0,001$; 2,5%, $p \leq 0,001$).

Conclusion: Plasmablasts and ps memory B cells were dramatically diminished in CVID patients whereas sID patients had normal counts for these populations. These results strengthen the hypothesis that CVID is caused by defects in germinal center B cell differentiation while sID may be due to dysfunction of B lymphocyte isotype switching.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Immunglobuline	1
1.1.1.1 Struktur der Immunglobuline	2
1.1.1.2 Somatische Rekombination	4
1.1.1.3 Immunglobulinklassen (s.Abb. 2) [1,3]	4
1.1.2 B-Lymphozyten	6
1.1.2.1 Von der hämatopoetischen Stammzelle zur naiven B-Zelle	7
1.1.2.2 Von der naiven B-Zelle zur Plasma- oder Memoryzelle	8
1.1.2.3 Die T-Zell-unabhängige Immunantwort	13
1.1.2.4 Differenzierungsmarker	13
1.2 Humorale Immundefekte	15
1.1.3 Common Variable Immunodeficiency (CVID)	16
1.1.3.1 Definition	16
1.1.3.2 Epidemiologie	17
1.1.3.3 Ätiologie	17
1.1.3.4 Klinische Präsentation	20
1.1.3.5 Diagnostik	22
1.1.3.6 Klassifikation	24
1.1.3.7 Therapie	26
1.1.4 Selektive IgA-Defizienz	26
1.1.4.1 Definition, Epidemiologie und Klinik	26
1.1.4.2 Therapie und Prognose	27
1.1.5 IgG-Subklassendefekt	27
1.1.5.1 Definition und Epidemiologie	27
1.1.5.2 Klinik und Therapie	28

2	Fragestellung	29
3	Probanden und Methoden	31
3.1	Probanden	31
3.1.1	Einwilligungserklärung/Ethikkommission	31
3.1.2	Patientenkollektiv	31
3.1.3	Kontrollgruppe	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	B-Zellsubtypisierung durch hochsensitive FACS-Analyse	32
3.2.2	Differentialblutbild und „Kleiner Lymphozytenstatus“	34
3.2.3	Statistische Datenanalyse	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Deskriptive Statistik	35
4.2	Analytische Statistik	37
4.2.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede	37
4.2.2	B-Zellsubpopulationen in den einzelnen Untergruppen	37
4.2.3	Lymphozyten und B-Zellen	38
4.2.4	Plasmablasten	39
4.2.5	Postswitch-Memory B-Zellen	40
4.2.6	Doppelnegative B-Zellen	43
4.2.7	IgD-Memory B-Zellen	43
4.2.8	Naive B-Zellen	44
4.2.9	T1 B-Zellen	45
4.3	Signifikante Ergebnisse im Überblick	46
5	Diskussion	50
6	Literaturverzeichnis	54

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
BAFF-R	B-cell activating factor receptor
bzgl.	bezüglich
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
CD40L	CD40-Ligand
CD95L	CD95-Ligand
CDR	complementarity determining region
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CVID	Common Variable Immunodeficiency
DC	dendritische Zelle
ESID	European Society for Immunodeficiencies
FcR	Fc-Rezeptor
FcεRI	Immunglobulin E Rezeptor I
FDC	follikuläre dendritische Zelle
HRCT	High Resolution Computertomographie
ICOS	inducible co-stimulator
Ig	Immunglobulin
IgAD	selektive IgA-Defizienz
IL	Interleukin
IVIg	intravenöse Immunglobulin-Therapie
MALT	mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
mIg	membrangebundenes Immunglobulin
MZ	Marginalzone
NK	natürliche Killerzelle
Ps-Memory	Postswitch-Memory B-Zelle

s.Abb.	siehe Abbildung
s.Tab.	siehe Tabelle
SCIg	subkutane Immunglobulin-Therapie
sID	selektiver Immundefekt
sog.	sogenannte
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
XLA	X-linked Agammaglobulinämie
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Antikörpermolekül (IgG) [1].....	3
Abb. 2: Die Antikörper-Isotypen [3].....	5
Abb. 3: Die B-Zellentwicklung [5]	6
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Lymphknotens [2]	9
Abb. 5: „Cognate T-B-interaction“ [14].....	10
Abb. 6: Die Keimzentrumsreaktion [2].....	12
Abb. 7: Manifestationsalter der COVID mit zwei Erkrankungsgipfeln (mod. nach [36])....	17
Abb. 8: Freiburg-Klassifikation (mod. nach [65,66])	24
Abb. 9: Paris-Klassifikation (mod. nach [66,67])	25
Abb. 10: EUROclass-Klassifikation (mod. nach [66,68]).....	25
Abb. 11: Auftrennung von Blutzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) in einer Dot-Blot-Analyse [78].....	33
Abb. 12: Altersmediane der einzelnen Gruppen	37
Abb. 13: Naive B-Zellen der Gruppen MB0, MB1 und MB2 im Vergleich zur Kontrollgruppe	38
Abb. 14: Lymphozyten und B-Zellen.....	39
Abb. 15: Plasmablasten und CD38 ^{high} Plasmablasten	40
Abb. 16: Ps-Memory B-Zellen.....	41
Abb. 17: CD38 ⁺ /CD80 ⁺ -Ps-Memory B-Zellen	41
Abb. 18: CD38 ⁻ /CD80 ⁻ -Ps-Memory B-Zellen.....	42
Abb. 19: CD38 ⁺ /CD95 ⁺ -Ps-Memory B-Zellen	42
Abb. 20: CD38 ⁺ /CD80 ⁻ , CD38 ⁺ /CD95 ⁺ - und CD38 ⁻ /CD95 ⁻ -doppelnegative B-Zellen	43
Abb. 21: IgD-Memory B-Zellen	44
Abb. 22: Naive B-Zellen	44
Abb. 23: CD38 ⁺ /CD95 ⁺ -, CD38 ⁺ /CD80 ⁻ -, CD38 ⁻ /CD80 ⁻ - und CD38 ⁻ /CD95 ⁻ naive B- Zellen.....	45
Abb. 24: T1 B-Zellen (#/500.000) und T1 B-Zellen (% von naiven B-Zellen).....	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biologische Eigenschaften der Immunglobuline (mod. nach [3])	4
Tab. 2: Ursachen einer sekundären Hypogammaglobulinämie (mod. nach [33]).....	16
Tab. 3: ESID Warnzeichen für primäre Immundefekte bei Erwachsenen (mod. nach [32])	22
Tab. 4: Differentialdiagnosen bei Patienten mit häufigen bakteriellen Infekten, nach Altersgruppen aufgeteilt (mod. nach [31])	23
Tab. 5: Antikörper, die zur Bestimmung der B-Zellsubpopulationen verwendet wurden	34
Tab. 6: Medianwerte der B-Zellsubpopulationen für die einzelnen Gruppen.....	36
Tab. 7: Mittelwerte und Mediane des Alters für die einzelnen Gruppen	36
Tab. 8: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die naiven B-Zellen.....	38
Tab. 9: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die Plasmablasten.....	39
Tab. 10: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die Ps-Memory B-Zellen.....	40
Tab. 11: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die CD38 ⁺ /CD80 ⁺ -Ps-Memory	41
Tab. 12: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die CD38 ⁻ /CD80 ⁻ -Ps-Memory.	41
Tab. 13: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die naiven B-Zellen.....	44
Tab. 14: P-Werte der durchgeführten statistischen Tests	47
Tab. 15: Vergleich der Medianwerte von CVID-Patienten und gesunden Probanden.....	48
Tab. 16: Vergleich der Medianwerte von sID-Patienten und gesunden Probanden.....	48
Tab. 17: Vergleich der Medianwerte von CVID- und sID-Patienten.....	48
Tab. 18: Medianwerte der naiven B-Zellen für die Gruppen der Paris-Klassifikation und für die Kontrollgruppe	49

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, welches Mikroorganismen, eingedrungene Fremdstoffe und auch altersbedingt oder neoplastisch veränderte Zellen bekämpft [1]. Während der Evolution haben sich unterschiedliche Formen der Immunabwehr entwickelt: die angeborene Immunabwehr, welche vor allem von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK) und neutrophilen Granulozyten ausgeführt wird und die adaptive Immunabwehr (auch spezifische oder erworbene Immunabwehr genannt), die vorwiegend von B- und T-Lymphozyten vermittelt wird.

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch ihre hohe Spezifität, die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern sowie durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Sie wird weiter unterteilt in die zelluläre – welche durch zytotoxische T-Zellen und NK bewirkt wird und der Eliminierung virusbefallener Zellen und Tumorzellen dient – und in die humorale Immunantwort – die auf dem B-Zell-System und der Antikörperbildung basiert.

1.1.1 Immunglobuline

Immunglobuline (Ig) sind Proteine, die in zwei Formen vorkommen: Membrangebunden (mIg) an der Oberfläche von B-Lymphozyten, wo sie als Antigenrezeptoren wirken, und in Form sezernierter Antikörper (Ak) in Blut, extrazellulärer Flüssigkeit der Gewebe und Sekreten (Speichel, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, Sekrete des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes).

Die Funktionen der Antikörper, welche als Effektormoleküle der humoralen sowie der Ak-vermittelten zellulären Immunantwort dienen, umfassen zwei Aufgabenbereiche:

- Erkennung und Bindung von Antigenen (Ag)

- Interaktion mit Molekülen und Zellen des Immunsystems; *diese Funktion umfasst u.a. die Elimination von gebundenen Antigenen, die Bindung und Aktivierung von Immunzellen sowie von Komplement-Faktoren.*

Die Bildung von Antikörpern erfolgt fast ausschließlich durch Plasmazellen, die sich vorwiegend im Knochenmark und in der gastrointestinalen und respiratorischen Mukosa befinden [2,3].

1.1.1.1 Struktur der Immunglobuline

Mittels Elektrophorese ist es möglich Plasmaproteine entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in Albumine und α 1-, α 2-, β - und γ -Globuline aufzutrennen. Da Antikörper in der γ -Fraktion der Globuline wandern, wird gelegentlich die Bezeichnung γ -Globuline verwendet [3].

Antikörper zeigen alle dieselbe Grundstruktur: Sie bestehen aus zwei identischen schweren (H; heavy) und zwei identischen leichten (L; light) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede einzelne Kette besitzt eine Carboxy-terminale **konstante (C)** und eine Amino-terminale **variable (V) Region**, wobei die V-Regionen der schweren und leichten Ketten zusammen die Ag-Bindungsstelle des Immunglobulins bilden. Im Bereich dieser Bindungsstelle befinden sich auf jeder Kette drei Abschnitte mit ausgeprägter Variation der Aminosäuresequenz, welche als **hypervariable Abschnitte** oder **CDR** (complementarity determining regions) bezeichnet werden [2].

Immunglobuline können durch proteolytische Enzyme in zwei funktionell unterschiedliche Abschnitte, das **Fab-Fragment** („fragment, antigen binding“) und das **Fc-Fragment** („fragment, crystallizable“), aufgespalten werden (s.Abb. 1). Das Fc-Fragment kann über einen spezifischen Rezeptor, den Fc-Rezeptor (FcR), die Bindung des Antikörpers an Immunzellen ermöglichen [4].

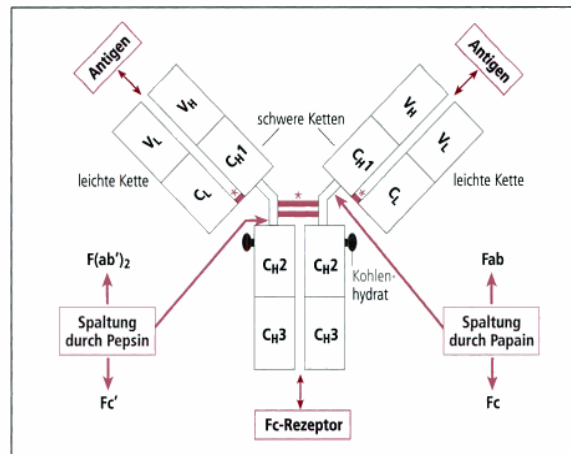


Abb. 1: Antikörpermolekül (IgG) [1]

C_L = konstante Domäne der leichten Kette, C_H1-3 = konstante Domänen der schweren Kette, V_L = variable Domäne der leichten Kette, V_H = variable Domäne der schweren Kette, Fab, F(ab')₂, Fc, Fc' = Spaltprodukte nach enzymatischer Verdauung, * = Disulfidbrücke

Die **schweren Ketten** sind mit kleinen griechischen Buchstaben (μ , δ , γ_{1-4} , $\alpha_{1,2}$ und ϵ) bezeichnet und bestimmen die Klasse bzw. Subklasse eines Antikörpers (IgM, IgD, IgG₁₋₄, IgA_{1,2} und IgE). Die H-Ketten von IgM und IgE besitzen je fünf Domänen, diejenigen von IgG, IgD und IgA jeweils vier [4]. Abgesehen von der Antigenbindung werden alle Effektormechanismen der Antikörper durch die konstante Region der schweren Kette vermittelt, weshalb jede Immunglobulinklasse unterschiedliche biologische Eigenschaften besitzt. So sind z.B. nur bestimmte Isotypen zur Komplementaktivierung, zur Opsonisation oder zur Mastzellbindung befähigt (s.Tab. 1) [3].

Die **leichten Ketten** werden in zwei unterschiedliche Typen – κ und λ – eingeteilt, wobei ein Antikörper entweder zwei κ -Ketten oder zwei λ -Ketten besitzt. Bis jetzt konnten keine funktionellen Unterschiede zwischen Antikörpern mit κ -Ketten und solchen mit λ -Ketten festgestellt werden, zudem können beide in jeder Immunglobulinklasse vorhanden sein. Das Verhältnis von κ - zu λ -Ketten variiert von Spezies zu Spezies, beim Menschen beträgt es 2:1. Abweichungen von diesen Werten lassen sich manchmal bei Patienten mit monoklonalen B-Zell-Tumoren nachweisen, weshalb die Bestimmung der Leichtketten zur Lymphom-Diagnostik zählt [4].

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Schwere Ketten	γ	α	μ	δ	ε
Syntheserate (mg/kg/Tag)	35	25	7	0,2	0,002
Serumkonzentration (mg/ml)	13,5	3,5	1,5	Spuren	0,05
Serumhalbwertszeit (Tage)	4-23	6	6	3	2-3
Plazentatransfer	+	-	-	-	-
Antibakterielle Lyse	+	+	+++	?	?
Antivirale Aktivität	+	+++	+	?	?
Komplementaktivierung					
- klassischer Weg	+ (IgG ₁ +IgG ₃ >>IgG ₂)	-	++	-	-
- alternativer Weg	-	+ (IgA ₁)	-	(+)	-
Opsonisation	+	-	-	-	-
Bindung an Mastzellen und Neutrophile	-	-	-	-	+++
Weitere Funktionen	- Neonatale Immunität - ADCC	- Mukosale Immunität	- Naiver Ag-Rezeptor - Primäre Ak-Antwort	- Naiver Ag-Rezeptor	- Hypersensibilitäts-Reaktion Typ 1 - Abwehr von Parasiten

Tab. 1: Biologische Eigenschaften der Immunglobuline (mod. nach [3])

ADCC = Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität, Ag = Antigen, Ak = Antikörper, Ig = Immunglobulin

1.1.1.2 Somatische Rekombination

Während der B-Zellentwicklung kommt es zur Rekombination von DNA-Abschnitten, die für die variablen Regionen der Ig-Ketten kodieren. Dieser Vorgang wird auch als V(D)J-Rekombination bezeichnet und ermöglicht den B-Zellen eine große Vielfalt von Antigenrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität aus einer limitierten Anzahl von Gensegmenten zu generieren. Dazu werden in jeder B-Zelle für die H-Kette ein V (variable)-, ein D (diversity)- und ein J (joining)- Gensegment und für die L-Kette ein V- und ein J-Segment zusammengefügt [2].

1.1.1.3 Immunglobulinklassen (s.Abb. 2) [1,3]

IgM wird bei einer primären Immunantwort zuerst synthetisiert und kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor: Entweder als Monomer an der Oberfläche von unreifen und reifen B-Zellen sowie von Gedächtniszellen (Memoryzellen), wo IgM als Ag-Rezeptor

dient, oder als Pentamer, welches Antigene bindet und die Komplementkaskade aktiviert. IgM-Pentamere existieren ausschließlich als sezernierte Moleküle und machen etwa 10% aller zirkulierenden Immunglobuline im Serum aus. Auch monomeres IgM kann im Serum nachgewiesen werden, meist jedoch nur bei Menschen mit Lupus erythematoses oder rheumatoider Arthritis.

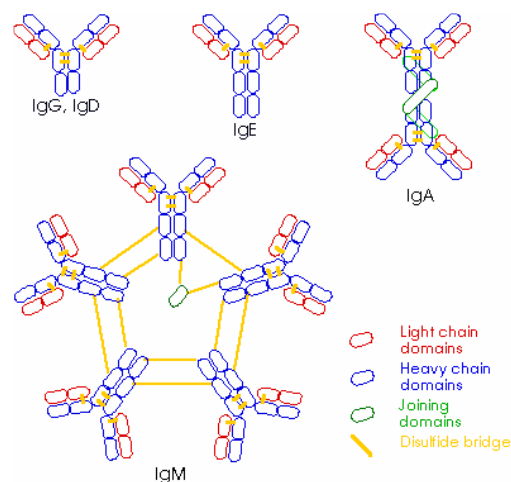


Abb. 2: Die Antikörper-Isotypen [3]

Schematische Darstellung der Domänen und der Disulfidbrücken der einzelnen Antikörper-Isotypen

IgD kommt in löslicher Form im Serum und in membrangebundener Form auf reifen, naiven B-Zellen vor. IgD bildet zusammen mit den Korezeptoren $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (CD79) den für naive B-Zellen typischen Ag-Rezeptor-Komplex. Die Funktion von IgD für die humorale Abwehr ist nicht genau bekannt.

IgG wird bei Sekundär- und Folgeimmunantworten gebildet, besitzt die längste Halbwertszeit aller Antikörper und macht mit etwa 70% den Hauptteil der zirkulierenden Immunglobuline aus. IgG-Antikörper treten im Blut und in Gewebsflüssigkeiten auf und vermitteln als einzige plazentagängige Antikörper dem Kind in den ersten Lebensmonaten Leihimmunität. Sie haben die Aufgabe Toxine, Viren und Bakterien zu binden und damit zu neutralisieren bzw. zu opsonisieren, sowie die Komplementkaskade zu aktivieren.

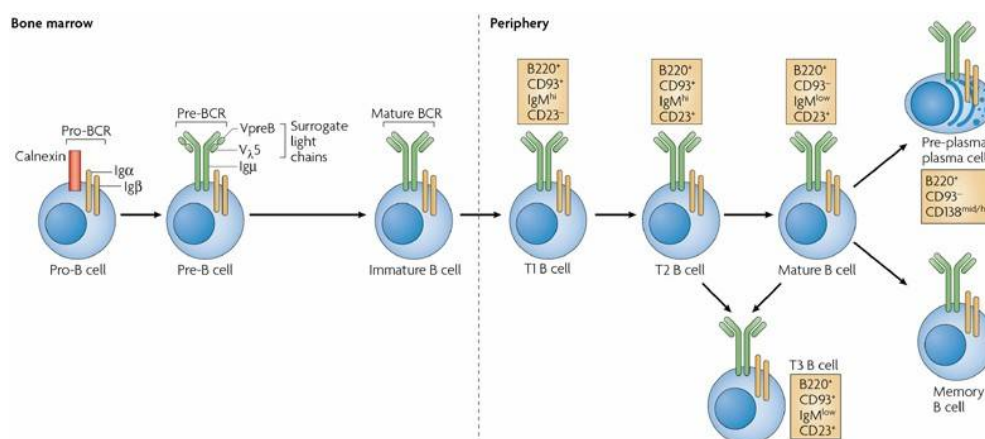
IgA liegt im Blut überwiegend in monomerer Form vor, während die dimere Form typisch für das sekretorische IgA der Schleimhäute ist, welches als erster Abwehrwall gegenüber respiratorischen und gastrointestinalen Pathogenen dient.

IgE findet sich im Serum von Gesunden nur in geringer Menge, während bei Atopikern oder bei Parasitenbefall die Konzentration deutlich erhöht ist. So hat dieser Isotyp eine zentrale Mitbeteiligung bei Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I und bei der Abwehr von Parasiten. Bei allergischen Reaktionen binden sich IgE über FcεRI an Mastzellen und basophile Granulozyten, was zur Freisetzung von Histamin und Leukotrienen führt.

1.1.2 B-Lymphozyten

B-Zellen sind vorwiegend für die humorale Immunabwehr verantwortlich, nehmen aber auch als antigenpräsentierende Zellen (APC) an Immunantworten teil. Die zentrale Bedeutung für das Immunsystem liegt in ihrer Fähigkeit, Antikörper zu bilden, welche Antigene direkt und mit hoher Affinität binden können.

Die Differenzierung von lymphatischen Vorläuferzellen zu reifen B-Zellen dauert beim Menschen zwei bis drei Tage und umfasst folgende Reifungsstufen: Frühe Pro-B-Zelle (D-J), späte Pro-B-Zelle (V-DJ), Prä-B-Zelle (VDJ, intrazellulär μ), unreife B-Zelle (mIgM) und reife B-Zelle (mIgM, mIgD) (s. Abb. 3).



Nature Reviews | Immunology

Abb. 3: Die B-Zellentwicklung [5]

1.1.2.1 Von der hämatopoetischen Stammzelle zur naiven B-Zelle

Aus der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle, der sog. „Urzelle“ der Blutbildung, entwickeln sich lebenslang alle Reihen der lymphatischen und der myeloischen Hämatopoese. Die myeloiden Progenitorzellen differenzieren zu Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten, die lymphoiden Progenitorzellen zu B- und T-Lymphozyten, zu lymphoiden dendritischen Zellen (DC) sowie zu NK.

B-Zellen werden während der Fetalzeit in der Leber, bei Neugeborenen in der Milz und später im Knochenmark gebildet, welches unter physiologischen Bedingungen für den Rest des Lebens diese Aufgabe hat. Je nach Bildungsort können die B-Lymphozyten in zwei unterschiedliche Typen eingeteilt werden: Die B1-Zellen werden in der Pränatalperiode in der Leber gebildet und die B2-Zellen, zu denen die folliculären und Marginalzonen B-Zellen zählen, werden im Knochenmark gebildet [2]. Die Mikroumgebung des Knochenmarks liefert Signale für die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen; spezialisierte nichtlymphatische Stromazellen des Bindegewebes vermitteln diese über Liganden sowie Zytokine und Chemokine [4].

Die **frühen Pro-B-Zellen** entsprechen dem ersten Stadium der B-Zell-Reifung und exprimieren bereits CD19, ein Differenzierungsmarker der ausschließlich auf Zellen der B-Zell-Reihe vorkommt. Die Ersatz-Leichtketten $\lambda 5$ und V-präB, welche für die Bildung des Prä-B-Zell-Rezeptors (Prä-BZR) benötigt werden, sind in diesem Entwicklungsstadium schon vorhanden und die Umlagerung der Gene für die schwere Kette beginnt.

Mit der D-J_H-Verknüpfung wird die Zelle zu einer **späten Pro-B-Zelle**, die an der Zelloberfläche CD20 und CD40 aufweist. Um eine vollständige schwere Immunglobulinkette hervorzubringen, kommt es zur V_H-DJ_H-Rekombination. Die μ -Kette (ohne Leichtkette) wird im Zytoplasma detektierbar und die Zelle wird nun als Prä-B-Zelle bezeichnet; bei fehlender μ -Kette wird die Pro-B-Zelle zerstört [6].

Im Stadium der **Prä-B-Zelle** verbindet sich die μ -Kette mit $\lambda 5$ und V-präB sowie mit den Proteinen Ig α und Ig β zum Prä-BZR, welcher eine wichtige Voraussetzung für die Reifung der B-Lymphozyten darstellt. Als nächstes folgt das Rearrangement der Leichtketten-Gene [2].

Im Stadium der **unreifen B-Zelle** wird nun das komplette Immunglobulin IgM auf der Zelloberfläche präsentiert und der Antigenrezeptor wird zum ersten Mal auf Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen geprüft. Autoreaktive unreife B-Zellen haben folgende Möglichkeiten: Negative Selektion durch Deletion, die Produktion eines neuen Rezeptors durch „Rezeptor Editing“ oder Induktion eines Zustands der Reaktionslosigkeit (Anergie) [4]. Nach der Toleranzprüfung verlassen die unreifen B-Zellen als transitionale 1 (T1) B-Zellen über den Zentralsinus das Knochenmark und gelangen über venöses Blut in die Milz, wo sie sich zu T2 B-Zellen differenzieren [7,8]. Nach dem Verlassen des Knochenmarks exprimieren die B-Zellen an ihrer Zelloberfläche IgD und IgM, was den Übergang vom unreifen zum reifen B-Zellstadium kennzeichnet [9].

Bei den **reifen, naiven B-Zellen** – die sich aus transitionalen B-Zellen entwickeln – lassen sich folliculäre und Marginalzonen (MZ) B-Zellen unterscheiden.

MZ B-Zellen befinden sich vorwiegend in der Milz und dienen der frühen (T-Zell-unabhängigen) Immunantwort gegen Krankheitserreger im Blut [10]. Sie zeigen die schnellste B-Zell-Antwort auf Pathogene im Blut und überbrücken somit die Lücke zwischen sofortiger angeborener und verzögerter adaptiver Immunantwort [11].

Die folliculären B-Zellen sind die Träger der adaptiven Immunantwort und stellen zahlenmäßig im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen die größte B-Zellsubpopulation dar [12]. Sie sind zur Rezirkulation befähigt und können über Blut- und Lymphbahnen von einem lymphatischen Organ zum nächsten wandern, wo sie sich in B-Zell-Follikeln ansiedeln [2]. Die folliculären B-Zellen spielen in der T-Zell-abhängigen Immunantwort eine wichtige Rolle und haben die Möglichkeit an Keimzentrumsreaktionen teilzunehmen, wo sie sich zu langlebigen Memory- oder Plasmazellen differenzieren können [12].

1.1.2.2 Von der naiven B-Zelle zur Plasma- oder Memoryzelle

Die sekundären lymphatischen Organe dienen der Induktion von antigenspezifischen Immunantworten. Fremdstoffe im Blut werden in der Milz und Fremdstoffe in der Lymphe in den Lymphknoten herausgefiltert. Antigene aus dem Bereich der respiratorischen und gastrointestinalen Epithelien werden im MALT gesammelt [1].

Aufbau eines Lymphknotens (s.Abb. 4)

Die Haut, die Schleimhäute und auch die parenchymatösen Organe besitzen zahlreiche lymphatische Kapillaren, welche interstitielle Flüssigkeit absorbieren und über Lymphgefäße zu den Lymphknoten transportieren. Diese dienen als Filterstationen bevor die Lymphe das Blut erreicht und können Mikroorganismen, Toxine und Tumorzellen abfangen. Antigene erreichen den Lymphknoten entweder in freier Form oder werden von dendritischen Zellen, welche Antigene am Entzündungsort phagozytieren, transportiert. Die Lymphflüssigkeit strömt über mehrere afferente Lymphgefäße ein und verlässt den Lymphknoten über das efferente Lymphgefäß der Medulla [1].

Histologisch können folgende Bereiche des Lymphknotens unterschieden werden: Kortex, Parakortex und Medulla. Im Kortex befinden sich folliculäre dendritische Zellen (FDC) und B-Lymphozyten, welche in Primärfollikeln angeordnet sind. Nach Antigenkontakt entwickeln sich diese zu Sekundärfollikeln, welche ein Keimzentrum enthalten. Im Parakortex überwiegen dendritische Zellen und T-Lymphozyten, wobei $CD4^+$ -T-Helferzellen (Th-Zellen) mit etwa 70% die Mehrheit darstellen. In der Medulla finden sich Stränge von Makrophagen und Ak-produzierenden Plasmazellen [2].

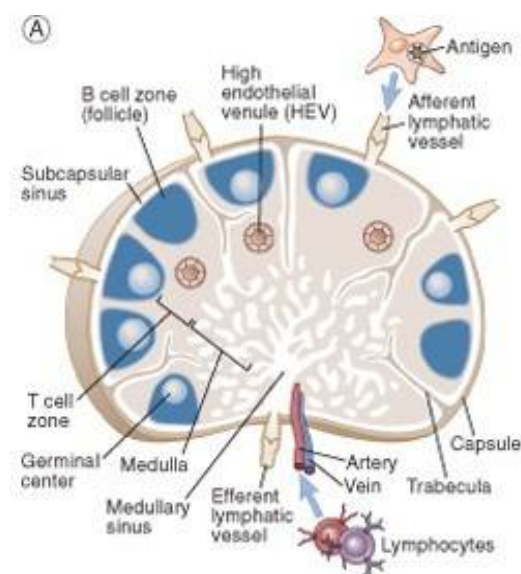


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Lymphknotens [2]

Diese anatomische Aufteilung von T- und B-Zellen garantiert, dass jede Lymphozytenpopulation mit den entsprechenden APC in Kontakt kommt – T-Zellen mit dendritischen Zellen und B-Zellen mit FDC.

Die B-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung von naiven B-Zellen findet entweder unabhängig von T-Zellen durch bakterielle Polysaccharide, Lipopolysaccharide und Antigene mit repetitiven Epitopen statt oder mit Hilfe von Th2-Zellen [13].

Bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort werden naive Th-Zellen über die Bindung ihres T-Zellrezeptors an MHC-II-gekoppelte Antigene (auf der Oberfläche von DC) aktiviert, wodurch es zur Expression des CD40-Liganden (CD40L) kommt. Anschließend wandern die aktivierten Th-Zellen entlang eines Chemokingradienten in Richtung der B-Zellzone. Nachdem die B-Zellen durch das passende Antigen aktiviert wurden und zudem das Antigen internalisiert, zu Peptiden abgebaut, an MHC-II-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert haben, wandern auch diese an die Grenze zwischen T-Zell-Areal und B-Zell-Follikel.

Treffen nun die aktivierten B-Zellen mit ihren zugehörigen Th2-Zellen zusammen, erfolgt die Stimulation der B-Zellen einerseits über die Bindung ihrer MHC-II/Peptid Komplexe an die T-Zellrezeptoren sowie von CD40 an CD40L. Weiters werden die B-Zellen über die Interaktion von CD80/CD86 mit CD28 stimuliert (s.Abb. 5) [14]. Die B-Zellen beginnen sich nun zu teilen – sie treten in die klonale Expansion ein [15].

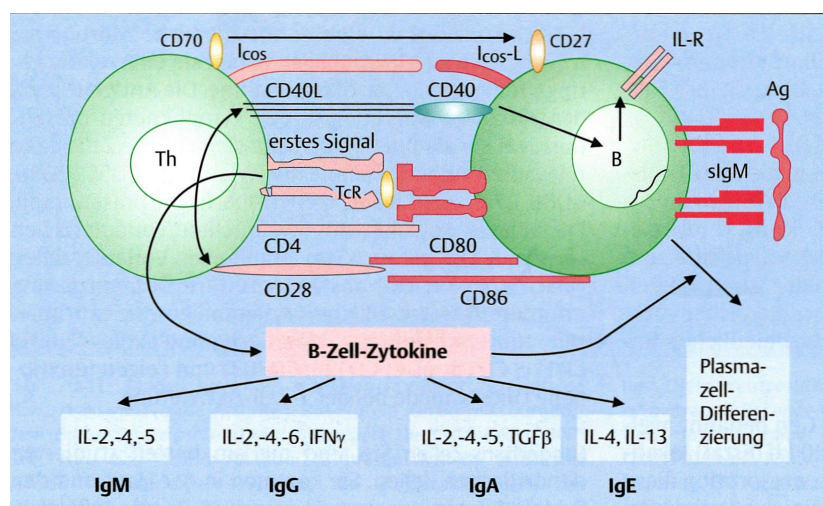


Abb. 5: „Cognate T-B-interaction“ [14]

Verschiedene Oberflächenmoleküle auf B- und T-Lymphozyten treten miteinander in Interaktion, stimulieren die Zellen, führen zur Aufregulation weiterer Adhäsionsmoleküle und regulieren die Zytokinsynthese.

Im nächsten Schritt entwickeln sich extrafollikuläre Foci, in denen sowohl T- als auch B-Zellen mehrere Tage proliferieren und sich zuerst zu Plasmablasten und letztendlich zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren, die IgM- und IgG-Antikörper mit niedriger Affinität produzieren. Einige wenige B-Zellen wandern innerhalb von drei bis fünf Tagen mit ihren assoziierten T-Zellen von den extrafollikulären Foci in einen Primärfollikel, in dem sie schließlich ein Keimzentrum bilden [16].

Die Keimzentrumsreaktion (s.Abb. 6)

In den Keimzentren der Lymphfollikel erfolgen einige typische Vorgänge der T-Zell-abhängigen Immunantwort – klonale Expansion, somatische Hypermutation, Affinitätsreifung, Klassenwechsel und Bildung von Memoryzellen [2,17].

Zu Beginn kommt es im Primärfollikel zur raschen Vermehrung der aktivierten B- und T-Zellen in Form einer „**klonalen Expansion**“ und zur Bildung eines Keimzentrums, welches sich im histologischen Präparat als heller Bereich im Zentrum des Follikels darstellt [2]. Innerhalb der Keimzentren kann weiters eine helle Zone von einer dunklen Zone, in der sich die Zentroblasten befinden, unterschieden werden.

In der Phase der Zentroblastenexpansion treten „**somatische Hypermutationen**“ im Bereich der CDR auf, die zur Bildung von unterschiedlich affinen BZR führen. Die Transkription der Immunglobuline wird in dieser Zeit vorübergehend eingestellt, sodass die Zelloberflächen Ig-negativ sind [18]. Anschließend differenzieren sich die Zentroblasten zu den kleineren Zentrozyten – die wieder Immunglobulin exprimieren – und wandern in die helle Keimzentrumszone. Hier sind die Zentrozyten in engem Kontakt zu einem dichten Netz aus FDC lokalisiert und erhalten über die Bindung an das von FDC präsentierte Antigen antiapoptotische Signale [19]. Weiters werden von T-Zellen Überlebenssignale vermittelt, wobei die Interaktion zwischen CD40 und CD40L eine wichtige Rolle spielt [18].

Die Zentrozyten können nun erneut in die Zellteilung als Zentroblasten eintreten und durch Punktmutationen die Affinität ihrer Oberflächenimmunglobuline steigern [18,19]. Führt eine Punktmutation jedoch zum Verlust der Affinität zum Antigen und dadurch zum Ausbleiben der notwendigen Überlebenssignale über den BZR, wird die B-Zelle durch Apoptose eliminiert.

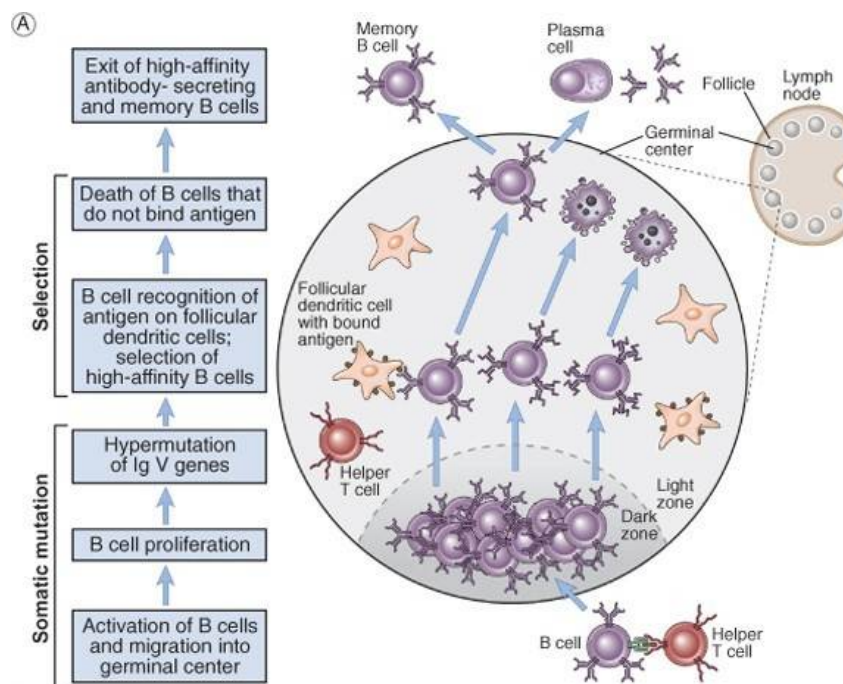


Abb. 6: Die Keimzentrumsreaktion [2]

In mehreren Runden von somatischer Hypermutation und nachfolgender Selektion reichern sich während einer Keimzentrumsreaktion B-Zellen mit erhöhter Affinität für das Antigen an, sodass sich die Ag-Bindungsstärke der sezernierten Antikörper nach und nach erhöht. Diesen Vorgang der somatischen Hypermutation und Antigen-abhängigen Selektion nennt man „**Affinitätsreifung**“ der Antikörperantwort [17].

Neben der Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation findet während der Keimzentrumsreaktion auch der **Immunglobulin-Klassenwechsel** statt [18]. Durch diesen Vorgang können B-Zellen den von ihnen sezernierten Ak-Isotyp unter Beibehaltung der Ag-Spezifität wechseln. Die Signale für die Rekombination der konstanten Abschnitte der schweren Ketten werden einerseits durch die Bindung von CD40 an CD40L und andererseits durch verschiedene Zytokine vermittelt [3].

Nach erfolgreicher Keimzentrumsreaktion entstehen **CD27⁺-Memory-B-Zellen**, die rezirkulieren, und **Plasmazellen**, die nur kurze Zeit im Blut überleben. Erreichen diese Plasmazellen allerdings sog. geschützte Nischen im Knochenmark oder in der Lamina propria mucosae, dann werden sie langlebig und repräsentieren einen wesentlichen Teil des immunologischen Gedächtnisses [14].

1.1.2.3 Die T-Zell-unabhängige Immunantwort

T-Zell-unabhängige Immunantworten kommen durch Antigene mit repetitiven Epitopen zustande, die zur Kreuzvernetzung der BZR führen. Ohne T-Zell-Hilfe kommt es allerdings nicht zur Keimzentrumsreaktion mit Klassenwechsel und somatischer Hypermutation, sodass nur IgM-Ak mit geringer Affinität produziert werden. Ein Beispiel dafür sind die Isohämagglutinine, die Ak gegen die Blutgruppenantigene A und B [17].

1.1.2.4 Differenzierungsmarker

Lymphozyten lassen sich morphologisch nicht unterscheiden, sie exprimieren aber je nach Differenzierungslinie und Ausreifungsstufe ein charakteristisches Profil von Oberflächenmolekülen. Die Ende der 1970er Jahre einsetzende Entwicklung monoklonaler Antikörper erlaubte es, diese Strukturen spezifisch zu erkennen und zu charakterisieren. Mittlerweile hat man mehr als 250 verschiedene membranständige Oberflächenmoleküle auf hämatopoetischen Zellen identifiziert, die nach der sog. CD (Cluster of Differentiation)-Klassifikation eingeteilt werden und eine diagnostische Differenzierung der Zellen ermöglichen [4,20]. Die CD-Moleküle sind aber nicht nur phänotypische Marker, sie weisen auch spezifische Funktionen auf: Die zwei häufigsten sind die Ermöglichung von Zell-Zell-Interaktionen (Adhäsionsmoleküle) und die Übertragung biochemischer Signale in das Zellinnere (Signaltransduktion) [2,21].

CD38

CD38 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches von verschiedensten Zellen – u.a. von T- und B-Zellen – exprimiert wird. Die Oberflächenexpression variiert während der Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten sehr [22]. So ist CD38 auf allen B-Zell-Vorläufern stark exprimiert, während die naiven B-Zellen nur eine intermediäre Expression zeigen. In der Keimzentrumsreaktion erlangen die B-Zellen die CD38-Expression erneut und sind als Plasmablasten stark positiv. Die Memory-B-Zellen werden hingegen CD38⁻ [23]. Eine Quervernetzung von CD38 führt zu Tyrosinphosphorylierung verschiedener Substrate sowie zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums, wodurch die B-Lymphopoese im Knochenmark gehemmt wird und die B-Zellen im Keimzentrum vor Apoptose geschützt werden [22,24,25].

CD80

CD80 (auch als B7.1 bekannt) gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül, das sich an der Oberfläche von B-Lymphozyten und anderen APC befindet. Als Liganden dienen CD28 oder CTLA4 an der Oberfläche von T-Lymphozyten: Über die Interaktion mit CD28 entsteht das zweite Signal, das für die T-Zell-Aktivierung unentbehrlich ist, während über CTLA4 die Aktivierung von T-Lymphozyten gehemmt wird und der Zellzyklus blockiert wird [26,27].

CD95

CD95 (auch bekannt als Fas oder Apo-1) gehört zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und lässt sich auf Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und Fibroblasten nachweisen. Gemeinsam mit seinem physiologischen Liganden, CD95-Ligand (CD95L), spielt dieses Molekül eine entscheidende Rolle in der Funktion des Immunsystems. Durch die Bindung des CD95L an CD95 wird in Zellen der apoptotische Zelltod ausgelöst, was der Elimination von infizierten Zellen, von nicht mehr benötigten Lymphozyten sowie von neoplastisch veränderten und autoimmunen Zellen dient [28]. B-Lymphozyten können sich jedoch durch Kreuzvernetzung ihres BZR und Bindung von CD40 vor der CD95-induzierten Apoptose schützen [29].

1.2 Humorale Immundefekte

Klinisches Zeichen eines Immundefektes ist eine erhöhte Infektanfälligkeit. Bei den humoralen Immundefekten liegt die Ursache in einer beeinträchtigten Antikörperproduktion, was eine verminderte Resistenz gegen bakterielle Infektionen zur Folge hat. Im Vordergrund stehen Infektionen mit eiterbildenden Erregern (Streptokokken und Staphylokokken), die Abwehr fungaler und viraler Infektionen ist dagegen weitgehend ungestört [30].

Zur Gruppe der primären Antikörperdefizienzen gehören:

1. **Common Variable Immunodeficiency (CVID)**

Die CVID ist der häufigste klinisch relevante Immundefekt und ist definiert durch erniedrigte IgG- und IgM- oder IgA-Serumspiegel.

2. **Selektive IgA-Defizienz (IgAD)**

Der selektive IgA-Mangel ist in Europa die häufigste primäre Immundefizienz, die jedoch nur in 30% mit klinischen Symptomen einhergeht.

3. **IgG-Subklassendefizienz**

IgG-Subklassendefekte sind charakterisiert durch ein annähernd normales Gesamt-IgG bei erniedrigter Konzentration von mindestens zwei IgG-Subklassen.

4. **X-linked Agammaglobulinämie (M.Bruton, XLA)**

Betroffene weisen einen deutlichen oder vollständigen Mangel aller Ig-Isotypen auf und B-Zellen sind kaum (<1% der Lymphozyten) oder gar nicht nachweisbar. Aufgrund des X-chromosomal rezessiven Erbgangs erkranken unter den Anlageträgern nur die Knaben, während die Mädchen klinisch gesunde Konduktorinnen sind.

5. **Autosomal-rezessive Agammaglobulinämie**

Eine sehr seltene Form des angeborenen isolierten Antikörpermangels, die sich meist früher als die XLA manifestiert, sowohl Mädchen als auch Jungen betrifft und einen schwereren Verlauf zeigt.

1.1.3 Common Variable Immunodeficiency (CVID)

1.1.3.1 Definition

Die CVID umfasst eine heterogene Gruppe von Patienten, welche eine defekte Akproduktion bei weitgehend intakter zellulärer Immunität aufweist. Betroffene zeigen eine gesteigerte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen der Schleimhäute, des Respirations- und des Gastrointestinaltraktes. Ursprünglich wurde die Bezeichnung „variable“ gewählt, um eine Gruppe nicht näher klassifizierbarer Hypogammaglobulinämien im Erwachsenenalter zu beschreiben und von der schwereren vererbaren Form, der XLA, zu unterscheiden [31]. Nach den Diagnosekriterien der European Society of Immunodeficiency (ESID) müssen für die Diagnose der CVID alle folgenden Kriterien erfüllt sein [32]:

- Patient/in mit einer Erniedrigung von IgG und IgM oder IgA um mindestens zwei Standardabweichungen unter den altersentsprechenden Mittelwert
- Beginn der Immundefizienz nach dem 2. Lebensjahr
- fehlende Isohämagglutinine und/oder fehlende Impfantwort
- Ausschluss einer sekundären Hypogammaglobulinämie (s.Tab. 2)

Malignome	Lymphom Multiples Myelom Chronisch lymphatische Leukämie
Proteinverlust	Renaler Eiweißverlust Enteraler Eiweißverlust
Infektionen	Zytomegalie-Virus Epstein-Barr-Virus
Medikamente	Phenytoin Gold Cyclophosphamid Penicillamine
Andere	Malnutrition Protrahierte Immunsuppression Radiatio

Tab. 2: Ursachen einer sekundären Hypogammaglobulinämie (mod. nach [33])

1.1.3.2 Epidemiologie

Die CVID ist die häufigste, klinisch relevante Immundefekterkrankung und tritt bei Frauen und Männern etwa gleich häufig auf. Die Inzidenzangaben variieren zwischen 1:10.000 und 1:66.000 [34,35]. Meist tritt die CVID ab dem Kindes- oder frühen Erwachsenenalter auf, kann sich aber in jedem Alter manifestieren. Cunningham-Rundles hat zwei Erkrankungsgipfel beschrieben: der erste zwischen dem fünften und zehnten Lebensjahr, der zweite zwischen dem zwanzigsten und vierzigsten Lebensjahr (s.Abb. 7) [36].

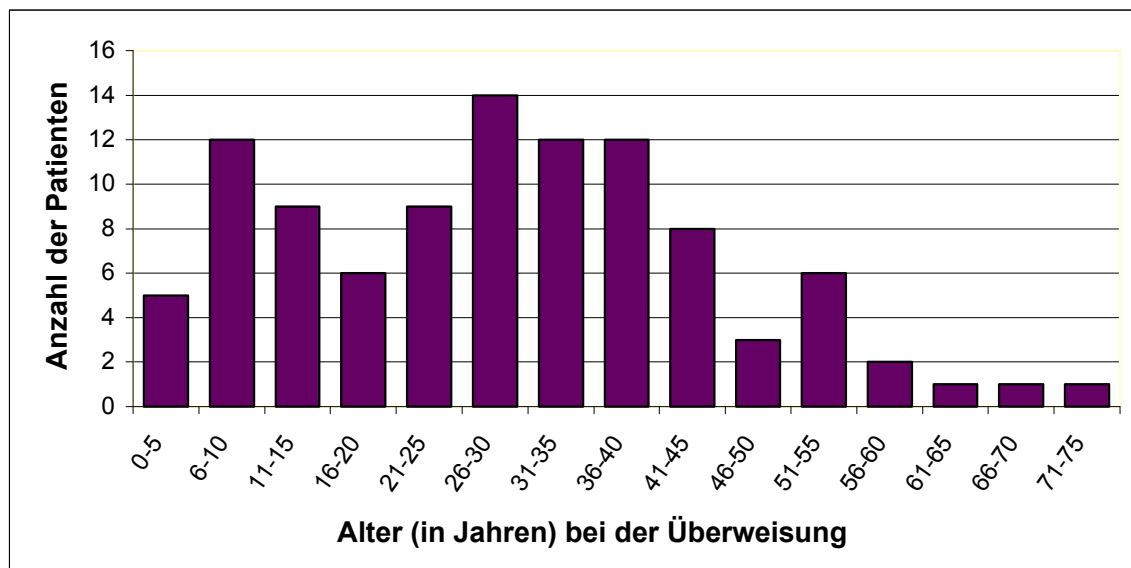


Abb. 7: Manifestationsalter der CVID mit zwei Erkrankungsgipfeln (mod. nach [36])

1.1.3.3 Ätiologie

Die Ursachen der CVID sind noch wenig verstanden. Es wird angenommen, dass Defekte sowohl in der Entwicklungskaskade der B-Zellen als auch auf Seiten der T-Zellen und APC zu einer Antikörperdefizienz führen [31]. Zudem ist noch weitgehend unklar, bei wie vielen Betroffenen die Erkrankung primär genetisch bedingt ist oder sekundär durch chronische Medikamenteneinnahme oder Infekte ausgelöst wurde. Eine retrospektive ätiologische Zuordnung zu Umwelteinflüssen, Medikamenten oder Infekten ist insbesondere schwierig, da die Diagnosestellung meist verzögert erfolgt, nämlich erst wenn es aufgrund der Hypogammaglobulinämie gehäuft zu Infekten kommt [37].

Als Ursache erscheinen Polymorphismen in Verbindung mit Umweltfaktoren sehr wahrscheinlich, da die Krankheit meist sporadisch auftritt – also nur ein Familienmitglied betrifft – und sich erst spät manifestiert [31]. Bei bis zu 25% der CVID-Patienten wird aber eine familiäre Häufung beobachtet, wobei autosomal-dominante und autosomal-rezessive Vererbungsmuster auftreten können [38,39]. Vorechovsky et al. führten 1995 ein Screening bei nahen Verwandten von CVID- und IgAD-Patienten durch und zeigten, dass eine genetische Verbindung zwischen diesen Immundefekten besteht, wobei die Elterngeneration vorwiegend von einer CVID und die nachfolgende Generation von einer selektiven IgA-Defizienz betroffen ist [40].

Mittels Genanalyse von Betroffenen konnten folgende molekulare Ursachen für eine CVID identifiziert werden:

- ICOS Defizienz
- CD19 Defizienz
- TACI Defizienz
- BAFF-R Defizienz

ICOS Defizienz

Das ICOS (inducible co-stimulator)-Molekül wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und ist strukturell sowie funktionell dem CD28 sehr ähnlich. Beide regulieren über kostimulatorische Signale T-Zell-Effektorfunktionen wie z.B. die Synthese von Zytokinen, die Proliferation von Zellen, Zell-Zell-Interaktionen und die T-Zell-abhängige Immunantwort [41]. Das CD28-Molekül führt zur Freisetzung von IL-2, welches für die Proliferation der B-Zellen im Keimzentrum sorgt und ICOS fördert die Synthese von IL-10, welches als Schlüsselzytokin während der Keimzentrumsreaktion eine wichtige Bedeutung hat, da es die Expansion der Memory-B-Zellen unterbricht und die Differenzierung zu Plasmazellen bewirkt [42]. Zudem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ICOS bei der Bildung von Keimzentren und beim Immunglobulin-Klassenwechsel eine bedeutende Rolle spielt [43].

Die ICOS Defizienz war der erste Gendefekt, welcher als Ursache einer CVID im Jahr 2003 identifiziert werden konnte. Eine Studie von Salzer et al. zeigte jedoch, dass nur etwa 5% der CVID-Patienten von dieser autosomal-rezessiven Form betroffen sind [44].

Ursächlich ist dabei eine homozygote Deletion im ICOS-Gen, welche zu einer selektiven Störung der Keimzentrumsreaktion mit schwerer Hypogammaglobulinämie, niedriger B-Zellzahl, fehlenden Memory-B-Zellen sowie fehlenden Plasmazellen im Knochenmark führt [45].

CD19 Defizienz

Das membranständige CD19-Protein wird schon früh während der B-Zellentwicklung im Knochenmark exprimiert und bleibt bis zum Stadium der Plasmazelle erhalten. Es bildet mit CD21, CD81 und CD225 einen Komplex und vermittelt zusammen mit dem BZR ein Signal, welches die Aktivierungsschwelle der B-Zelle für das Antigen herabsetzt [46].

Van Zelm et al. fanden in vier CVID-Patienten mit fehlenden oder deutlich erniedrigten CD19-Leveln eine homozygote Mutation im CD19-Gen. Weiters zeigten die Betroffenen erniedrigte CD27⁺-Memory-B-Zellen bei normaler Anzahl von reifen B-Zellen. Es wurde postuliert, dass der Verlust des CD19-Proteins in einer gestörten Signaltransduktion über den BZR resultiert, ohne hingegen die B-Zellentwicklung stark zu beeinträchtigen. Die Folgen der CD19 Defizienz sind ein schwaches Ansprechen auf antigene Stimuli und die Unfähigkeit eine effektive humorale Immunantwort auszubilden [47].

TACI Defizienz

Das TACI-Protein (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) gehört zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und wird von B-Lymphozyten während ihrer terminalen Reifung exprimiert [48]. Es unterstützt die B-Zellen beim Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE und bei der Differenzierung zu klassengewechselten Memory-B-Zellen (=Postswitch-Memory) und zu Plasmazellen. Zudem fördert TACI das Überleben dieser Zellen und verbessert die Affinität von Antikörpern während der somatischen Hypermutation der Ig-Gene [49].

Mutationen im TNFRSF13B-Gen, welches für das TACI-Protein kodiert, sind vermutlich nur in etwa 5% der CVID-Fälle krankheitsassoziiert und zeigen einen autosomal-rezessiven oder autosomal-dominanten Erbgang. Es konnten außerdem Mutationen bei Angehörigen von CVID-Patienten, die an einer IgA-Defizienz leiden, sowie bei Patienten mit isolierter IgAD nachgewiesen werden. Salzer et al. zeigten, dass häufig innerhalb einer Familie, trotz derselben Mutation, verschiedene Phänotypen auftreten, was darauf

hinweist, dass sich Mutationen im TACI-Protein in variabler Penetranz manifestieren und Umwelt- sowie epigenetische Faktoren zusätzlich zu dem prädisponierenden Gen als Auslöser der Erkrankung eine Rolle spielen [50,51].

BAFF-R Defizienz

Der BAFF-R (B-cell activating factor receptor) ist wie TACI ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und wird erst ab dem Stadium der transitionalen B-Zelle exprimiert [52]. Die Antigen-unabhängige B-Zellentwicklung im Knochenmark verläuft also trotz Rezeptormangel normal, während die peripheren B-Zellen in ihrer Zahl vermindert sind. Gleichzeitig zeigt sich eine relative Zunahme der transitionalen B-Zellen, da die BAFF-R-Signale für die Differenzierung zu reifen, folliculären B-Zellen notwendig sind. Ein Fehlen führt also zu einem Verharren der B-Zellen im transitionalen Stadium [53].

Eine homozygote Deletion im BAFF-R-Gen, dem TNFRSF13C-Gen, präsentiert sich mit niedrigen IgG- und IgM-Spiegeln bei normaler IgA-Konzentration. Weltweit konnte erst bei zwei Geschwistern, deren Eltern blutsverwandt sind, dieser Rezeptormangel festgestellt werden. Obwohl bei beiden eine fehlende T-Zell-unabhängige Immunantwort gegen Pneumokokken-Zellwand-Polysaccharide nachweisbar war, litt nur eine Person an häufigen respiratorischen Infekten. Es ist also anzunehmen, dass die BAFF-R Defizienz zu einem charakteristischen Phänotyp führt, aber nicht unbedingt eine klinisch manifeste Immundefizienz zur Folge hat [53].

1.1.3.4 Klinische Präsentation

Leitsymptome einer CVID sind rezidivierende Infektionen der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes, Autoimmunkrankheiten, Lymphome und andere Malignome. 10% der Patienten sind trotz deutlich erniedrigten Ig-Spiegeln frei von wiederkehrenden, persistierenden, atypischen oder schweren Infektionen und werden mit Autoimmunphänomenen, sarkoid-ähnlichem Krankheitsbild oder Minorinfektionen vorstellig [31,54].

Akute Infektionen des Respirationstraktes

Patienten mit einem Antikörpermangelsyndrom leiden häufig an rekurrenden bakteriellen Infekten der Atemwege, vor allem an Bronchitiden, Sinusitiden und/oder

Otitiden [55]. Die Erreger sind meist kapseltragende Bakterien, wie Streptokokkus pneumoniae und Haemophilus influenzae. Nur in seltenen Fällen treten Infektionen mit Mykobakterien, Pneumocystis carinii oder Pilzen auf [56].

Chronische Lungenerkrankungen

Werden Patienten mit einer COVID nicht rechtzeitig diagnostiziert und somit auch nicht behandelt, können rezidivierende pulmonale Infekte zu irreversibler Schädigung der Lunge mit Ausbildung von Bronchiektasien und Entwicklung einer obstruktiven Lungenerkrankung führen [56]. Seltener entstehen eine lymphozytäre interstitielle Pneumonie, restriktive oder granulomatöse Lungenerkrankungen, die mit einer schlechteren Prognose sowie einer höheren Rate an lymphoproliferativen Erkrankungen assoziiert sind [57–59].

Gastrointestinale Erkrankungen

Die Prävalenz für inflammatorische wie auch für infektiöse Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ist bei Patienten mit einer COVID erhöht. Etwa 30% leiden an einer chronischen Diarrhoe, wobei davon 10% eine schwerere Gastroenteropathie mit Malabsorption und Gewichtsverlust entwickeln [60]. Es können außerdem fibrotische Strikturen des Ileums, noduläre lymphatische Hyperplasien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Sprue-ähnliche Symptome und Giardiasis auftreten [60,61]. Zudem sind annähernd 10% der COVID-Patienten aufgrund einer Hepatitis-Virusinfektion, einer primären biliären Zirrhose oder einer granulomatösen Veränderung von einer signifikanten Leberfunktionsstörung betroffen [62].

Autoimmunerkrankheiten

Bei 10% der Betroffenen sind, bei Diagnosestellung oder im Verlauf der Erkrankung, Autoimmunphänomene vorhanden, wobei es sich vorwiegend um Immunthrombozytopenien, autoimmune Neutropenien und autoimmunhämolytische Anämien handelt [60]. Eine Behandlung dieser Krankheiten ist mit hochdosierten intravenösen Ig (IVIg) und kurzzeitiger Steroidgabe meist erfolgreich [62]. Immunsuppressiva sollten jedoch bei COVID-Patienten nur mit Vorsicht verabreicht werden [55].

Lymphome und Malignome

Bei Patienten mit einer CVID wird ein erhöhtes Auftreten maligner Tumore beobachtet. Eine Studie von Mellekjær et al. konnte zeigen, dass das Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln für CVID-Patienten um das 10-fache erhöht ist und dass Non-Hodgkin-Lymphome im Vergleich zu gesunden Personen 12-mal häufiger auftreten. Das allgemeine Malignomrisiko war nur wenig, um das 1,8-fache, angestiegen [63]. Daneben können auch benigne Veränderungen auftreten, wie z.B. noduläre lymphatische Hyperplasien, Splenomegalie oder generalisierte Lymphadenopathie [56].

1.1.3.5 Diagnostik

Anamnese und klinischer Befund bilden die Hauptpfeiler der Diagnosestellung. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen kann sich durch eines der Warnzeichen in Tabelle 3 bemerkbar machen. Bereits bei einem positiven Warnzeichen sollte eine weiterführende Diagnostik zum Ausschluss eines Immundefektes erfolgen.

Vier oder mehr Infektionen in einem Jahr, die eine antibiotische Behandlung benötigen (z.B. Otitis, Bronchitis, Sinusitis, Pneumonie)
Rekurrierende Infekte oder Infektionen die eine lange Therapie mit Antibiotika erfordern
Zwei oder mehr schwere bakterielle Infektionen (z.B. Osteomyelitis, Meningitis, Septikämie, Zellulitis)
Zwei oder mehr radiologisch nachgewiesene Pneumonien innerhalb von drei Jahren
Infektionen mit ungewöhnlicher Lokalisation oder ungewöhnlichem Erreger
Vorliegen eines Immundefektes in der Familie

Tab. 3: ESID Warnzeichen für primäre Immundefekte bei Erwachsenen (mod. nach [32])

Besteht der Verdacht auf eine CVID, werden die **Immunglobuline** und deren Subklassen bestimmt. Dabei muss beachtet werden, dass für Kinder andere Normwerte als für Erwachsene gelten und dass bei Erwachsenen geschlechtsspezifische Unterschiede für das IgM bestehen [31].

Weiters werden die **Isohämagglutinine** bestimmt, die bereits im Alter von einem Jahr zu 70% positiv sind, und die **spezifischen Antikörper** nach Immunisierung mit Protein

(Tetanus, Diphtherie)- und Polysaccharid-Antigenen (Pneumokokken, Haemophilus-Influenzae-Typ B) oder nach dokumentierter Infektion gemessen [62].

Die **FACS** (Fluorescence-activated cell sorting)-**Durchflusszytometrie** findet in der Diagnostik Anwendung, um die Zahl der peripheren B-Zellen zu bestimmen und um eine Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen durchzuführen, welche für eine Klassifikation der Erkrankung notwendig ist [62].

Da die CVID eine Ausschlussdiagnose ist, müssen zuletzt andere Erkrankungen als Ursache einer Hypogammaglobulinämie abgeklärt werden. Tabelle 4 zeigt in Abhängigkeit vom Alter mögliche Differentialdiagnosen bei Patienten mit erhöhter Infektanfälligkeit [31].

< 4 Jahre	leichte Ausprägung eines schweren kombinierten Immundefekts Transiente Hypogammaglobulinämie des Kindesalters X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung X-linked Agammaglobulinämie Hyper-IgM Syndrom Myelodysplastisches Syndrom Wiskott-Aldrich-Syndrom Seltene kombinierte Immundefekte Zystische Fibrose HIV
5 – 55 Jahre	Eiweißverlust über die Niere/den Darm Medikamenten-Nebenwirkung (Antikonvulsiva, Antirheumatika)
> 56 Jahre	Thymom Lymphom Medikamenten-Nebenwirkung Eiweißverlust über die Niere/den Darm

Tab. 4: Differentialdiagnosen bei Patienten mit häufigen bakteriellen Infekten, nach Altersgruppen aufgeteilt (mod. nach [31])

Nach Diagnosestellung werden zusätzlich eine Milzsonographie zum Ausschluss einer Splenomegalie und eine Lungenfunktionsprüfung sowie ein Thorax-HRCT zum Staging struktureller Lungenveränderungen und zum Ausschluss eines Thymoms empfohlen. Röntgen-Thorax-Untersuchungen sollten weiters im Verlauf erfolgen sowie regelmäßige Gastroskopien zur Malignom-Vorsorge und Lambliendiagnostik [64].

1.1.3.6 Klassifikation

In den letzten Jahren gewann die Durchflusszytometrie in der Klassifikation der CVID zunehmend an Bedeutung. Es entstanden auf der Basis der Analyse der verschiedenen B-Zellsubpopulationen drei Klassifikationsschemata: die Freiburg-Klassifikation, die Paris-Klassifikation und die EUROclass-Klassifikation.

Freiburg-Klassifikation (2002) [65]

Bei der von Warnatz et al. konzipierten Klassifikation werden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt (s.Abb. 8): Patienten der Gruppe I weisen eine Erniedrigung der Postswitch (Ps)-Memory B-Zellen ($CD27^+IgM^-IgD^-$) auf unter 0,4% der Lymphozyten auf, während die Patienten der Gruppe II eine nahezu normale Anzahl haben. Die Gruppe I wird in Abhängigkeit von der $CD21^{low}$ B-Zell-Population weiter in Gruppe Ia ($>20\%$ der B-Zellen) und Ib ($<20\%$) unterteilt.

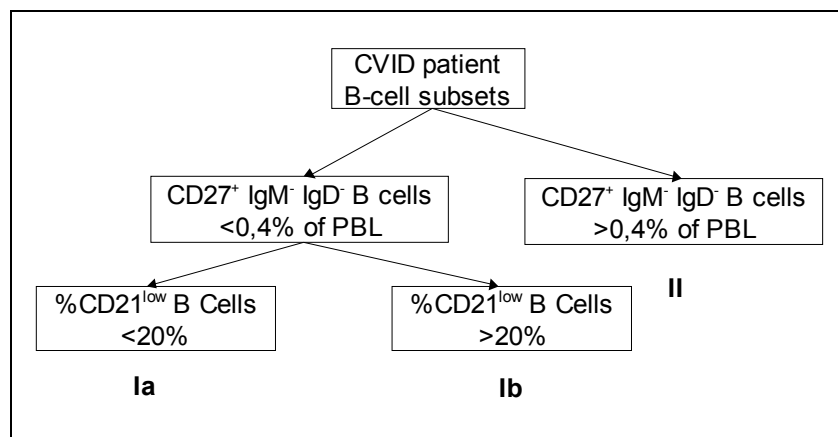


Abb. 8: Freiburg-Klassifikation (mod. nach [65,66])

PBL = Lymphozyten des peripheren Blutes

Paris-Klassifikation (2003) [67]

Die Einteilung nach dem Schema von Piqueras et al. (s.Abb. 9) erfolgt in drei Gruppen: MB2 mit normalen Gedächtnis-B-Zellen, MB1 mit erniedrigten Ps-Memory ($IgD^-CD27^+ \leq 8\%$ der B-Zellen) und normalen IgM-Gedächtnis-B-Zellen ($CD27^+ > 11\%$ der B-Zellen) und MB0 mit einer Reduktion aller Gedächtnis-B-Zellen ($CD27^+ \leq 11\%$ der B-Zellen).

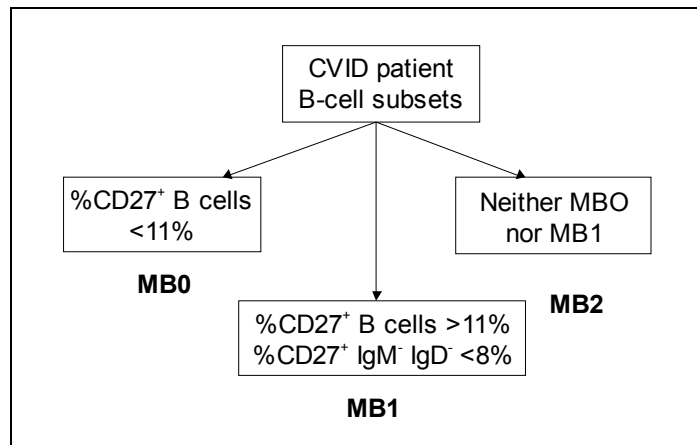


Abb. 9: Paris-Klassifikation (mod. nach [66,67])

EUROclass-Klassifikation (2008) [68]

Die EUROclass-Klassifikation entwickelte sich im Rahmen einer europäischen Studie als Konsensus aus der Freiburger und Pariser Klassifikation. Primär werden die Patienten mit einer schweren B-Zell-Defizienz (B⁻) von jenen mit B-Zellen über 1% (B⁺) abgegrenzt. Die Gruppe „B⁺“ wird zuerst in smB⁻ (<2% Ps-Memory B-Zellen) und smB⁺ (>2%) unterteilt und weiter anhand der CD21^{low} B-Zell-Population differenziert. Bei der Gruppe smB⁻ können zudem smB⁻Tr^{hi} (≥9% transitionale B-Zellen) und smB⁻Tr^{low} (<9%) unterschieden werden (s.Abb. 10).

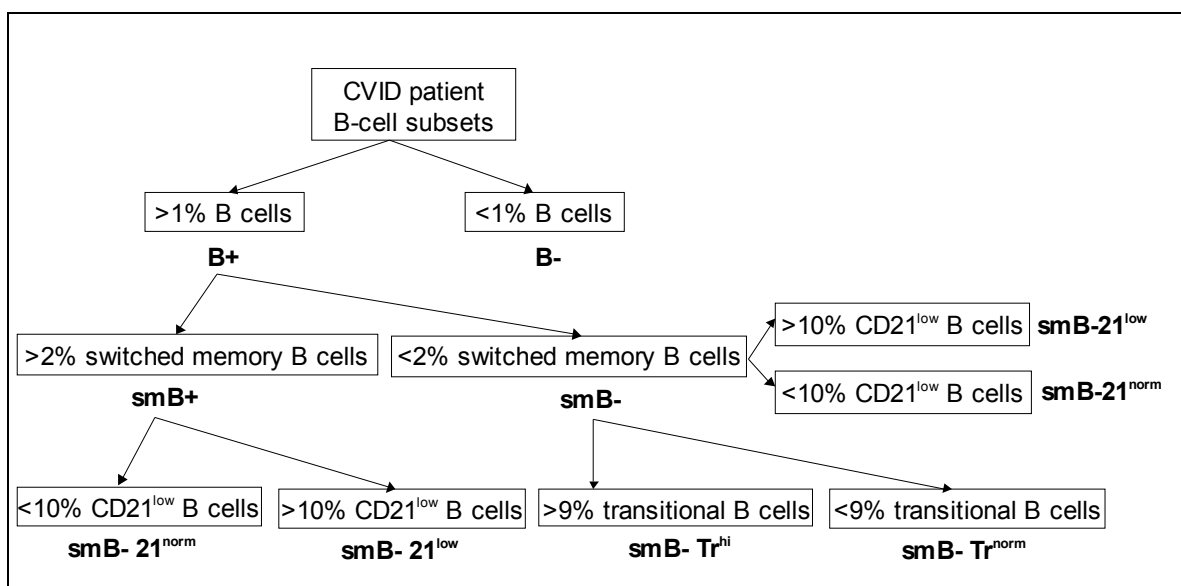


Abb. 10: EUROclass-Klassifikation (mod. nach [66,68])

1.1.3.7 Therapie

Die heute allgemein etablierte Therapie der CVID beinhaltet eine regelmäßige Immunglobulinsubstitution sowie eine konsequente und resistenzgerechte antibiotische Therapie bei bakteriellen Infekten [33]. Bereits seit über 30 Jahren ist dies die Standardtherapie, wobei die anfänglich intramuskuläre Verabreichung durch eine sichere intravenöse (IVIg) und schnelle subkutane (SCIg) Gabe ersetzt wurde. Das Ziel sind IgG-Talspiegel, die normale Werte erreichen (7- 16 g/l), wodurch eine signifikante Reduktion der bakteriellen Entzündungen und eine Prävention von schweren, lebensbedrohlichen Infektionen bewirkt wird [31]. Dazu sind IVIg in einer Dosis von 300-400 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle drei bis vier Wochen notwendig [64]. Nebenwirkungen der IVIg wie Kopfschmerzen, Nausea, Schüttelfrost oder Hautausschläge sind relativ häufig, können aber meist durch eine langsame Infusionsgeschwindigkeit oder eine Prämedikation mit Kortikosteroiden gelindert werden [69].

1.1.4 Selektive IgA-Defizienz

1.1.4.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

Nach den Diagnosekriterien der ESID müssen für die Diagnose einer selektiven IgA-Defizienz alle folgenden Kriterien erfüllt sein [32]:

- Patient/in mit einem Serum-IgA-Spiegel unter 7mg/dL bei normalem IgG und IgM
- Beginn nach dem 4. Lebensjahr
- normale IgG-Produktion nach Immunisierung
- Ausschluss einer sekundären Hypogammaglobulinämie (s.Tab. 2)

Die selektive IgA-Defizienz ist der häufigste Immundefekt in der kaukasischen Bevölkerung und betrifft etwa 1 von 600 Personen [70]. Die Inzidenzzahlen variieren jedoch weltweit in Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft sehr stark – zwischen 1:143 auf der Arabischen Halbinsel und 1:18.500 in Japan [71,72].

Die klinische Ausprägung der selektiven IgA-Defizienz ist sehr variabel, wobei die Mehrheit der Betroffenen asymptomatisch ist und keine Therapie benötigt. Nur wenige neigen zu rezidivierenden Infektionen der Atemwege, gastrointestinalen Störungen, Allergien, Autoimmunkrankheiten und Malignomen. IgG-Subklassendefekte können assoziiert auftreten (insbesondere IgG2 und IgG4) und führen häufiger zu schweren Infektionen und Komplikationen [73].

1.1.4.2 Therapie und Prognose

Beim selektiven IgA-Defekt ist eine Substitutionstherapie nicht indiziert, da die Betroffenen gegen zugeführtes IgA Antikörper bilden können, welche zu schweren anaphylaktischen Reaktionen führen können [64]. Die Therapie beschränkt sich auf die Behandlung der assoziierten Erkrankungen. Bei Patienten mit rekurrierenden Infektionen kann eine kontinuierliche oder saisonal intermittierende antibiotische Prophylaxe in Betracht gezogen werden [73].

Die Prognose von Patienten mit einer IgA-Defizienz ist ohne schwere Begleiterkrankungen gut. Bei Kindern kommt es sogar häufig zum Ausheilen der Erkrankung. Da eine IgA-Defizienz allerdings in eine CVID übergehen kann, ist eine regelmäßige Kontrolle der klinischen Beschwerden wie auch der immunologischen Parameter notwendig [73].

1.1.5 IgG-Subklassendefekt

1.1.5.1 Definition und Epidemiologie

Nach den Diagnosekriterien der ESID müssen für die Diagnose eines IgG-Subklassendefekts alle folgenden Kriterien erfüllt sein [32]:

- Patient/in mit rekurrierenden/schweren Infektionen
- Beginn nach dem 7. Lebensjahr
- Erniedrigung der Serumkonzentration von mindestens zwei Subklassen (IgG₁₋₃) unter die 5. Altersperzentile bei normalem IgM und IgA
- unzureichende Immunantwort auf einige Impfungen

Für die IgG-Subklassendefekte werden Unterschiede in der Prävalenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen beschrieben: Die Häufigkeit von heterozygoten Deletionen in den Genen, welche die konstanten Regionen der Subklassen kodieren, reichen von 1,5% bei der kaukasischen Bevölkerung bis 4% bei der schwarzen Bevölkerung. Eine homozygote Deletion, die zum kompletten Verlust einer IgG-Subklasse führt, ist hingegen mit 1:5.000 - 1:10.000 sehr viel seltener [74].

1.1.5.2 Klinik und Therapie

Bei Erwachsenen kommt am häufigsten ein Mangel des IgG3 vor, während bei Kindern vorwiegend IgG2 vermindert ist [75]. Ein Mangel an IgG2 zeigt sich typischerweise mit rezidivierenden Infektionen durch bekapselte Bakterien wie *Hämophilus influenzae* und *Streptokokkus pneumoniae*. Zudem fehlt eine Antikörperbildung nach Immunisierung mit unkonjugierten Polysaccharid-Antigenen. Bei einem IgG1-Defekt bleibt hingegen die Antwort auf konjugierte Polysaccharid-Impfstoffe aus [76]. Es werden in der Literatur aber auch gesunde, asymptomatische Individuen mit IgG-Subklassendefekten beschrieben [77].

Manchmal kann Patienten mit signifikantem Antikörpermangel eine antibiotische Therapie in prophylaktischer Dosierung helfen. Bleiben trotzdem schwere Symptome bestehen, ist eine Substitutionstherapie indiziert [62].

2 Fragestellung

Obwohl für CVID und IgAD – aufgrund der familiären Häufung – ein gemeinsamer genetischer Defekt angenommen wird, zählt die Bestimmung der B-Lymphozyten-Subpopulationen lediglich bei der Diagnostik der CVID zu den Routineuntersuchungen. Bei der IgAD wie auch bei den übrigen selektiven Immundefekten findet die FACS-Analyse hingegen kaum Anwendung, weshalb es nur wenige Daten zur Verteilung der B-Zellpopulationen bei diesen Krankheitsbildern gibt. Zudem haben sich kaum Studien mit der Frage beschäftigt, ob die verschiedenen humoralen Immundefekte eine unterschiedliche Anzahl und Frequenz der einzelnen B-Zellsubpopulationen aufweisen.

In dieser Arbeit wird auf folgende Fragen eingegangen:

1. Zeigen sich in der Häufigkeit der einzelnen B-Zellsubpopulationen signifikante Unterschiede zwischen CVID-Patienten, Patienten mit selektiven Immundefekten und gesunden Probanden?

Neben der Differenzierung der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen war es mittels der sog. hochsensitiven FACS-Analyse möglich, das Expressionsverhalten der Oberflächenmarker CD38, CD80 und CD95 auf den verschiedenen Populationen zu untersuchen.

2. Unterscheiden sich die B-Zellsubpopulationen von CVID-Patienten, Patienten mit selektiven Immundefekten und gesunden Probanden in der Expression von CD38, CD80 und CD95?

Weiters wurden die Patienten mit einer CVID nach dem Pariser Schema klassifiziert und die drei Gruppen (MB0 – MB2) miteinander sowie mit der Kontrollgruppe verglichen.

3. Gibt es zwischen den einzelnen Gruppen der Paris-Klassifikation Unterschiede in der Verteilung der B-Zellsubpopulationen und in der Expression von CD38, CD80 und CD95?

Außerdem wurden die Patienten mit selektiven Immundefekten in drei Untergruppen unterteilt (selektive IgA-Defizienz, IgG-Subklassendefekt und selektiver IgM-Mangel).

4. Gibt es zwischen den einzelnen Patientengruppen Unterschiede in der Häufigkeit der B-Zellsubpopulationen und in der Expression von CD38, CD80 und CD95?

Zusammengefasst war das Ziel dieser Arbeit, mehr über die Häufigkeit der einzelnen B-Zellsubpopulationen bei humoralen Immundefekten zu erfahren, insbesondere über die Unterschiede zwischen der Verteilung bei CVID und selektiven Immundefekten.

3 Probanden und Methoden

3.1 Probanden

3.1.1 Einwilligungserklärung/Ethikkommission

Die Studie erfolgte mit Zustimmung der Ethik-Kommission der Medizinischen Universität Graz. Alle Studienteilnehmer erhielten eine Patienten- bzw. Probandeninformation und wurden mündlich über die Studie und mögliche Risiken aufgeklärt. Die Einverständniserklärung wurde schriftlich erteilt.

3.1.2 Patientenkollektiv

Die Datenerhebung erfolgte an der Abteilung für Rheumatologie und Immunologie des Universitätsklinikums Graz. Es wurden Patienten mit der Diagnose eines Immundefekts ausgewählt, von denen bereits eine B-Zellsubtypisierung vorhanden war.

Als nächster Schritt wurden in der Patientendatenbank „Medocs“ folgende Daten erhoben:

- Patientendaten (Alter, Geschlecht, Diagnose)
- Erste klinische Symptome (schwere/rezidivierende Infektionen) *
- Alter zum Diagnosezeitpunkt *
- Autoimmunkrankheiten/ granulomatöse Erkrankungen *
- Immunglobuline und Ig-Subklassen
- Therapie

Die mit Stern * versehenen Variablen konnten aufgrund von unvollständigen Daten nicht ausgewertet werden.

Diagnosegruppen

Die insgesamt 43 Patienten wurden zur statistischen Auswertung zwei Diagnosegruppen zugeordnet, die jeweils drei Untergruppen bildeten:

Gruppe 1: Patienten mit einer CVID, n=24

Gruppe 1a: Erniedrigung aller drei Ig-Klassen, n=13

Gruppe 1b: IgG und IgA erniedrigt, n=8

Gruppe 1c: IgG und IgM erniedrigt, n=3

Gruppe 2: Patienten mit einem selektiven Immundefekt (sID), n=19

Gruppe 2a: IgG-Subklassendefekt, n=14

Gruppe 2b: Selektive IgA-Defizienz, n=3

Gruppe 2c: Selektiver IgM-Mangel, n=2

Die Patienten der Gruppe 1, jene mit einer CVID, wurden zudem nach dem Schema der Paris-Klassifikation den Gruppen MB0 (n=8), MB1 (n=8) und MB2 (n=8) zugeteilt.

3.1.3 Kontrollgruppe

Da es für die untersuchten B-Zellsubpopulationen keine Referenzbereiche gibt, wurde an der Abteilung für Rheumatologie der Medizinischen Universität Graz eine Studie zur Bestimmung von immunologischen Referenzwerten bei gesunden Probanden durchgeführt. Die meisten Proben wurden dabei von Gregor Gradwohl im Rahmen seiner Diplomarbeit gesammelt. Zum Zeitpunkt meiner Auswertungen konnten 54 Personen für die Studie gewonnen werden.

3.2 Methoden

3.2.1 B-Zellsubtypisierung durch hochsensitive FACS-Analyse

Die Technik der Durchflusszytometrie basiert auf der Analyse von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen, die entstehen wenn Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen

fokussierten Laserstrahl passieren. Das Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) ist dabei ein Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) ein Maß für die Granularität der Zellen. Durch Auftragung des Streulichts auf ein Dot-Plot lassen sich die wichtigsten Untergruppen der Leukozyten unterscheiden (s. Abb. 11) [23].

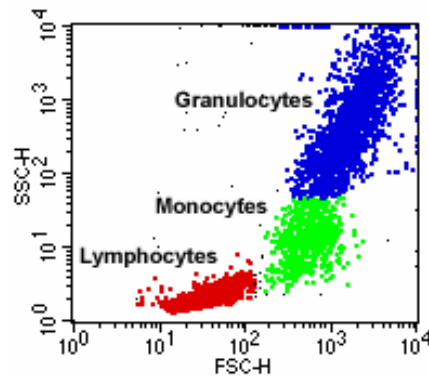


Abb. 11: Auftrennung von Blutzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) in einer Dot-Blot-Analyse [78]

Die Klassifizierung weiterer Untergruppen, wie z.B. die Einteilung der Lymphozyten in B-Zellen und T-Zellen oder die Subtypisierung von B-Zellen, erfolgt über die Analyse der Expression von bestimmten CD-Antigenen. Dazu müssen die Zellen mit fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern gefärbt werden. Eine Mehrfarbenanalyse ist durch die Verwendung von verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern möglich, wobei jeder Farbstoff einen eigenen Detektor benötigt [79].

Die B-Zellsubtypisierungen dieser Arbeit wurden mit einem BD Canto II Zytometer (Software FACSDiva) durchgeführt. Nach Isolierung der peripheren mononukleären Zellen des Blutes (Lymphozyten und Monozyten) erfolgte die Färbung mit den in Tabelle 5 aufgelisteten monoklonalen Antikörpern.

Eine weitere Einteilung der B-Zellsubpopulationen IgD-Memory, Ps-Memory, Naive und Doppelnegative berücksichtigte die Expression von CD38/CD80 sowie von CD38/CD95. Zudem wurde bei den Ps-Memory B-Zellen und bei den Plasmablasten eine Untergruppe mit hoher CD38 Expression bestimmt.

Antikörper	
CD45	Selektion der Leukozyten
CD3 und CD14	Depletion von T-Zellen und Monozyten
CD19	Selektion der B-Zellen
CD27 und IgD	Bestimmung der B-Zellsubpopulationen - IgD-Memory (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺) - Postswitch-Memory (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻) - Plasmablasten (CD19 ⁺ CD27 ⁺⁺ IgD ⁻) - Naive (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺) - Doppelnegative (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻)
CD 38 und CD24	Detektion der T1 B-Zellen (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺ CD38 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺)
CD 80 und CD95	

Tab. 5: Antikörper, die zur Bestimmung der B-Zellsubpopulationen verwendet wurden

3.2.2 Differentialblutbild und „Kleiner Lymphozytenstatus“

Zusätzlich zur FACS-Analyse werden ein Differentialblutbild, zur Bestimmung der Lymphozyten-Zellzahl, und ein „kleiner Lymphozytenstatus“, der mittels Vollblutfärbung die Anteile der NK-Zellen sowie der T- und B-Zellen ermittelt, durchgeführt.

3.2.3 Statistische Datenanalyse

Die statistische Analyse und Darstellung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms PASW Statistics 18.0 vorgenommen.

Als erster Schritt wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf ihr Verteilungsmuster untersucht. Da für die meisten B-Zellsubpopulationen keine Normalverteilung vorlag, kamen parameterfreie Testverfahren zur Anwendung: für zwei unabhängige Stichproben der Mann-Whitney-U-Test und für drei oder mehr unabhängige Stichproben der Kruskal-Wallis-Test.

Aufgrund der zahlreichen Analysen wurde das Signifikanzniveau (α) auf 0,1% festgelegt. Die signifikanten Ergebnisse werden wie folgt ausgedrückt: $p \leq 0,001$.

Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich bei den angegebenen Zahlen um Medianwerte.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

In der Tabelle 6 sind die Medianwerte der B-Zellsubpopulationen für die einzelnen Gruppen ersichtlich.

		Kontrolle	CVID	sID
Lymphozyten	#/µl	2.060	1.965	1.860
B-Zellen	#/µl	218	274	203
	#/500.000 Zellen	14.878	15.577	11.403
	% von LZ	3,0	3,1	2,3
Plasmablasten	% von BZ	0,6	0,1	0,5
CD38 ^{high} Plasmablasten	% von Pb	57,1	35,1	45,2
Postswitch-Memory	% von BZ	17,0	3,9	20,7
CD38 ^{high} Ps-Memory	% von PsM	2,0	0,9	1,0
CD38 ⁺ /CD80 ⁻	% von PsM	22,4	18,6	22,1
CD38 ⁺ /CD80 ⁺		20,4	14,2	12,1
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		22,7	33,9	36,4
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		27,8	30,7	24,7
CD38 ⁺ /CD95 ⁻	% von PsM	20,3	15,8	20,9
CD38 ⁺ /CD95 ⁺		24,5	13,5	13,0
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		24,1	32,2	34,5
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		28,4	30,1	26,8
Doppelnegative	% von BZ	4,3	4,1	4,4
CD38 ⁺ /CD80 ⁻	% von Dn	33,6	36,1	25,3
CD38 ⁺ /CD80 ⁺		14,2	6,8	9,8
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		31,4	41,8	36,9
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		17,4	10,1	13,2
CD38 ⁺ /CD95 ⁻	% von Dn	38,7	35,1	31,7
CD38 ⁺ /CD95 ⁺		9,5	6,8	5,9
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		31,9	44,1	46,4
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		16,3	13,1	13,7

IgD-Memory	% von BZ	15,1	10,9	21,6
CD38 ⁺ /CD80 ⁻	% von IgDM	27,4	22,5	24,9
CD38 ⁺ /CD80 ⁺		14,1	9,8	8,8
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		39,8	46,3	44,9
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		13,0	13,4	13,0
CD38 ⁺ /CD95 ⁻	% von IgDM	24,3	18,2	23,5
CD38 ⁺ /CD95 ⁺		17,9	15,9	11,9
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		39,6	41,2	50,7
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		14,6	20,9	13,6
Naive	% von BZ	62,3	77,0	51,0
CD38 ⁺ /CD80 ⁻	% von N	79,2	70,7	75,9
CD38 ⁺ /CD80 ⁺		0,9	1,0	0,7
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		18,9	28,0	21,1
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		0,8	1,2	0,9
CD38 ⁺ /CD95 ⁻	% von N	77,4	69,1	73,2
CD38 ⁺ /CD95 ⁺		2,5	2,0	1,3
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		18,2	28,8	22,9
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		1,0	1,0	1,4
T1 B-Zellen	% von BZ	1,1	1,6	0,9
	% von N	0,9	2,4	1,7
	#/500.000 Zellen	75	198	91

Tab. 6: Medianwerte der B-Zellsubpopulationen für die einzelnen Gruppen

LZ = Lymphozyten, BZ = B-Zellen, Pb = Plasmablasten, PsM = Postswitch-Memory, Dn = Doppelnegative, IgDM = IgD-Memory, N = Naive

Die Mittelwerte und Mediane für das Alter der einzelnen Gruppen wurden mit den entsprechenden Variationsbreiten (=Range) ermittelt. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 7 ersichtlich und in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

Gruppe	N _{ges} (N _{weibl})	Alter [Jahren]		
		Mittelwert	Median	Range
Kontrollgruppe	54 (32)	41	27	20-85
CVID	24 (12)	47	45	20-75
Selektiver Immundefekt	19 (15)	50	45	25-73

Tab. 7: Mittelwerte und Mediane des Alters für die einzelnen Gruppen

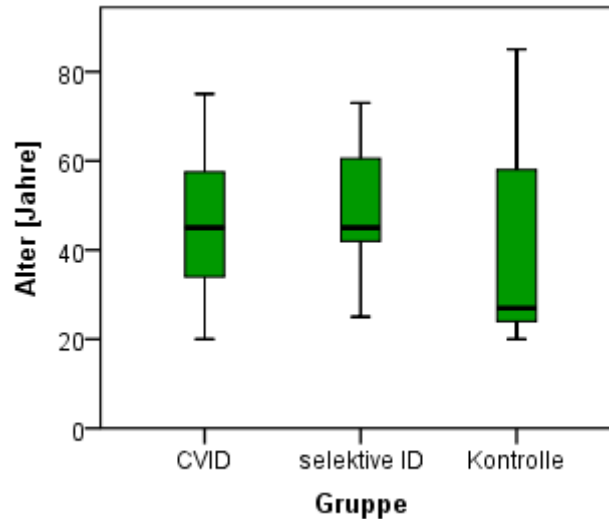


Abb. 12: Altersmediane der einzelnen Gruppen

4.2 Analytische Statistik

4.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die Daten wurden zuerst hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (CVID, sID, Kontrollgruppe) und Untergruppen (1a-c, 2a-c, MB0-2) mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht. Da kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Verteilung der B-Zellen gezeigt werden konnte, werden in der weiteren Auswertung Frauen und Männer zusammengefasst.

4.2.2 B-Zellsubpopulationen in den einzelnen Untergruppen

Die B-Zellsubpopulationen von Patienten der einzelnen Untergruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen:

Zwischen den **Untergruppen 1a-c** (CVID-Patienten) wie auch zwischen den **Untergruppen 2a-c** (selektive Immundefekte) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der B-Zellsubpopulationen. In der weiteren Arbeit werden diese Untergruppen deshalb nicht getrennt analysiert.

Der Vergleich von COVID-Patienten, aufgeteilt nach dem Pariser Schema in die **Gruppen MB0, MB1 und MB2**, ergab nur für die naiven B-Zellen ein signifikantes Ergebnis ($p=0,000^{**}$). Um weiter zu differenzieren, welche der Gruppen sich im Einzelnen signifikant unterscheiden, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgelistet und in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

Die Ps-Memory und die IgD-Memory B-Zellen wurden bei der Signifikanztestung nicht berücksichtigt, da die Paris-Klassifikation auf ihrer Verteilung beruht.

Kruskal-Wallis-Test, $p=0,000^{**}$	MB0	MB1	MB2
MB0			$p=0,000^{**}$
MB1	$p=0,003$		$p=0,000^{**}$
Kontrollgruppe	$p=0,000^{**}$	$p=0,002$	$p=0,087$

Tab. 8: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die naiven B-Zellen

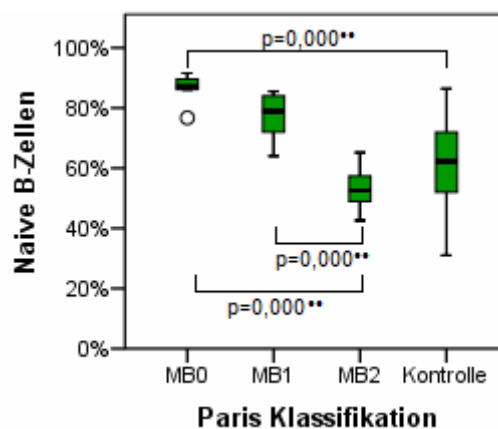


Abb. 13: Naive B-Zellen der Gruppen MB0, MB1 und MB2 im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.2.3 Lymphozyten und B-Zellen

Mittels Kruskal-Wallis Test konnte zwischen den einzelnen Gruppen und den Lymphozyten ($p=0,931$) bzw. den B-Zellen ($\#/ \mu\text{l}$: $p=0,550$; $\#/500.000$ Zellen: $p=0,290$) kein signifikanter Unterschied herausgestellt werden (s.Abb. 14).

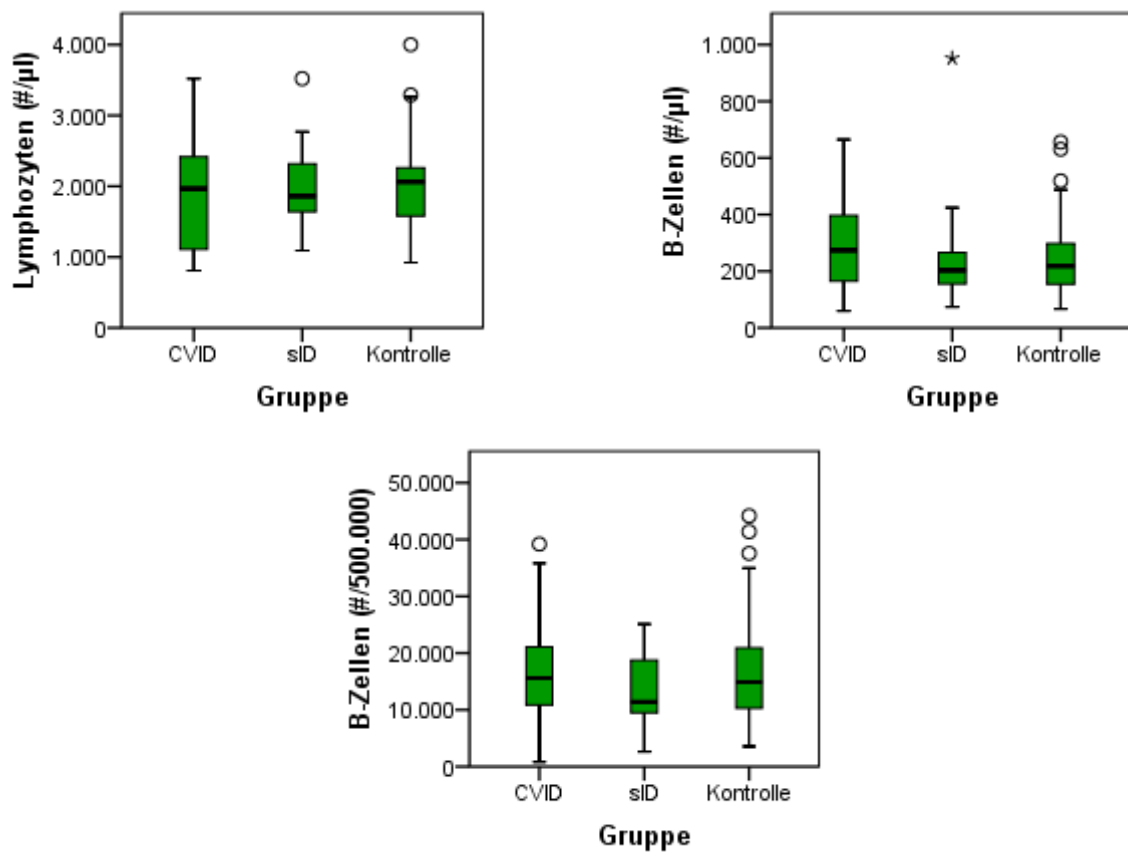


Abb. 14: Lymphozyten und B-Zellen

4.2.4 Plasmablasten

Für die Plasmablasten konnte mittels Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen berechnet werden (s.Abb. 14). Der durchgeführte Mann-Whitney-U-Test zur Differenzierung der ermittelten Signifikanz ist in Tabelle 9 ersichtlich. Die Analyse der CD38^{high} Plasmablasten mittels Kruskal-Wallis-Test ergab kein signifikantes Ergebnis ($p=0,055$) (s.Abb. 15).

Kruskal-Wallis-Test, $p= 0,000^{**}$	sID	CVID
Kontrollgruppe	$p=0,456$	$p=0,000^{**}$
CVID	$p=0,000^{**}$	

Tab. 9: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die Plasmablasten

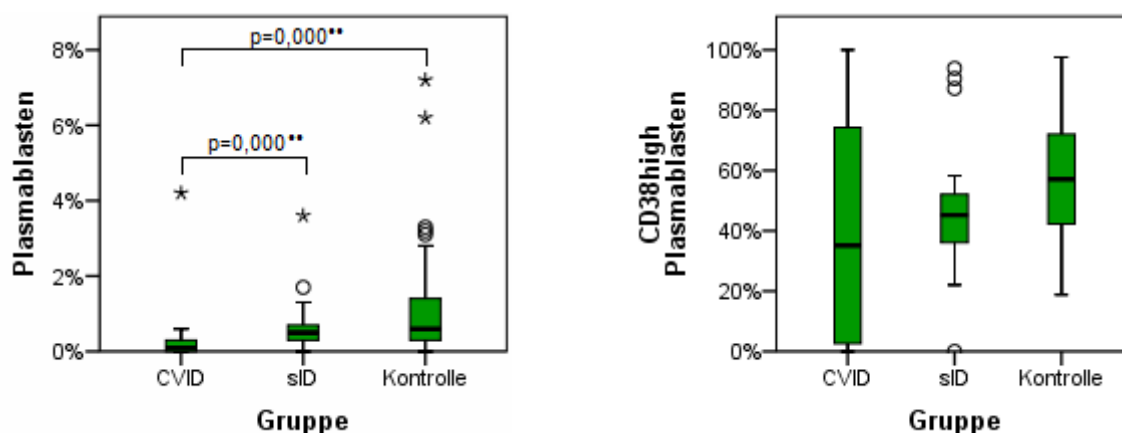


Abb. 15: Plasmablasten und CD38^{high} Plasmablasten

4.2.5 Postswitch-Memory B-Zellen

Die Analyse mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests ergab für die Ps-Memory B-Zellen einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,000^{**}$). Zudem konnte für die CD38⁺/CD80⁻ ($p=0,001^{**}$) sowie für die CD38⁻/CD80⁻-Subpopulation eine Signifikanz errechnet werden. Um weiter zu differenzieren, welche der Gruppen sich nun signifikant unterscheiden, wurde für jede Population ein Mann-Whitney-U-Test angewendet (s.Tab. 10, 11, 12) und ein Boxplot zur graphischen Darstellung erstellt (s.Abb. 16, 17, 18).

Kruskal-Wallis-Test, $p= 0,000^{**}$	sID	CVID
Kontrollgruppe	$p=0,193$	$p=0,000^{**}$
CVID	$p=0,000^{**}$	

Tab. 10: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die Ps-Memory B-Zellen

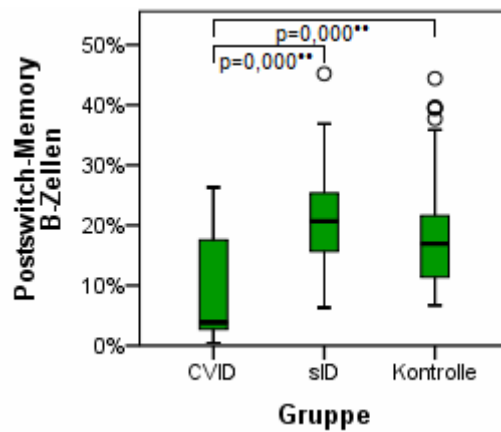


Abb. 16: Ps-Memory B-Zellen

Kruskal-Wallis-Test, p= 0,001**	sID	CVID
Kontrollgruppe	p=0,001**	p=0,006
CVID	p=0,448	

Tab. 11: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die CD38⁺/CD80⁺-Ps-Memory

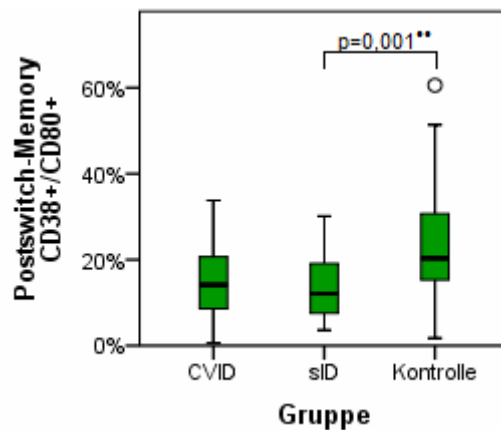


Abb. 17: CD38⁺/CD80⁺-Ps-Memory B-Zellen

Kruskal-Wallis-Test, p= 0,000**	sID	CVID
Kontrollgruppe	p=0,003	p=0,001**
CVID	p=0,608	

Tab. 12: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die CD38⁻/CD80⁻-Ps-Memory

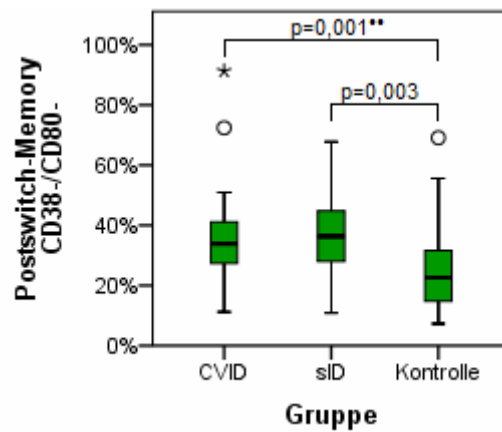


Abb. 18: CD38⁻/CD80⁻-Ps-Memory B-Zellen

Zudem konnte die Testung nach Mann und Whitney zeigen, dass die CD38⁺/CD95⁺-Ps-Memory B-Zellen bei Patienten mit selektiven Immundefekten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt sind (p=0,001**) (s.Abb. 19).

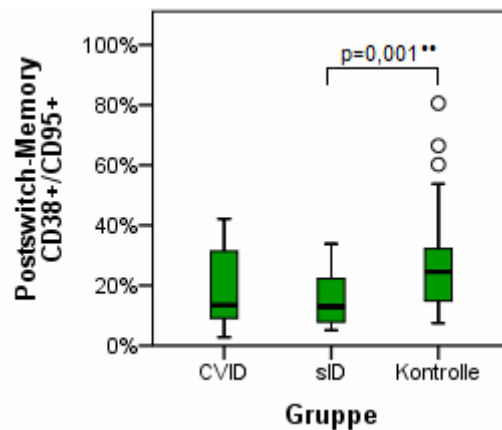


Abb. 19: CD38⁺/CD95⁺-Ps-Memory B-Zellen

Der Vergleich von CD38^{high} Ps-Memory und der restlichen Ps-Memory Subpopulationen (CD38⁺/80⁻, CD38⁻/80⁺, CD38⁺/95⁻, CD38⁻/95⁻, CD38⁻/95⁺) in den einzelnen Gruppen erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

4.2.6 Doppelnegative B-Zellen

Bei der Verteilung der doppelnegativen B-Zellen und ihren Subpopulationen wurde mittels Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt. Für die Populationen mit $CD38^+/CD80^+$ ($p=0,004$), $CD38^+/CD95^+$ ($p=0,004$) und $CD38^-/CD95^-$ -Expression ($p=0,004$) konnten lediglich p-Werte nahe dem Signifikanzniveau errechnet werden (s.Abb. 20).

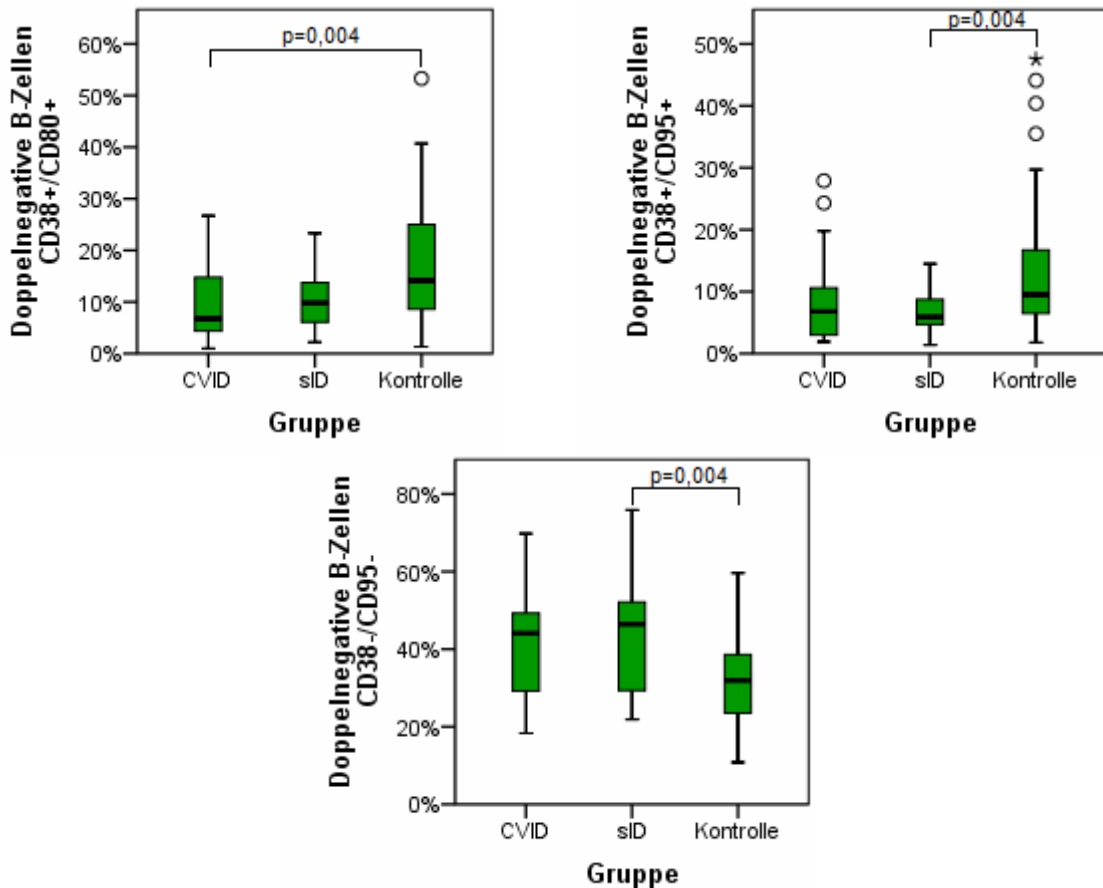


Abb. 20: $CD38^+/CD80^+$ -, $CD38^+/CD95^+$ - und $CD38^-/CD95^-$ -doppelnegative B-Zellen

4.2.7 IgD-Memory B-Zellen

Weder die IgD-Memory B-Zellen noch ihre Subpopulationen zeigten bei der Analyse nach Kruskal und Wallis einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Den niedrigsten p-Wert mit 0,013 wiesen die IgD-Memory Zellen beim Vergleich der Gruppen „CVID“ und „sID“ auf (s.Abb. 21).

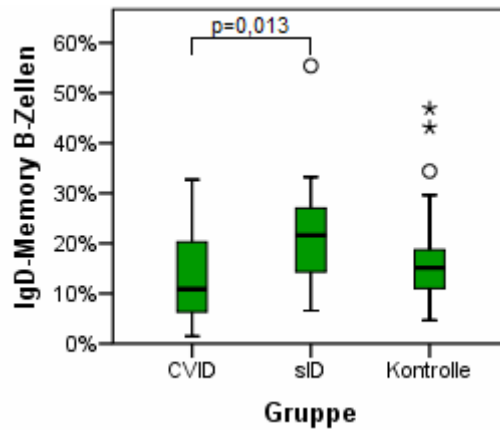


Abb. 21: IgD-Memory B-Zellen

4.2.8 Naive B-Zellen

Mittels Kruskal-Wallis-Test konnte für die naiven B-Zellen ein signifikanter Unterschied ($p=0,001^{**}$) zwischen den einzelnen Gruppen berechnet werden (s.Abb. 22). Zur weiteren Differenzierung, welche der Gruppen sich nun signifikant unterscheiden, kam ein Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung (s.Tab. 13).

Kruskal-Wallis-Test, $p=0,001^{**}$	sID	CVID
Kontrollgruppe	$p=0,066$	$p=0,003$
CVID	$p=0,001^{**}$	

Tab. 13: Signifikanztestung nach Mann und Whitney für die naiven B-Zellen

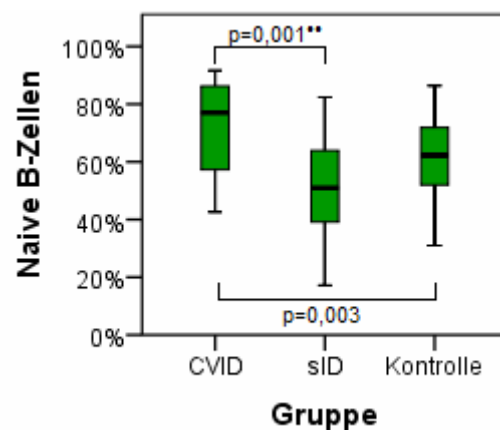


Abb. 22: Naive B-Zellen

Zudem ergab die Testung nach Mann und Whitney für die CD38⁺/CD95⁺ naiven B-Zellen ein signifikantes Ergebnis (p=0,001**) und für die CD38⁺/CD80⁻, die CD38⁻/CD80⁻ und die CD38⁻/CD95⁻ naiven B-Zellen p-Werte, die nahe am Signifikanzniveau liegen (s.Abb. 23).

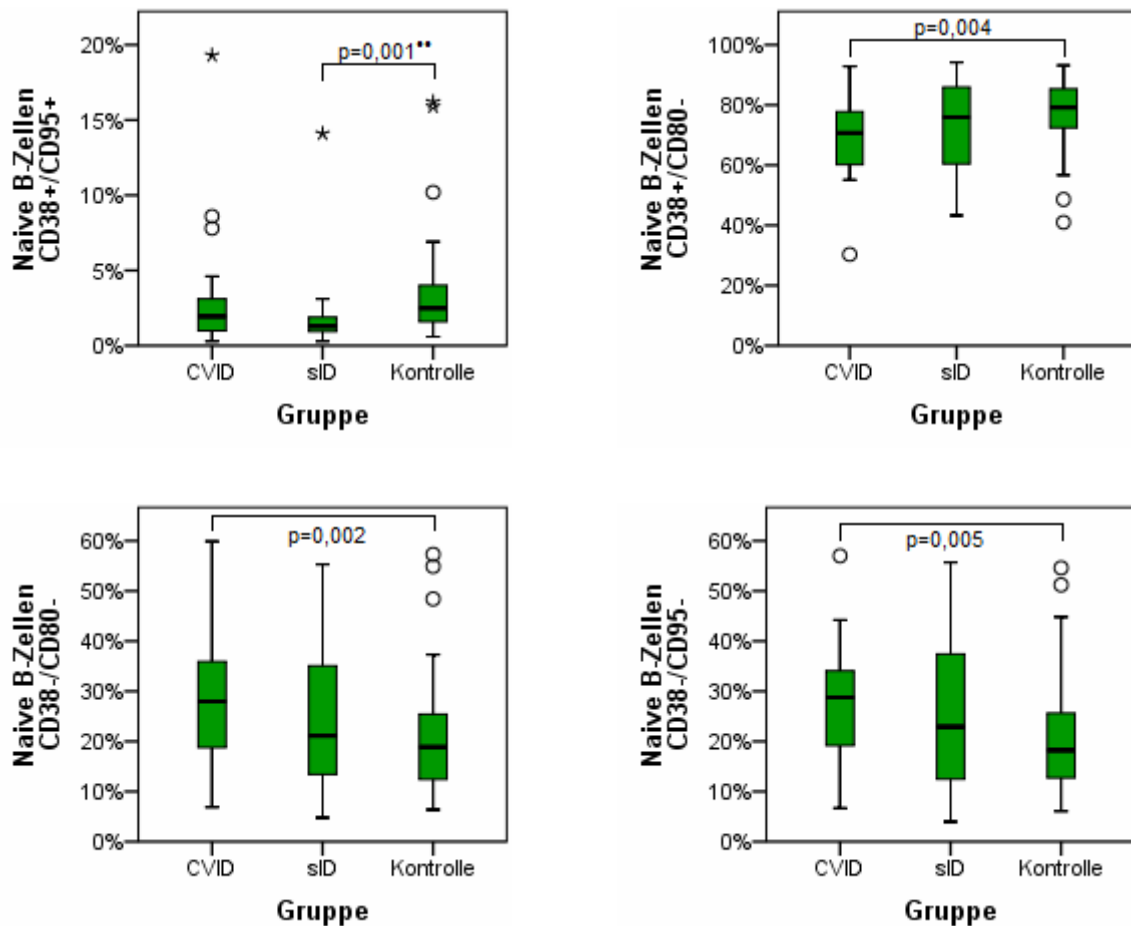


Abb. 23: CD38⁺/CD95⁺-, CD38⁺/CD80⁻-, CD38⁻/CD80⁻- und CD38⁻/CD95⁻ naive B-Zellen

4.2.9 T1 B-Zellen

Der Vergleich von T1 B-Zellen in den einzelnen Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test erbrachte keine Signifikanzen. Die Analyse der absoluten Zellzahl (p=0,005) und der T1-Zellen als prozentualer Anteil der naiven B-Zellen (p=0,004) ergab jedoch p-Werte nahe dem Signifikanzniveau (s.Abb. 24).

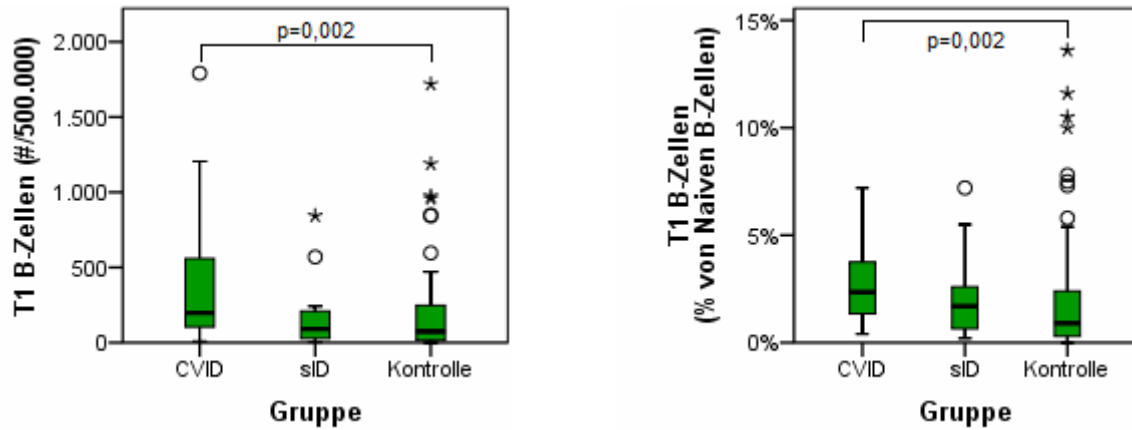


Abb. 24: T1 B-Zellen (#/500.000) und T1 B-Zellen (% von naiven B-Zellen)

4.3 Signifikante Ergebnisse im Überblick

P-Werte der durchgeführten statistischen Tests

		Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-U-Test		
			CVID - Kontrolle	sID - Kontrolle	CVID - sID
Lymphozyten	#/ μ l	0,931	0,696	0,995	0,826
B-Zellen	#/ μ l	0,550	0,325	0,825	0,359
	#/500.000 Zellen	0,290	0,676	0,174	0,149
	% von LZ	0,289	0,668	0,174	0,149
Plasmablasten	% von BZ	0,000**	0,000**	0,456	0,000**
CD38 ^{high} Plasmablasten	% von Pb	0,055	0,041	0,078	0,500
Postswitch-Memory	% von BZ	0,000**	0,000**	0,193	0,000**
CD38 ^{high} Ps-Memory	% von PsM	0,056	0,052	0,058	0,590
CD38 ⁺ /CD80 ⁻ CD38 ⁺ /CD80 ⁺ CD38 ⁻ /CD80 ⁻ CD38 ⁻ /CD80 ⁺	% von PsM	0,140	0,063	0,900	0,112
		0,001**	0,006	0,001**	0,448
		0,000**	0,001**	0,003	0,608
		0,742	0,681	0,589	0,463
CD38 ⁺ /CD95 ⁻ CD38 ⁺ /CD95 ⁺ CD38 ⁻ /CD95 ⁻ CD38 ⁻ /CD95 ⁺	% von PsM	0,102	0,062	0,646	0,061
		0,004	0,056	0,001**	0,420
		0,005	0,012	0,007	0,779
		0,819	0,579	0,893	0,852

Doppelnegative	% von BZ	0,824	0,914	0,567	0,590
CD38 ⁺ /CD80 ⁻		0,245	0,442	0,253	0,082
CD38 ⁺ /CD80 ⁺	% von Dn	0,006	0,004	0,052	0,178
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		0,007	0,006	0,024	0,922
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		0,051	0,019	0,749	0,074
CD38 ⁺ /CD95 ⁻		0,477	0,482	0,245	0,705
CD38 ⁺ /CD95 ⁺	% von Dn	0,004	0,016	0,004	0,941
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		0,003	0,011	0,004	0,525
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		0,394	0,198	0,735	0,310
IgD-Memory	% von BZ	0,020	0,248	0,021	0,013
CD38 ⁺ /CD80 ⁻		0,239	0,145	0,216	0,971
CD38 ⁺ /CD80 ⁺	% von IgDM	0,028	0,026	0,040	0,835
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		0,091	0,080	0,084	0,625
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		0,897	0,681	0,920	0,687
CD38 ⁺ /CD95 ⁻		0,107	0,035	0,413	0,353
CD38 ⁺ /CD95 ⁺	% von IgDM	0,068	0,185	0,028	0,385
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		0,087	0,299	0,031	0,293
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		0,165	0,100	0,605	0,099
Naive	% von BZ	0,001**	0,003	0,066	0,001**
CD38 ⁺ /CD80 ⁻		0,018	0,004	0,310	0,287
CD38 ⁺ /CD80 ⁺	% von N	0,308	0,461	0,120	0,624
CD38 ⁻ /CD80 ⁻		0,010	0,002	0,230	0,316
CD38 ⁻ /CD80 ⁺		0,411	0,204	0,481	0,624
CD38 ⁺ /CD95 ⁻		0,032	0,009	0,371	0,208
CD38 ⁺ /CD95 ⁺	% von N	0,004	0,070	0,001**	0,255
CD38 ⁻ /CD95 ⁻		0,023	0,005	0,220	0,633
CD38 ⁻ /CD95 ⁺		0,488	0,261	0,520	0,616
T1 B-Zellen	% von BZ	0,106	0,153	0,443	0,020
	% von N	0,004	0,002	0,106	0,112
	#/500.000 Zellen	0,005	0,002	0,673	0,020

Tab. 14: P-Werte der durchgeführten statistischen Tests

LZ = Lymphozyten, BZ = B-Zellen, Pb = Plasmablasten, PsM = Postswitch-Memory, Dn = Doppelnegative, IgDM = IgD-Memory, N = Naive

CVID – Kontrollgruppe

Es konnte gezeigt werden, dass CVID-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant

- erniedrigte Plasmablasten,

- erniedrigte Ps-Memory B-Zellen und
- erhöhte CD38⁻/CD80⁻-Ps-Memory B-Zellen aufweisen (s.Tab. 15).

Medianwerte	Plasmablasten	Ps-Memory B-Zellen	Ps Memory B-Zellen CD38 ⁻ /CD80 ⁻
CVID	0,1%	3,9%	33,9%
Kontrollgruppe	0,6%	17,0%	22,7%

Tab. 15: Vergleich der Medianwerte von CVID-Patienten und gesunden Probanden

Selektive Immundefekte – Kontrollgruppe

Patienten mit selektiven Immundefekten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte

- CD38⁺/CD80⁺- Ps-Memory B-Zellen,

- CD38⁺/CD95⁺- Ps-Memory B-Zellen und
- CD38⁺/CD95⁺ naive B-Zellen (s.Tab. 16).

Medianwerte	Ps-Memory B-Zellen CD38 ⁺ /CD80 ⁺	Ps-Memory B-Zellen CD38 ⁺ /CD95 ⁺	Naïve B-Zellen CD38 ⁺ /CD95 ⁺
sID	12,1 %	13,0%	1,3%
Kontrollgruppe	20,4%	24,5%	2,5%

Tab. 16: Vergleich der Medianwerte von sID-Patienten und gesunden Probanden

CVID – selektive Immundefekte

Bei der statistischen Auswertung wurden für die CVID-Patienten, verglichen mit der sID-Gruppe, signifikant

- erniedrigte Plasmablasten,

- erniedrigte Ps-Memory B-Zellen und
- erhöhte naive B-Zellen berechnet (s.Tab 17).

Medianwerte	Plasmablasten	Ps-Memory B-Zellen	Naive B-Zellen
CVID	0,1%	3,85%	77,0%
sID	0,5%	20,7%	51,0%

Tab. 17: Vergleich der Medianwerte von CVID- und sID-Patienten

Naive B-Zellen bei COVID-Patienten

Beim Vergleich der COVID-Patienten, die nach dem Pariser Schema klassifiziert wurden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der naiven B-Zellen. Der prozentuale Anteil war in der Gruppe MB0 sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zur Gruppe MB2 signifikant erhöht (s.Tab. 14).

Medianwerte	MB0	MB1	MB2	Kontrollgruppe
Naive B-Zellen	87,3%	79,0%	52,6%	62,3%

Tab. 18: Medianwerte der naiven B-Zellen für die Gruppen der Paris-Klassifikation und für die Kontrollgruppe

5 Diskussion

In den letzten Jahren haben sich viele Forschergruppen mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der B-Zellsubpopulationen im peripheren Blut von immundefizienten Menschen beschäftigt. Bei der Diagnose einer CVID zählt die Durchflusszytometrie inzwischen zu den Standardmethoden und ermöglicht einerseits den Ausschluss anderer Immundefekte (Agammaglobulinämie, X-chromosmale und autosomal-rezessive Hyper-IgM-Syndrome), andererseits eine Risikoabschätzung bzgl. Komplikationen (Splénomegalie, Lymphadenopathie und granulomatöse Erkrankungen) durch die Klassifizierung der Patienten [23]. Zudem hat diese Methode einen wichtigen Stellenwert in der klinischen CVID-Forschung um ein besseres Verständnis für die Pathogenese der Erkrankung zu erlangen. Bei selektiven Immundefekten findet die FACS-Analyse der B-Lymphozyten hingegen keine Anwendung in der Routinediagnostik, was vermutlich damit zusammenhängt, dass bei dieser Patientengruppe nur wenige Daten über die B-Zellsubpopulationen bekannt sind. Zudem gibt es kaum Studien, die die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Populationen bei selektiven Immundefekten und CVID verglichen haben.

Beim Vergleich der CVID-Patienten mit der Kontrollgruppe konnte eine drastisch reduzierte Anzahl von Ps-Memory B-Zellen festgestellt werden (3,9% vs. 17,0%; $p \leq 0,0001$), was auf eine Störung während der Keimzentrumsreaktion hindeutet [12]. Etliche Arbeiten haben bereits eine Erniedrigung dieser Population im peripheren Blut von CVID-Patienten beschrieben [65,68,80,81]. Wehr et al. sprechen sogar von der häufigsten Veränderung im Labor von CVID-Patienten und konnten zudem bei Patienten mit sehr niedrigen Ps-Memory B-Zellen ($< 2\%$ der B-Zellen) eine erhöhte Inzidenz für Splénomegalie und granulomatöse Erkrankungen beobachten. Eine andere Arbeit beschreibt eine Korrelation mit der Schwere des Krankheitsverlaufs; Patienten mit den niedrigsten CD27⁺-B-Zellen wiesen die niedrigsten Ig-Spiegel und die niedrigsten B-Lymphozytenzahlen auf [82].

Keinen Unterschied zeigten hingegen die Ps-Memory B-Zellen der sID-Gruppe und der Kontrollgruppe. Wie jedoch Litzman et al. bereits für die selektive IgA-Defizienz beschrieben haben, waren die Ps-Memory B-Zellen der sID-Gruppe im Vergleich zur CVID-Gruppe signifikant erhöht (20,7% vs. 3,9%; $p \leq 0,0005$). Litzman et al. konnten zudem bei CVID-Patienten (im Vergleich zur sID-Gruppe) signifikant niedrigere Werte für IgM-Memory ($CD19^+CD27^+IgM^+IgD^+$) und signifikant höhere für naive B-Zellen feststellen [83]. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit meinen Beobachtungen. Während die naiven B-Zellen der CVID-Patienten ebenfalls signifikant erhöht waren (77% vs. 51%; $p \leq 0,001$), ergab die Analyse der IgD-Memory B-Zellen hingegen keine Signifikanz (10,9% vs. 21,6%; $p=0,013$). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die sID-Gruppe neben Patienten mit selektiver IgA-Defizienz auch Patienten mit IgG-Subklassendefekt und IgM-Mangel umfasste. Eine getrennte Analyse war jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich.

Litzman et al. verglichen neben den Ps-Memory weitere B-Zellpopulationen von IgAD-Patienten und gesunden Probanden und konnten, übereinstimmend mit meinen Ergebnissen, keine Unterschiede feststellen [83].

Die Plasmablasten der CVID-Patienten waren sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zur sID-Gruppe signifikant erniedrigt (0,1% vs. 0,6% vs. 0,5%; $p \leq 0,0001$, $p \leq 0,0005$), was wiederum die Hypothese unterstützt, dass der CVID eine Störung im Keimzentrum zugrunde liegt. Mouillot et al. sowie Wehr et al. beschrieben bereits in früheren Arbeiten ähnliche Ergebnisse, wobei beide nur den Vergleich von CVID-Patienten und gesunden Probanden anstellten. Die zweitgenannte Arbeit zeigte zudem eine Korrelation zwischen erniedrigten Plasmablasten und Autoimmunzytopenien [68,84].

Neben den verschiedenen B-Zelldifferenzierungsstadien wurde das Expressionsverhalten der Oberflächenmarker CD38, CD80 und CD95 auf den einzelnen Populationen untersucht und ein Vergleich zwischen Kontrollgruppe, CVID-Patienten und sID-Patienten durchgeführt.

Bei der Auswertung meiner Daten zeigten die CVID-Patienten für die $CD38^-/CD80^-$ -Ps-Memory B-Zellen signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (33,9% vs. 22,7%; $p \leq 0,001$). Die $CD38^+/CD80^+$ -Ps-Memory B-Zellen waren hingegen deutlich,

jedoch nicht signifikant, erniedrigt (14,2% vs. 20,4%; $p = 0,006$). Bar-Or et al. zufolge, stellen $CD80^+$ -Memory B-Zellen eine Untergruppe der Memory B-Zellen dar, die, obwohl sie sich in einem Ruhestadium befinden, eine niedrige Aktivierungsschwelle aufweisen. Nach Stimulation sezernieren sie große Mengen an klassengewechselten Immunglobulinen und fungieren zudem als antigenpräsentierende Zellen für die T-Lymphozyten, welche sie auch aktivieren können. [85]. Meine Ergebnisse – eine Erniedrigung der $CD80^+$ - bei gleichzeitiger Erhöhung der $CD80^-$ -Ps-Memory B-Zellen – deuten also daraufhin, dass COVID-Patienten eine mangelhafte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 (B7.1) aufweisen, was möglicherweise in der Pathogenese der COVID eine Rolle spielt. Eine Arbeit von Groth et al. untersuchte die Expression von CD80 auf B-Zellen und von CD86 (B7.2) auf naiven B-Zellen. Die Ergebnisse zeigten eine insuffiziente Hochregulation von CD86 bei Patienten mit deutlich erniedrigten Ps-Memory B-Zellen, während die CD80-Expression der B-Zellen normal war [86].

In der Gruppe der selektiven Immundefekte zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnliche Werte: die $CD38^+/CD80^+$ -Ps-Memory B-Zellen waren signifikant erniedrigt (12,1% vs. 20,4%; $p \leq 0,001$), während die $CD38^-/CD80^-$ -Ps-Memory B-Zellen deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöht waren (36,4% vs. 22,7%; $p = 0,003$).

Die CD95-Expression der B-Zellsubpopulationen von COVID-Patienten unterschied sich weder zur Kontrollgruppe noch zur sID-Gruppe signifikant. Lediglich für die $CD38^-/CD95^-$ naiven B-Zellen wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein p-Wert nahe dem Signifikanzniveau errechnet (28,8% vs. 18,2%; $p = 0,003$). Meine Daten lassen also eine geringere Apoptoserate vermuten, worauf auch die erhöhte Zahl der naiven B-Zellen hinweist (77% vs. 62,3%; $p = 0,003$). Während eine Arbeit von Iglesias et al. keinen Unterschied zwischen COVID-Patienten und Kontrollgruppe in der CD95-Expression und Apoptoserate feststellte, beobachteten Guo et al. eine erhöhte CD95-Expression sowie eine gesteigerte Apoptoserate bei der COVID [87,88]. Beide Arbeiten beziehen sich jedoch auf $CD19^+$ B-Zellen und differenzieren nicht weiter zwischen den einzelnen Populationen.

Die B-Zellen der sID-Gruppe zeigten bezüglich der CD95-Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant erniedrigte Werte für die $CD38^+/CD95^+$ - Postswitch-Memory (13,0% vs. 24,5%; $p \leq 0,001$) sowie für die $CD38^+/CD95^+$ naive B-Zellen (1,3% vs. 2,5%; $p \leq 0,001$). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass bei Patienten mit selektiven

Immundefekten sowohl die Ps-Memory als auch die naiven B-Zellen eine verminderte Apoptoserate aufweisen, möglicherweise mit dem Ziel, den Antikörpermangel durch eine größere Anzahl an naiven wie auch Ps-Memory B-Zellen zu kompensieren.

Bei weiterer Analyse der CVID-Patienten, aufgeteilt nach der Paris-Klassifikation, zeigte sich, dass die naiven B-Zellen nur in Gruppe MB0 (87,3% vs. 62,3%; $p \leq 0,0001$) und MB1 (79,0% vs. 62,3%; $p = 0,002$) erhöht waren, während die Patienten mit normaler Anzahl an Gedächtnis-B-Zellen (MB3) sogar leicht erniedrigte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten (52,6% vs. 62,3%; $p = 0,087$). Ähnliche Ergebnisse für die Häufigkeit der naiven B-Zellen wurden in einer Arbeit von Piqueras et al. sowie in einer Studie von Vlková et al. beschrieben [67,89].

Betrachtet man außerdem die transitionalen B-Zellen der CVID-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, so zeigt sich, dass diese sowohl als prozentualer Anteil der naiven B-Zellen (2,4% vs. 0,9%; $p = 0,002$) als auch als absolute Zellzahl pro 500.000 Zellen (198 vs. 75; $p = 0,002$) deutlich erhöht sind. Eine Arbeit von Wehr et al. beschreibt hingegen die prozentualen Anteile an den gesamten B-Zellen als signifikant erhöht, die sich bei meinen Probanden hingegen nur wenig unterschieden (1,1% vs. 1,6%; $p = 0,153$) [68].

Zusammenfassend zeigten meine Daten, wie bereits in früheren Studien, drastisch reduzierte Plasmablasten und Ps-Memory B-Zellen bei den CVID-Patienten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der Antikörpermangel vorwiegend durch eine Störung bzw. einen Stopp während der B-Zelldifferenzierung im Keimzentrum bedingt ist. Weiters scheint eine negative Korrelation zwischen Ps-Memory (Schwere der CVID) und naiven B-Zellen vorzuliegen – je niedriger die Ps-Memory umso höher die naiven B-Zellen und umgekehrt. Möglicherweise ein Versuch des Immunsystems durch eine gesteigerte B-Zellproduktion den Antikörpermangel zu kompensieren. Die Patienten mit selektiven Immundefekten wiesen hingegen normale Werte für die Ps-Memory sowie für die naiven B-Zellen auf, weshalb eher ein Defekt beim Isotypen-Wechsel angenommen werden kann. Die Daten dieser Arbeit weisen außerdem daraufhin, dass die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 bei der Pathogenese sowohl der CVID als auch der sID eine Rolle spielt. Weitere Untersuchungen erscheinen notwendig, um die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit zu verifizieren und um genaueres über den Einfluss der CD80-Expression bei Immundefizienzen zu erfahren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Saloga J, Angerer P. Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis. Stuttgart: Schattauer; 2006.
- [2] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2010.
- [3] Holländer GA, Barthlott T. Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1st ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006.
- [4] Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M. Janeway Immunologie. 7th ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
- [5] Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:633–43.
- [6] Bruhn HD, Ackermann S, Bruhn-Fölsch-Kneba-Löffler. Onkologische Therapie: Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren ; mit diagnostischen Hinweisen. Stuttgart: Schattauer; 2004.
- [7] Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 2003;24:343–9.
- [8] Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 1999;190:75–89.
- [9] Uckun FM. Regulation of human B-cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1908–23.
- [10] Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:323–35.
- [11] Lopes-Carvalho T, Kearney JF. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 2004;197:192–205.
- [12] Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:261–71.

- [13] Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* 2000;176:154–70.
- [14] Siegenthaler W, Amann-Vesti BR. *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen.* 9th ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
- [15] Neumann J. *Immunbiologie: Eine Einführung.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. (Springer-Lehrbuch).
- [16] Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol. Today* 1992;13:17–21.
- [17] Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie.* 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
- [18] Aicher WK, Ganten D. *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen: Mit 35 Tabellen.* Berlin: Springer; 2003. (Molekulare Medizin).
- [19] Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G. *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik.* 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2007.
- [20] Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Mueller-Eckhardt-Kiefel. *Transfusionsmedizin: Grundlagen, Therapie, Methodik ; mit 121 Tabellen.* 3rd ed. Berlin: Springer; 2004.
- [21] Fritsch P. *Dermatologie, Venerologie: Grundlagen - Klinik - Atlas ; mit 268 Tabellen.* 2nd ed. Berlin: Springer; 2004. (Springer-Lehrbuch).
- [22] Mehta K, Malavasi F. *Human CD38 and related molecules: 15 tables.* Basel: Karger; 2000. (Chemical immunology; vol 75).
- [23] Sack U. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen.* Basel: Karger; 2007.
- [24] Kumagai M, Coustan-Smith E, Murray DJ, Silvennoinen O, Murti KG, Evans WE et al. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* 1995;181:1101–10.
- [25] Zupo S, Rugari E, Dono M, Tadorelli G, Malavasi F, Ferrarini M. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *Eur. J. Immunol.* 1994;24:1218–22.

- [26] Ferencik M. Wörterbuch Allergologie und Immunologie: Fachbegriffe, Personen und klinische Daten von A - Z ; [mit CD-ROM]. Wien: Springer; 2005. (SpringerMedizin).
- [27] Sedlacek HH. Die Immunabwehr des Menschen: Zellen Botenstoffe Netzwerke Herausforderungen Krankheiten. Altendorf: Skript-Verl. Kühnel; 2009.
- [28] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180–92.
- [29] Lagresle C, Mondière P, Bella C, Krammer PH, Defrance T. Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996;183:1377–88.
- [30] Emminger H, Kia T. Exaplan: Das Kompendium der klinischen Medizin. 5th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2008. (vol 1).
- [31] Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br. J. Haematol.* 2009;145:709–27.
- [32] ESID: European Society for Immunodeficiencies [cited 2010 May 14]. Available from: URL:<http://www.esid.org>.
- [33] Pfluger H, Helbling A, Mordasini C, Pichler WJ. [CVID (common variable immunodeficiency): heterogeneous clinical manifestation of the commonest symptomatic primary immunodeficiency disease]. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:1590–9.
- [34] Speer C, Gahr M, Speer CP. Pädiatrie: Mit 423 Tabellen. 3rd ed. Heidelberg /// Berlin, Heidelberg: Springer; Springer Berlin Heidelberg; 2009. (Springer-Lehrbuch).
- [35] Mayatepek E. Pädiatrie: Mit 327 Tabellen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. München: Elsevier Urban & Fischer; 2007.
- [36] Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 1989;9:22–33.

- [37] Grimbacher B, Warnatz K, Peter HH. IMPAD: European Consortium For Primary Antibody Deficiencies.
- [38] Vorechovský I, Cullen M, Carrington M, Hammarström L, Webster AD. Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *J. Immunol.* 2000;164:4408–16.
- [39] Vorechovský I, Webster AD, Plebani A, Hammarström L. Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:1096–109.
- [40] Vorechovský I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Björkander J et al. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995;77:185–92.
- [41] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397:263–6.
- [42] Choe J, Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:508–15.
- [43] McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001;409:102–5.
- [44] Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J et al. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 2004;113:234–40.
- [45] Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat. Immunol.* 2003;4:261–8.
- [46] Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992;256:105–7.

- [47] van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJM, van Tol MJD et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:1901–12.
- [48] Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat. Genet.* 2007;39:429–30.
- [49] Poodt AEJ, Driessen GJA, Klein A de, van Dongen JJM, van der Burg M, Vries E de. TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2009;156:35–9.
- [50] Castigli E, Geha RS. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. *Immunol. Res.* 2007;38:102–11.
- [51] Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat. Genet.* 2005;37:820–8.
- [52] Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* 2005;36:1113–9.
- [53] Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:13945–50.
- [54] Arnold DF, Wiggins J, Cunningham-Rundles C, Misbah SA, Chapel HM. Granulomatous disease: distinguishing primary antibody disease from sarcoidosis. *Clin. Immunol.* 2008;128:18–22.
- [55] Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin. Immunol.* 1999;92:34–48.
- [56] Sneller MC, Strober W, Eisenstein E, Jaffe JS, Cunningham-Rundles C. NIH conference. New insights into common variable immunodeficiency. *Ann. Intern. Med.* 1993;118:720–30.

- [57] Touw CML, van de Ven AA, Jong PA de, Terheggen-Lagro S, Beek E, Sanders EAM et al. Detection of pulmonary complications in common variable immunodeficiency. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:793–805.
- [58] Park JES, Beal I, Dilworth JP, Tormey V, Haddock J. The HRCT appearances of granulomatous pulmonary disease in common variable immune deficiency. *Eur J Radiol* 2005;54:359–64.
- [59] Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;114:415–21.
- [60] Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Exp. Immunol.* 2000;120:225–31.
- [61] Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, Gottfried MR. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996;20:1240–52.
- [62] Rezaei, Nima; Aghamohammadi, Asghar; Notarangelo, Luigi D. *Primary Immunodeficiency Diseases: Definition, Diagnosis, and Management*; 2008.
- [63] Mellekjær L, Hammarström L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin. Exp. Immunol.* 2002;130:495–500.
- [64] Grimbacher, Bodo; Warnatz, Klaus; Peter, Hans-Hartmut. *Der variable Immundefekt (Common variable Immunodeficiency; CVID): Ein Leitfaden von und für Ärzte, Apotheker, Patienten und Angehörige: Abteilung für Rheumatologie und Klinische Immunologie*; 2003.
- [65] Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544–51.

- [66] Bergbreiter A, Salzer U. Common variable immunodeficiency: a multifaceted and puzzling disorder. *Expert Rev Clin Immunol* 2009;5:167–80.
- [67] Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J. Clin. Immunol.* 2003;23:385–400.
- [68] Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77–85.
- [69] Nydegger UE, Sturzenegger M. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy. *Drug Saf* 1999;21:171–85.
- [70] Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Clin. Exp. Immunol.* 1997;109 Suppl 1:1–28.
- [71] al-Attas RA, Rahi AH. Primary antibody deficiency in Arabs: first report from eastern Saudi Arabia. *J. Clin. Immunol.* 1998;18:368–71.
- [72] Kanoh T, Mizumoto T, Yasuda N, Koya M, Ohno Y, Uchino H et al. Selective IgA deficiency in Japanese blood donors: frequency and statistical analysis. *Vox Sang.* 1986;50:81–6.
- [73] Yel L. Selective IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.* 2010;30:10–6.
- [74] Pan Q, Hammarström L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol. Rev.* 2000;178:99–110.
- [75] Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;118 Suppl 1:1–28.
- [76] Insel RA, Anderson PW. IgG subclass distribution of antibody induced by immunization with the isolated and protein-conjugated polysaccharide of *H. influenzae* b and G2m(n) distribution of serum IgG2 in man. *Monogr Allergy* 1988;23:128–37.
- [77] Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002;109:581–91.

- [78] Reynolds, John. Flow Cytometry Core Facility: Multi Colour Immunofluorescence: University of Calgary [cited 2011 Jan 6]. Available from: URL:<http://www.flowlab.ucalgary.ca/flowlab/servicesMCI.htm>.
- [79] Clark DP, Pazdernik NJ, Held A. *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
- [80] Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S et al. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 2002;103:34–42.
- [81] Ferry BL, Jones J, Bateman EA, Woodham N, Warnatz K, Schlesier M et al. Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;140:532–9.
- [82] Jacquot S, Maçon-Lemaître L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C et al. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. *Int. Immunol.* 2001;13:871–6.
- [83] Litzman J, Vlková M, Pikulová Z, Stikarovská D, Lokaj J. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;147:249–54.
- [84] Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier J, Fieschi C, Vince N et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J. Clin. Immunol.* 2010;30:746–55.
- [85] Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Krieger JI, Duddy M, O'Connor KC et al. Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J. Immunol.* 2001;167:5669–77.
- [86] Groth C, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H et al. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Exp. Immunol.* 2002;129:133–9.

- [87] Iglesias J, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM, Mila J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;117:138–46.
- [88] Guo BC, Saxon A. B cell lines from a subset of patients with common variable immunodeficiency undergo enhanced apoptosis associated with an increased display of CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and decreased IgG and IgA production. *Cell. Immunol.* 1995;166:83–92.
- [89] Vlková M, Thon V, Sárffyová M, Bláha L, Svobodník A, Lokaj J et al. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2006;143:373–9.