

**Diplomarbeit**

**HOCHSENSITIVE FACS-ANALYSE DER B-ZELL-  
SUBPOPULATIONEN BEI GESUNDEN PROBANDEN**

eingereicht von

**Gregor Gradwohl**

Mat. Nr.: 0433581

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin**

**Klinische Abteilung für Rheumatologie und Immunologie**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek**

Graz, am \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Gregor Gradwohl

### *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.*

Graz, am \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Unterschrift*

*Es wird darauf hingewiesen, dass in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit und besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet wird, welches beide Geschlechter in gleichem Maße einschließt.*

## Vorwort

Vor gut einem Jahr nahm ich als Proband an einer Studie teil und kam so erstmals mit der klinischen Abteilung für Immunologie am Universitätsklinikum Graz in Kontakt. Dort traf ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Brezinschek, den ich bereits als meinen Praktikumsleiter im Modul „Innere Medizin“ kennen gelernt hatte und der mir anbot, meine Diplomarbeit unter seiner Anleitung zu schreiben.

Meine damalige Vorstellung, dass es sich bei der Immunologie um ein hochkomplexes, aber auch sehr aktuelles und nach wie vor mit vielen ungelösten Rätseln behaftetes Forschungsgebiet handelt, hat sich nach einem Jahr intensiver Beschäftigung mit der Thematik als absolut zutreffend erwiesen und war der Grund, aus dem ich mich zu dieser Arbeit entschloss.

Zu dieser Zeit lief an der Abteilung für Rheumatologie und Immunologie gerade eine große multizentrische Studie an, die das Ziel hatte, mittels hochsensitiver durchflusszytometrischer Messung der B-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit rheumatoider Arthritis das Ansprechen auf eine Therapie mit Rituximab frühzeitig vorhersagen zu können.

Für meine Arbeit habe ich das Analyseprotokoll aus dieser Studie übernommen und Blutproben von gesunden Probanden untersucht, um Referenzwerte aus der Normalbevölkerung zu gewinnen, die als Grundlage für B-Zellanalysen von Kranken dienen sollen und diese überhaupt erst sinnvoll machen.

## Danksagungen

Mein Dank gilt zunächst ganz besonders Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek, der selbst in turbulenten Zeiten immer ein offenes Ohr für uns Studenten hatte und für unsere „DA in progress“ Meetings bereitwillig seine Zeit opferte. Mit seiner sprühenden Begeisterung für die Forschung hat er auch auf uns einen Funken der Motivation überspringen lassen und uns bei Kongressen und Fortbildungen mit eingebunden. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Brezinschek für seine nette und ungezwungene Art, die unter anderem dazu beitrug, dass ich stets gerne auf der Immunologie arbeitete.

Ein großes Dankeschön gebührt dem gesamten Team des Immunologielabors unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Winfried Graninger. Besonders danke ich Frau BA Karin Gründl, Frau BA Irene Holzer und Frau Mag. Barbara Prietl für die Einschulung in die Laborarbeit und ihre Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte. Trotz laufendem Routinebetrieb wurde dankenswerterweise immer auf mich Rücksicht genommen und mir ein Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt.

Weiters bin ich Prim. Priv.-Doz. Dr. Walter Schippinger, dem Leiter der Abteilung für Innere Medizin an der Albert Schweitzer Klinik Graz dankbar für seinen persönlichen Einsatz in meiner Sache, wodurch ich mein Probandenkollektiv um einige geriatrische Patienten erweitern konnte und so umfassendere Ergebnisse präsentieren kann.

An dieser Stelle möchte ich mich auch von Herzen bei meinen Eltern Harald und Maria bedanken, die mir meine lange Ausbildung ermöglicht haben und mich auch außerhalb des Studiums bei all meinen Vorhaben unterstützen. Ihnen verdanke ich das menschliche Rüstzeug für den Arztberuf.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Seit der Erkenntnis, dass B-Zellen ein Angriffspunkt für die erfolgreiche Behandlung von rheumatischen Erkrankungen sind, wurden sie zu einem wichtigen Forschungsgebiet. Die Verbesserung der technischen Möglichkeiten zur B-Zell-Analyse, sowie das wachsende Wissen um bestimmte B-Zell Subpopulationen haben es notwendig gemacht, dass für diese Untergruppen Referenzwerte aus einem Normalkollektiv bestimmt werden. Interessanterweise sind für die heute gängigen B-Zell Subsets wenig solide Referenzbereiche in der Literatur zu finden.

**Ziele:** Die Bestimmung von Referenzwerten für aktuell relevante B-Zell Subpopulationen bei gesunden Erwachsenen.

**Methoden:** Für diese Studie wurden insgesamt 41 freiwillige Probanden (14 Männer und 27 Frauen; medianes Alter 25 Jahre, Spannweite 20-85 Jahre) gewonnen und deren Blutproben mittels hochsensitivem FACS analysiert. Dazu wurden mononukleäre Leukozyten aus dem peripheren Blut isoliert und mit folgenden monoklonalen Antikörpern gefärbt: CD19, CD24, CD27, CD38, CD45, IgD, CD80 und CD95. Um T-Zellen und Monozyten auszuschließen, wurden weiters CD3 und CD14 verwendet. Die Analyse wurde auf dem 3-Laser Durchflusszytometer BD Canto II (Software FACSDiva) durchgeführt und für jede Messung 500.000 Zellen akquiriert. Anhand der Oberflächenfärbung wurden die B-Zellen nun in die Subsets Naive ( $CD19^+ IgD^+ CD27^-$ ), IgD Memory ( $CD19^+ IgD^+ CD27^+$ ), Postswitch Memory ( $CD19^+ IgD^- CD27^+$ ) und Doppelnegative ( $CD19^+ IgD^- CD27^-$ ) eingeteilt. Darüber hinaus wurden transitorische B-Zellen ( $CD19^+ IgD^+ CD27^- CD38^{++} CD24^{++}$ ), Plasmablasts ( $CD19^+ CD27^{++} IgD^-$ ) und der Aktivierungsgrad (CD80, CD95) bestimmt. Für die Subsets Postswitch Memory und Plasmablasts wurde zusätzlich der Anteil der Zellen mit hoher CD38 Expression gemessen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS (Version 17).

**Ergebnisse:** Für die gemessenen Subpopulationen konnten Referenzbereiche in Form von Median und Perzentilen festgelegt werden. Die Analyse der Daten zeigte keinen relevanten Geschlechtsbezug der B-Zell-Verteilung, allerdings wurden in vier Altersgruppen signifikante altersabhängige Unterschiede gezeigt.

**Konklusion:** Um die Rolle verschiedener B-Zell-Subpopulationen für Diagnostik und Therapie abschätzen zu können, sind verlässliche Referenzwerte aus einem repräsentativen gesunden Kollektiv notwendig. Dabei muss der altersabhängigen Verteilung von B-Zellen Rechnung getragen werden.

## Abstract

**Background:** B cells have become an important topic in research since they have successfully been targeted in the treatment of rheumatic diseases. The improvements of technical devices for B cell analysis and the increasing knowledge about distinct B cell subsets necessitate the determination of reference values from healthy subjects for those subpopulations. Interestingly, in literature only few reliable reference ranges can be found for current subsets.

**Objectives:** To determine reference ranges for currently relevant B cell subsets in healthy adults.

**Methods:** This study includes 41 healthy volunteers (14 men and 27 women; median age 25 years, range 20-85 years), whose blood samples were analyzed using highly sensitive flow cytometry. Therefore mononuclear leucocytes were isolated from peripheral blood and stained with the following monoclonal antibodies: CD19, CD24, CD27, CD38, CD45, IgD, CD80 and CD95. To exclude T cells and monocytes, CD3 and CD14 were utilized. Analysis was performed on a 3-laser BD Canto II flow cytometer (software FACSDiva) and for each measurement 500,000 cells were acquired. According to their surface staining, B cells were divided in naïve ( $CD19^+ IgD^+ CD27^-$ ), IgD memory ( $CD19^+ IgD^+ CD27^+$ ), postswitch memory ( $CD19^+ IgD^- CD27^+$ ) and double negative ( $CD19^+ IgD^- CD27^-$ ) cells. Furthermore transitional B cells ( $CD19^+ IgD^+ CD27^- CD38^{++} CD24^{++}$ ), plasmablasts ( $CD19^+ CD27^{++} IgD^-$ ) and the grade of B-cell activation (CD80, CD95) were determined. In addition the fraction of cells with high expression of CD38 was measured for the analyzed subsets of postswitch memory and plasmablasts. Statistical analysis of data was performed using SPSS (version 17).

**Results:** Reference ranges for the given subsets could be established in the form of median and percentiles. Analysis of the data showed no sex-related changes in the distribution of B cell subsets, but in four defined age groups significant differences could be found.

**Conclusion:** To evaluate the role of the different B cell subsets in diagnostics and therapy, reliable reference values from a representative healthy cohort are required. Thereby the age-related changes in the distribution of B cells have to be considered.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>III</b>
<b>Danksagungen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Glossar</b> .....	<b>X</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XX</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Grundlagen des Immunsystems</i> .....	1
1.1.1    Natürliche Immunität .....	1
1.1.1.1    Epithelien .....	3
1.1.1.2    Phagozyten.....	4
1.1.1.3    Natürliche Killerzellen.....	5
1.1.1.4    Komplementsystem .....	7
1.1.1.5    Zytokine .....	9
1.1.2    Spezifische Immunität .....	11
1.1.2.1    Lymphozyten .....	11
T-Lymphozyten .....	13
B-Lymphozyten .....	16
1.2 <i>B-Lymphozyten</i> .....	17
1.2.1    Antikörper .....	17
1.2.2    Entwicklung der B-Zellen.....	20
1.2.2.1    Zentrale B-Zellreifung .....	20
1.2.2.2    Periphere B-Zellreifung .....	22
1.2.3    B-Zell-Aktivierung .....	22
1.2.3.1    T-Zell abhängige Aktivierung und Keimzentrumsreaktion.....	23
1.2.3.2    T-Zell unabhängige Aktivierung .....	25
1.2.4    Subtypisierung anhand der Expression von Oberflächenmarkern.....	26
<b>Probanden/Patienten und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 <i>Probanden- bzw. Patientenkollektiv</i> .....	28
2.1.1    Ein- und Ausschlusskriterien .....	29
2.2 <i>Methoden</i> .....	30
2.2.1    PBMC-Isolation .....	30
2.2.2    Färben mit monoklonalen Antikörpern.....	31

2.2.3	Durchflusszytometer .....	33
2.2.4	Gating .....	35
2.2.5	Quantitative Zellzahlmessungen .....	39
2.2.6	Statistische Datenanalyse .....	40
<b>Ergebnisse .....</b>		<b>41</b>
3.1	<i>Männer versus Frauen</i> .....	43
3.2	<i>Altersabhängige Veränderungen</i> .....	43
3.2.1	Anzahl der B-Zellen .....	44
3.2.2	Plasmablasts .....	45
3.2.3	Postswitch Memory B-Zellen .....	46
3.2.4	Transitorische B-Zellen .....	47
3.2.5	CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>-</sup> B-Zellen .....	48
3.2.6	CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> B-Zellen .....	49
3.2.7	Postswitch Memory CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>-</sup> B-Zellen .....	50
3.2.8	CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD95 <sup>-</sup> B-Zellen .....	51
3.2.9	CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> /CD95 <sup>+</sup> B-Zellen .....	52
3.2.10	Postswitch Memory CD38 <sup>+</sup> /CD95 <sup>-</sup> B-Zellen .....	53
<b>Diskussion .....</b>		<b>54</b>
	<i>Konklusion</i> .....	58
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>59</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>63</b>
	<i>Probandeninformation</i> .....	63
	<i>Lebenslauf</i> .....	66

## Glossar

<b>Affinität</b>	Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen.
<b>Affinitätsreifung</b>	Prozess, der im Laufe einer humoralen Immunantwort zu erhöhter Ak-Affinität für ein bestimmtes Antigen führt. Dies kommt durch somatische Hypermutation von Igs und selektivem Überleben der B-Zellen mit dem besten Ak zustande.
<b>Allelische Exklusion</b>	Die ausschließliche Expression nur einer der beiden vererbten Allele, die für Ig-Schwerketten und Ig-Leichtketten kodieren.
<b>Antigen</b>	Ein Molekül, das an einen Ak oder T-Zell-Rezeptor gebunden wird.
<b>Antigen Presenting Cells, antigenpräsentierende Zellen</b>	Zellen, die MHC-assoziierte Fragmente von Proteinantigenen an ihrer Zelloberfläche präsentieren können und damit T-Zellen aktivieren.
<b>Antigenrezeptoren</b>	Zelloberflächenproteine von Lymphozyten, mit denen diese Zellen ihr spezifisches Antigen erkennen.
<b>Antikörper</b>	Von B-Lymphozyten produziertes Glykoprotein, das aus je 2 identen Schwer- und Leichtketten besteht und mit seinen variablen Regionen Antigene erkennt. Die konstante Region interagiert mit anderen Molekülen des Immunsystems.
<b>Antikörperdiversität</b>	Vielfalt an Antikörpern.
<b>Apoptose</b>	Programmierter Zelltod.
<b>Autoimmunerkrankungen</b>	Erkrankung, die durch mangelnde Selbst-Toleranz zur Zerstörung von körpereigenem Gewebe durch das Immunsystem führt.
<b>Autoreaktivität</b>	Fälschliches Erkennen körpereigener Strukturen als fremd durch das Immunsystem.
<b>B Cell Receptor</b>	Membrangebundenes Ig auf B-Lymphozyten, das zur Erkennung von Antigenen dient.

<b>BD FACSCanto II</b>	Modernes 3-Laser Durchflusszytometer.
<b>BD FACSDiva</b>	Software zur Auswertung von durchflusszytometrisch gemessenen Daten.
<b>Beckman COULTER® 5diff AL</b>	Automatischer Zellzähler.
<b>Box-Plot</b>	Diagramm, das zur grafischen Darstellung der Verteilung statistischer Daten verwendet wird. Der Median, die zwei Quartilen und die Extremwerte können abgelesen werden.
<b>CD-Nomenklatur</b>	Mithilfe der CD-Nomenklatur können Oberflächenantigene auf Leukozyten beschrieben werden.
<b>Chemokine</b>	Lockstoffe für Leukozyten.
<b>Differenzierung</b>	Entwicklung von Zellen zu einem höher spezialisierten Zustand.
<b>Dot-Plot</b>	Punktwolkendarstellung.
<b>Durchflusszytometrie</b>	Verfahren, bei dem durch Laserlicht angeregte optische Signale von Zellen gemessen werden.
<b>Effektorzelle</b>	Zelle, die im Rahmen einer Immunreaktion einer Effektorfunktion wie Zytokin- oder Ak-Sekretion bzw. Lyse von Mikroben nachkommt.
<b>Epitope</b>	Angriffspunkte von Rezeptoren auf Antigenen.
<b>Event</b>	Vom FACS auf Grund von detektiertem Fluoreszenzlicht erkanntes Ereignis.
<b>Fab-Region</b>	Region eines Aks, die für die Bindung des Antigens verantwortlich ist.
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting, siehe Durchflusszytometrie.
<b>Fc-Region</b>	Konstanter Abschnitt eines Aks, der mit anderen Molekülen des Immunsystems interagiert.
<b>Fluorochrome</b>	Fluoreszenzfarbstoffe, die vom FACS detektiert werden können.
<b>Forward Scatter</b>	Vorwärtsstreulicht beim Durchtritt einer Zelle durch einen Laserstrahl. Es ist vom Volumen der bestrahlten Zelle abhängig.

<b>Gating</b>	Das Auswählen bestimmter Regionen und Zellgruppen im Dot-Plot, wodurch sie gesondert betrachtet werden können.
<b>Granularität</b>	„Körnigkeit“ einer Zelle, die durch Granula im Zytoplasma zustande kommt. Zellen mit hoher Granularität haben in der Durchflusszytometrie hohe SSC-Werte.
<b>Hämatopoiese</b>	Die Bildung reifer Blutzellen, darunter Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, aus pluripotenten Stammzellen.
<b>Histopaque® 1077</b>	Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, Reagenz zur Dichtegradientenzentrifugation.
<b>Homöostase</b>	Ruhestellung von Immunzellen nach erfolgreich bekämpfter Infektion.
<b>Hybridom</b>	Eine Zelllinie, die durch Zellfusion oder somatische Zellhybridisierung zwischen einem gesunden Lymphozyten und einer unsterblichen lymphozytären Tumorzelle entsteht. B-Zellen werden mit Myelomzellen fusioniert, um damit monoklonale Antikörper zu produzieren.
<b>Immunantwort</b>	Eine gemeinsame und koordinierte Reaktion von Zellen und Molekülen des Immunsystems auf das Eindringen von Fremdstoffen in den Organismus.
<b>Immunglobulin</b>	Synonym zu Antikörper (siehe dort).
<b>Immunologisches Repertoire</b>	Gesamtheit der Vielfalt an Antigenrezeptoren.
<b>Isotypen</b>	Die fünf verschiedenen Klassen von Antikörpern, die sich anhand von fünf verschiedenen konstanten Teilen der Schwereketten unterscheiden lassen.
<b>Isotyp-Kontrolle</b>	Antikörper der gleichen Klasse und dem gleichen Fluorochrom wie der zu testende Ak, aber ohne die spezifische Bindungsstelle. Damit können spezifische und unspezifische Bindungen im FACS unterschieden werden.
<b>Isotyp-Switching</b>	Wechsel des Ig-Isotyps im Rahmen von Keimzentrumsreaktionen.

<b>Junktionale Diversifizierung</b>	Die Vielfalt an Ak und TCR-Repertoires, die durch die zufällige Anfügung oder Entfernung einzelner Nukleotide an den Verbindungsstellen zwischen V, D, und J Gensegmenten zustande kommt.
<b>Keimzentrum</b>	Region innerhalb von Lymphfollikeln in Milz, Lymphknoten oder anderen peripheren lymphatischen Organen, die sich während T-Zell abhängigen humoralen Immunantworten bildet und den Ort der Affinitätsreifung von B-Zellen darstellt.
<b>Keimzentrumsreaktion</b>	Fasst die Reifungsvorgänge von B-Zellen in Keimzentren wie Klassen-Switch, Affinitätsreifung und Bildung von Gedächtniszellen zusammen.
<b>Klonale Expansion</b>	Die antigenvermittelte Vergrößerung der Anzahl von Lymphozyten, die spezifisch für das betreffende Antigen sind.
<b>Leukozyten</b>	Weißer Blutkörperchen.
<b>Ligand</b>	Bindungspartner.
<b>Lymphfollikel</b>	Kugelförmige Kolonien von B-Lymphozyten, in denen deren Differenzierung und Vermehrung stattfindet.
<b>Lymphozyten</b>	Zelluläre Bestandteile des Blutes, die v. a. für die erworbene Immunität verantwortlich sind. Zu diesen Zellen zählen B- und T-Lymphozyten, sowie die natürlichen Killerzellen.
<b>Lysosomen</b>	Zellorganell in Phagozyten, das, ausgestattet mit proteolytischen Enzymen, für den Abbau von Eiweißen verantwortlich ist.
<b>Median</b>	Auch als Zentralwert bezeichnet, halbiert der Median eine statistische Verteilung und ist damit robust gegenüber Ausreißern.
<b>Medulla</b>	Das Mark.
<b>Membrane Attack Complex</b>	Ein zelllysierender Komplex aus den Endkomponenten der Komplementkaskade, der die Zellmembranen der Zielzellen durchlässig macht und damit zu deren Absterben führt.

<b>Memory Zelle</b>	Gedächtnis-Zelle, die bei wiederholtem Kontakt mit demselben Antigen für eine rasche und effektive erworbene Immunantwort sorgen kann.
<b>MHC-Komplex</b>	Molekül, das eine wichtige Rolle in der immunologischen Unterscheidung von Selbst und Fremd einnimmt.
<b>Mikroben</b>	Ein oder mehrzellige Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, mikroskopische Algen und Protozoen.
<b>Monoklonale Antikörper</b>	Antikörper, der spezifisch für ein bestimmtes Antigen ist und mittels eines B-Zell Hybridoms produziert wird.
<b>Myelom</b>	Das (multiple) Myelom ist ein maligner Tumor ausgehend von Ak-produzierenden B-Lymphozyten.
<b>Naive Lymphozyten</b>	Reife Lymphozyten, die weder selbst je Antigenkontakt hatten, noch von einer antigenaktivierten Zelle abstammen.
<b>Opsonisierung</b>	Prozess, in dem ein Makromolekül (Ig, oder Komplementprotein) an der Oberfläche von Mikroben angebracht wird, damit diese dann in weiterer Folge von Phagozyten erkannt und gefressen werden können.
<b>PAMPs</b>	Oberflächenstrukturen, die ganzen Gruppen von Mikroben gemein sind und die durch das natürliche Immunsystem erkannt werden können.
<b>Panleukozytenmarker</b>	Oberflächenmarker, der auf allen Leukozyten zu finden ist.
<b>Pathogen</b>	Substanz, die eine Erkrankung ursächlich bedingen kann.
<b>PBMCs</b>	Es handelt sich um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, die einen runden Zellkern besitzen. Dies sind v. a. Lymphozyten und Monozyten.
<b>Periphere lymphatische Organe</b>	Zu den peripheren lymphatischen Organen zählen lymphatische Gewebe wie Lymphfollikel, Peyer-Plaques, Mandeln, Milz, Lymphknoten und Appendix.

<b>Perzentile</b>	Perzentilen zerlegen eine statistische Verteilung in 100 gleich große Bereiche, wobei z. B. unterhalb der zehnten Perzentile 10% der Werte liegen, unterhalb der 90. Perzentile 90% etc.
<b>Phagozyten</b>	Zellen, die in der Lage sind, Partikel und Mikroben zu inkorporieren und als Phagosom ins Zytoplasma aufzunehmen. Dazu zählen z. B. Neutrophile und Makrophagen.
<b>Phosphate Buffered Saline</b>	Isotone Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4.
<b>Plasmablast</b>	Vorstufe einer Plasmazelle, die allerdings noch über die Fähigkeit zur Zellteilung verfügt.
<b>Plasmazellen</b>	Enddifferenzierte, Ak-produzierende B-Zelle.
<b>Proliferation</b>	Wachstum und Vermehrung von Zellen durch Zellteilung.
<b>Punktmutation</b>	Bezeichnet eine Genmutation, wenn durch die Veränderung nur eine einzelne Nukleinsäure-Base betroffen ist.
<b>Quartile</b>	Als Quartile bezeichnet man die 25., die 50. und die 75. Perzentile, die demnach eine Verteilung in vier Abschnitte teilen, in denen jeweils 25% der Werte liegen.
<b>Recombination Activation Genes</b>	Sind Enzyme, die an Rekombinations-Erkennungs-Sequenzen auf Lymphozyten-DNA binden und dort für die Rekombination von Ig- und TCR- Genen verantwortlich sind.
<b>Regulatorische T-Zellen</b>	Eine Population von T-Lymphozyten, welche die Aktivierung anderer T-Zellen reguliert und für die Erhaltung der Selbst-Toleranz von großer Bedeutung ist.
<b>Sheath-Fluid</b>	Hüllstrom, der in der Durchflusszytometrie zu einer Verdünnung und Fokussierung des Probenmaterials führt, sodass die zu untersuchenden Zellen einzeln durch den Laserstrahl hindurchtreten.
<b>Side Scatter</b>	Der Side Scatter ist das orthogonale Streulicht einer mit einem Laser beschossenen Zelle in der Durchflusszytometrie. Es ist ein Maß für die Granularität der untersuchten Zelle.

<b>Somatische Hypermutation</b>	Bezeichnet eine enorm hohe Frequenz an Punktmutationen in den Leicht- und Schwerekettenregionen von B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion. Diese führen in einigen Fällen zur Bildung hochaffiner Antikörper.
<b>Somatische Rekombination</b>	Der Prozess der DNA-Rekombination, in dem während der Lymphozytenreifung funktionelle Gene für die Antigenrezeptoren aus einer relativ geringen Anzahl an beliebig kombinierbaren vererbten Sequenzen erzeugt werden.
<b>Spannweite</b>	Bezeichnet den Abstand zwischen dem größten und dem kleinsten Wert einer statistischen Verteilung.
<b>Standardabweichung</b>	Statistisches Streuungsmaß für Normalverteilungen.
<b>Surrogat-Leichtkette</b>	Nicht rekombinierter Leichtkettensatz, der während der B-Zell-Reifung vor der Leichtkettenrekombination zum Einsatz kommt.
<b>T-Helfer-Zellen</b>	Durch die Expression von CD4 gekennzeichnetes Subset der T-Zellen, das hauptsächlich für die Aktivierung von Makrophagen in zellmedierten Immunantworten und für die T-Zell-Hilfe bei B-Zellaktivierung verantwortlich ist.
<b>Tight Junctions</b>	Dichte Verbindungen zwischen den Zellmembranen von Epithelzellen, die dadurch eine Barrierefunktion gegenüber schädlichen Eindringlingen aufbauen können.
<b>T-Zell-Hilfe</b>	Um eine optimale Antikörperantwort auf Proteinantigene zu produzieren, benötigen B-Zellen neben der Aktivierung durch Antigenkontakt zusätzlich die Hilfe von T-Zellen. Dies geschieht durch Bindung der T-Helfer-Zelle mit dem TCR an das von der B-Zelle präsentierte Antigen und daneben auch durch sogenannte Kostimulationsmoleküle wie CD40.
<b>V(D)J-Rekombination</b>	siehe somatische Rekombination.
<b>VACUETTE®</b>	Blutentnahmeröhrchen mit Unterdrucksystem.
<b>Vertebraten</b>	Wirbeltiere

<b>Zellklon</b>	Gruppe von genetisch identischen Zellen, die durch nicht geschlechtliche Teilung aus einer einzigen Vorgängerzelle hervorgegangen sind.
<b>Zytokine</b>	Peptide, die regulierende Funktionen für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen ausüben.
<b>Zytolyse</b>	Schädigung und Untergang einer Zelle.
<b>Zytotoxische T-Zellen</b>	CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten, die im Rahmen von zellulären Immunantworten für die Lyse von infizierten Zellen und Tumorzellen sorgen.

## Abkürzungen

<b>AID</b>	Activation-Induced Deaminase
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>APCs</b>	Antigen Presenting Cells
<b>BCR</b>	B Cell Receptor
<b>BSG</b>	Blutsenkungsgeschwindigkeit
<b>ca.</b>	Circa
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CRP</b>	C-Reaktives Protein
<b>d. h.</b>	das heißt
<b>etc.</b>	et cetera
<b>Fab</b>	Fragment of Antigen Binding
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>Fc</b>	Constant Fragment
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNKR</b>	Inhibierender Natürlicher Killerzellen Rezeptor
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MZ (B-Zellen)</b>	Marginalzonen (B-Zellen)
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>Rag</b>	Recombination Activation Gene
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>PBMCs</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>BD</b>	Becton Dickinson
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll-Protein
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PE-Cy7</b>	Phycoerythrin-Cyanin7
<b>PBLs</b>	Peripheral Blood Lymphocytes

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Neutrophiler Granulozyt.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Monozyt.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Aktivierende und inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen.....	6
<b>Abbildung 4:</b> Aktivierungswege des Komplementsystems.....	8
<b>Abbildung 5:</b> Lymphozyt im peripheren Blutaussstrich.....	11
<b>Abbildung 6:</b> Reifung der Lymphozyten.....	12
<b>Abbildung 7:</b> Vielfalt von Antigenrezeptoren.....	13
<b>Abbildung 8:</b> Phasen der T-Zellantwort.....	16
<b>Abbildung 9:</b> Struktur eines sezernierten IgG-Antikörpers.....	17
<b>Abbildung 10:</b> Struktureller Aufbau der Immunglobulin Isotypen.....	18
<b>Abbildung 11:</b> Stadien der B-Zell-Reifung.....	21
<b>Abbildung 12:</b> Phasen der humoralen Immunantwort.....	23
<b>Abbildung 13:</b> B-Zell-Entwicklung und entsprechende Oberflächenmarker.....	26
<b>Abbildung 14:</b> Altersverteilung des Probandenkollektivs.....	28
<b>Abbildung 15:</b> Überschichten.....	30
<b>Abbildung 16:</b> Röhrchen nach der Zentrifugation.....	31
<b>Abbildung 17:</b> Prinzip der Durchflusszytometrie.....	34
<b>Abbildung 18:</b> BD FACSCanto II.....	34
<b>Abbildung 19:</b> Gating der B-Lymphozytenpopulation.....	36
<b>Abbildung 20:</b> Festlegen der Grenzen für spezifische Bindungen.....	37
<b>Abbildung 21:</b> Tube 2.....	38
<b>Abbildung 22:</b> Datenausgabe.....	38
<b>Abbildung 23:</b> Gemessene Subtypen Tube 3.....	39
<b>Abbildung 24:</b> Gemessene Subtypen Tube 4.....	39
<b>Abbildung 25:</b> B-Zellen/500.000 Events: Männer vs. Frauen.....	43
<b>Abbildung 26:</b> B-Zellen/ $\mu$ L Blut.....	44
<b>Abbildung 27:</b> Plasmablasts.....	45
<b>Abbildung 28:</b> Postswitch Memory B-Zellen.....	46
<b>Abbildung 29:</b> Absolutzahl der T1-Zellen.....	47
<b>Abbildung 30:</b> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>-</sup> B-Zellen.....	48
<b>Abbildung 31:</b> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> B-Zellen.....	49
<b>Abbildung 32:</b> Postswitch Memory CD38 <sup>+</sup> /CD80 <sup>-</sup> Zellen.....	50
<b>Abbildung 33:</b> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup> /CD95 <sup>-</sup> Zellen.....	51
<b>Abbildung 34:</b> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup> /CD95 <sup>+</sup> Zellen.....	52
<b>Abbildung 35:</b> Postswitch Memory CD38 <sup>+</sup> /CD95 <sup>-</sup> Zellen.....	53

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Beispiele für Mustererkennungsmoleküle .....	3
<b>Tabelle 2:</b> Komplementproteine und Funktionen .....	9
<b>Tabelle 3:</b> Zytokinfamilien und deren Funktionen .....	10
<b>Tabelle 4:</b> T-Zell-Subtypen .....	14
<b>Tabelle 5:</b> Antikörper-Isotypen .....	19
<b>Tabelle 6:</b> Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper .....	32
<b>Tabelle 7:</b> Antikörperansätze .....	33
<b>Tabelle 8:</b> Messergebnisse .....	42

# Einleitung

## **1.1 Grundlagen des Immunsystems**

Die zentrale und physiologische Funktion des Immunsystems liegt in der Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen und schädlichen Eindringlingen von außen, welche durch eine entsprechende Immunreaktion bekämpft werden müssen. Darüber hinaus kann es krankhafte Körperzellen erkennen und ausschalten.

Kommt es zu Fehlern in diesem Unterscheidungsprozess, so können unverhältnismäßige (z. B. Allergie) oder fehlgerichtete (z. B. Autoimmunität) Immunantworten dem Organismus auch erheblichen Schaden zufügen. **[1]**

Während praktisch alle mehrzelligen Organismen über unspezifische Mechanismen zur Abwehr von Mikroben verfügen, findet man ein adaptives Immunsystem nur bei Vertebraten. **[2]**

Jede Art der Immunantwort, sei diese spezifisch oder unspezifisch, erfordert zuerst das Erkennen des Pathogens als solches, erst dann kann eine Reaktion mit dem Ziel der Elimination erfolgen. **[3]**

### **1.1.1 Natürliche Immunität [2]**

Das natürliche Immunsystem (auch angeborenes oder unspezifisches Immunsystem) umfasst die entwicklungsgeschichtlich ältesten Mechanismen zur Erregerabwehr und entspricht prinzipiell dem Immunsystem von Invertebraten. Seine Rolle besteht vor allem in der schnellen Erstreaktion auf Infektionen und der Aktivierung der spezifischen Abwehr. Physikalische oder chemische Barrieren wie Epithelien und antimikrobielle Substanzen, welche von den Epithelien sezerniert werden, zählen ebenso zur natürlichen Immunität wie Phagozyten, natürliche Killerzellen (NK Zellen), das Komplementsystem, sowie Entzündungsmediatoren und Zytokine.

Man geht davon aus, dass ca. 80-90% aller Infektionsereignisse eines Menschen alleine durch Mechanismen der natürlichen Immunität erfolgreich bekämpft werden [4].

Kennzeichen einer unspezifischen Immunantwort ist, dass sie sich nicht gegen sehr spezifische Strukturdetails eines speziellen Pathogens richtet, sondern gegen Strukturen, die ganzen Gruppen von Mikroben gemein sind (sogenannte Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs). Die Rezeptoren zur Erkennung der PAMPs sind genetisch determiniert und nicht klonal, d. h. die Rezeptoren innerhalb einer Zelllinie sind ident und insgesamt von begrenzter Vielfalt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über verschiedene Mustererkennungsproteine (welche entweder zellgebunden bei Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Endothelzellen etc. oder auch gelöst im Plasma vorkommen) und deren Liganden.

Cell-associated pattern recognition receptors	Location	Specific examples and their PAMP ligands
Toll-like receptors	Plasma membrane and endosomal membranes of dendritic cells, phagocytes, endothelial cells, and many other cell types	TLRs 1-9: Various bacterial and viral molecules
C-type lectins	Plasma membranes of phagocytes	Mannose receptor: Microbial surface carbohydrates with terminal mannose and fructose
		Dectin: Glucans present in fungal cell walls
Scavenger receptors	Plasma membranes of phagocytes	CD36: microbial diacylglycerides
NLRs	Cytoplasm of phagocytes and other cells	Nod1, Nod2 and NALP3: bacterial peptidoglycans
<i>N</i> -formyl Met-Leu-Phe receptors	Plasma membranes of phagocytes	FPR and FPRL1: peptides containing <i>N</i> -formylmethionyl residues

Soluble recognition molecules	Location	Specific examples and their PAMP ligands
Pentraxins	Plasma	C reactive protein (CRP): Microbial phosphorylcholine and phosphatidylethanolamine
Collectins	Plasma	Mannose-binding lectin (MBL): Carbohydrates with terminal mannose and fructose
	Alveoli	Surfactant proteins SP-A and SP-D: Various microbial structures
Ficolins	Plasma	Ficolin: <i>N</i> -acetylglucosamine and lipoteichoic acid components of the cell walls of gram-positive bacteria

**Tabelle 1:** Beispiele für Mustererkennungsmoleküle. TLR, Toll-Like-Receptor; NLR, Nod-Like Receptor. (mod. nach [2])

PAMPs können beispielsweise Nukleinsäuren, Proteinstrukturen, komplexe Fette oder Kohlenhydrate sein, wobei diese Zielstrukturen ausschließlich von Mikroben produziert werden und nicht in den Zellen des eigenen Organismus vorkommen. Häufig stellen diese PAMPs für die Mikroben lebenswichtige Strukturen dar, was die Effektivität des Systems erhöht. Das angeborene Immunsystem kann also auf Grund seiner genetisch vererbten Spezifität für mikrobielle Strukturen zwischen Selbst und Fremd unterscheiden, im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, dessen Zellen auf Autoreaktivität getestet und gegebenenfalls aktiv eliminiert werden müssen.

### 1.1.1.1 Epithelien

Epithelien sind physikalische Barrieren zwischen der Umwelt - mit all ihren potentiell schädigenden Einflüssen - und dem Organismus. Die drei wichtigsten Kontaktflächen zur Umgebung stellen die Haut und die Schleimhäute des Gastrointestinal- und Respirationstraktes dar.

Die Unversehrtheit der Epithelzellen und der interzellulären Tight Junctions sind Voraussetzung um den Eintritt von Erregern ins Gewebe zu verhindern. Dennoch müssen z. B. die Epithelien des Darmes durchlässig zur Resorption von Nahrung und Flüssigkeit sein, was ein ausgeklügeltes System erfordert. [5]

Um die Schutzfunktion der Epithelien zu verbessern, können sie, ebenso wie z. B. Granulozyten, antimikrobielle Peptide produzieren.

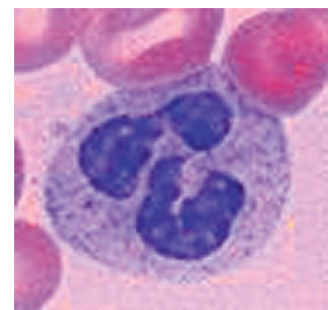
### 1.1.1.2 Phagozyten

Die Phagozytose ist ein Vorgang, bei dem externes Material in das Innere einer Zelle aufgenommen wird. Bereits primitivste Lebewesen wie etwa Bakterien, bedienen sich dieser Methode, allerdings hauptsächlich zur Nahrungsaufnahme in die Zelle. Bei höheren Lebewesen wie dem Menschen, sind Phagozyten ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems mit der Aufgabe, Pathogene (aber auch inerte Teilchen wie z. B. eingeatmeten Staub) aufzunehmen und unschädlich zu machen. Nach der Aufnahme der Erreger in die Zelle verbinden sich Lysosomen (intrazytoplasmatische Vesikel mit antimikrobiellen Enzymen und aggressiven Sauerstoff-Metaboliten) mit dem phagozytierten Material zum Phagolysosom und sorgen für die Abtötung und Aufspaltung der Keime. [4]

Darüber hinaus können Phagozyten auch mittels Zytokinsekretion andere Immunzellen aktivieren und die Immun- bzw. Entzündungsreaktion beeinflussen. Generell arbeitet das natürliche Immunsystem eng mit dem adaptiven Immunsystem zusammen, Zellen der erworbenen Immunität können z. B. Phagozyten aktivieren oder auch Pathogene „markieren“ (Opsonisierung), damit diese besser vom natürlichen Immunsystem erkannt werden [2] und umgekehrt präsentieren die Phagozyten dem adaptiven Immunsystem aufgenommene Keime und lösen damit eine spezifische Reaktion aus.

Die wichtigsten phagozytierenden Zellen sind neutrophile Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen, die sich allesamt von myeloischen Stammzellen im Knochenmark ableiten.

**Neutrophile Granulozyten** sind die zahlreichsten Leukozyten im peripheren Blut. Neben dem charakteristischen segmentierten Zellkern enthält das Zytoplasma der Neutrophilen spezifische Granula, welche aggressive Enzyme wie Lysozym, Kollagenase und Elastase enthalten und auch unspezifische Granula mit anderen antimikrobiellen Substanzen wie Defensinen und Cathelicidinen. Neutrophile Granulozyten sind kurzlebige



**Abbildung 1:** Neutrophiler Granulozyt (aus [2])

Phagozyten und überleben nur wenige Stunden im Blut. Im Falle einer Infektion wandern sie - angelockt durch Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen und

Chemokine - aus den Blutgefäßen an den Ort des Geschehens aus und werden dort aktiv.

**Monozyten** weisen - bedingt durch die Abstammung von einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark - auch viele Eigenschaften der Neutrophilen auf. Teilweise finden sich auch die gleichen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die für die Rekrutierung in Entzündungsgebiete und die Aktivierung notwendig sind. [6]

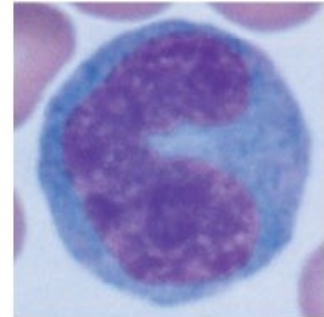


Abbildung 2: Monozyt (mod. nach [2])

Nach einigen Tagen, die sie im Blut zirkulieren, wandern die Monozyten in die verschiedensten Gewebe aus und differenzieren sich dort in Makrophagen mit unterschiedlichen, für das Zielgewebe typischen Eigenschaften und Morphologien aus. Im Unterschied zu den Neutrophilen überleben Makrophagen wesentlich länger am Infektionsort und haben noch die Fähigkeit zur Zellteilung. Während einer Entzündung können sich Monozyten auch zu dendritischen Zellen entwickeln. [7]

**Dendritische Zellen** zählen neben den Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten zu den sogenannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen, d. h. sie nehmen Mikroben mittels Phagozytose auf, um sie dann in kleine Fragmente zu zerlegen und so weiterzuverarbeiten, dass sie vom spezifischen Immunsystem (im Speziellen T-Lymphozyten) erkannt und bekämpft werden können. [8]

### 1.1.1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen neben den B- und T-Zellen eine dritte Gruppe von Lymphozyten dar (etwa 5-15% aller Lymphozyten), die jedoch, im Gegensatz zu den anderen beiden, Bestandteil der natürlichen Immunabwehr sind. [4]

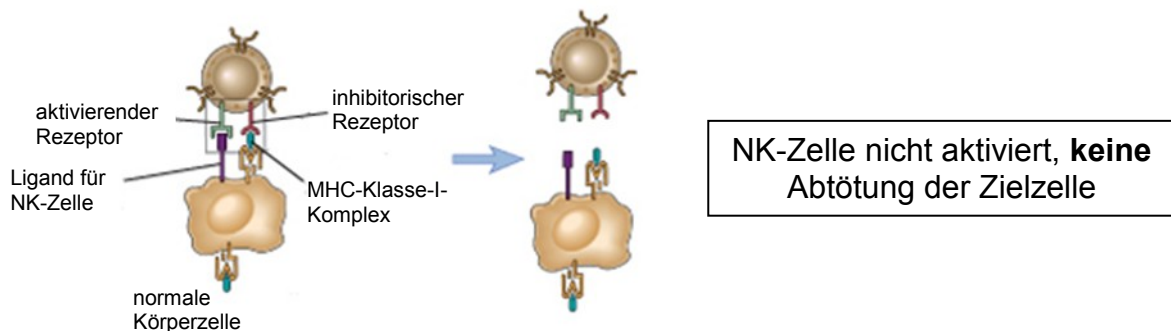
Der Name „natürliche Killerzellen“ leitet sich von der Fähigkeit dieses Zelltyps ab, unter bestimmten Voraussetzungen ohne weitere Aktivierung von außen Zielzellen zu eliminieren (im Unterschied zu zytotoxischen T-Lymphozyten).

Die NK-Zellen richten sich insbesondere gegen virusbefallene und maligne entartete Zellen, wobei die Identifikation der Targetzellen über spezielle

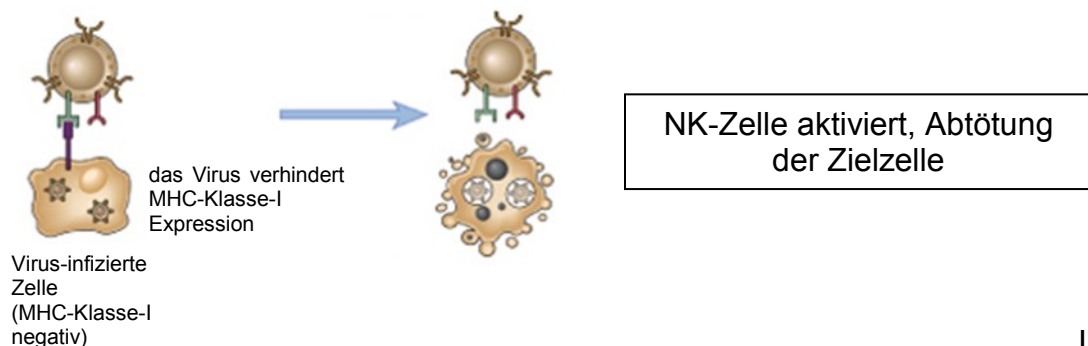
aktivierende und inhibierende Rezeptoren erfolgt. Diese Rezeptoren unterscheiden sich grundlegend von den B- und T-Zellrezeptoren, da sie in der Keimbahn determiniert sind und keine Rekombination durchlaufen. [9]

Neben einer Reihe von aktivierenden Rezeptoren an der Zelloberfläche der NK-Zellen, die an infizierte oder anomale Zellen binden, existieren MHC-Klasse-I-spezifische inhibierende Rezeptoren (iNKRs), welche eine zytotoxische Reaktion auf Zellen, die ausreichend MHC-Klasse-I Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren, verhindern. MHC steht für Major Histocompatibility Complex. Dabei handelt es sich um eine Reihe von Proteinen, die sich an der Oberfläche jeder gesunden Körperzelle finden und für die Erkennung einer Zelle als Selbst von entscheidender Bedeutung sind. Die inhibitorischen Signale dieser iNKRs sind dominant gegenüber den aktivierenden Signalen und verhindern die Zytolyse (siehe Abbildung 3). [10]

### A. Inhibitorischer Rezeptor besetzt



### B. Inhibitorischer Rezeptor frei



**Abbildung 3:** Aktivierende und inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen. **A.** Aktivierende Rezeptoren erkennen Liganden auf Zielzellen, werden aber durch die dominanten inhibitorischen Rezeptoren, die den MHC-Klasse-I-Komplex auf der gesunden Zelle erkannt haben, übertrumpft. **B.** Durch Virusinfektion wird kein MHC-Klasse-I-Komplex mehr auf der Zelloberfläche exprimiert, die Aktivierung der NK-Zellen folglich nicht gehemmt und die Zielzelle zerstört. (mod. nach [2])

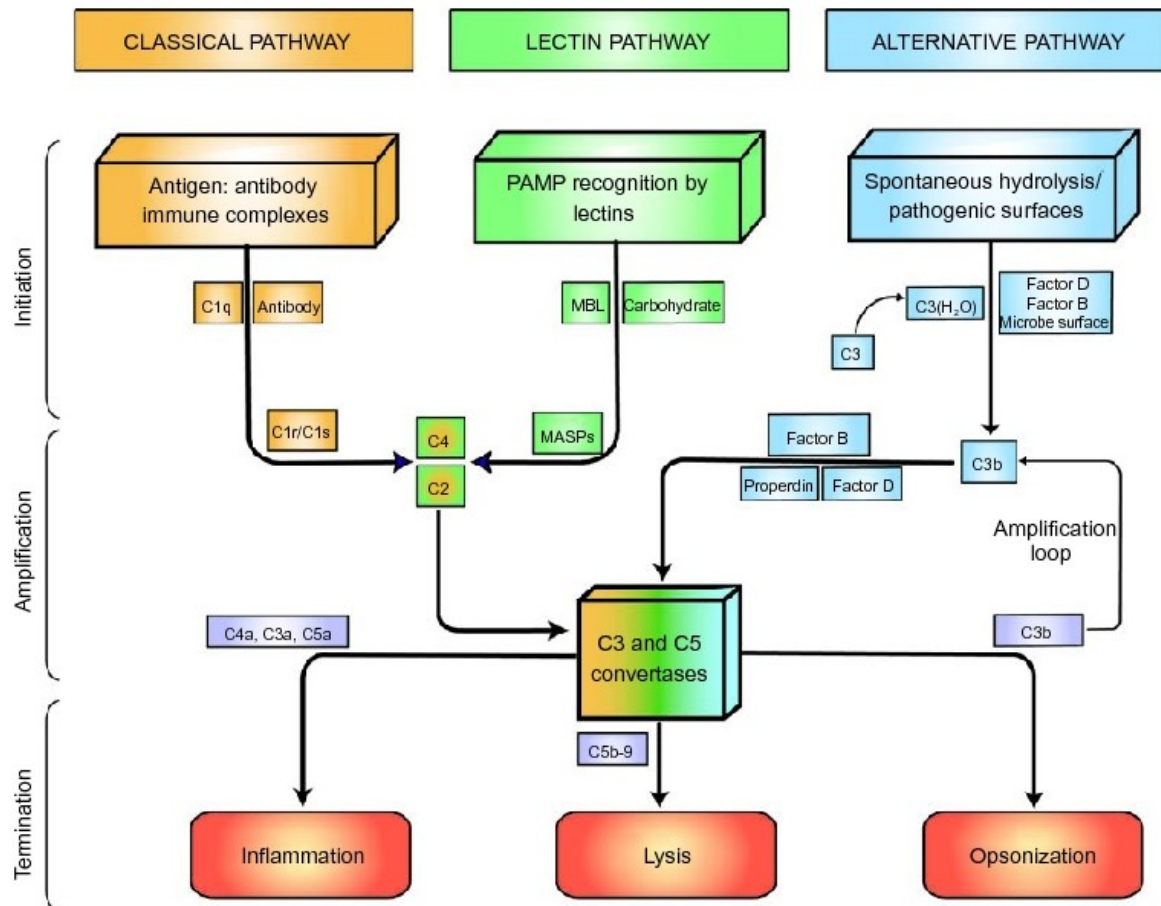
st nach der oben beschriebenen Prüfung das Todesurteil über eine Zelle gefallen, bringen NK-Zellen Granula mit sogenannten Perforinen zum Einsatz, welche die Zellmembran der Targetzelle durchgängig für eine zweite Art von Enzymen - die Granzyme - machen. Granzyme dringen in das Zytosol der Zielzellen ein und induzieren dort die Apoptose, also den programmierten Zelltod. Neben der direkten Zytotoxizität produzieren NK-Zellen auch Interferon- $\gamma$ , ein Zytokin, das zur Aktivierung von Makrophagen führt und diese zur Abtötung von phagozytiertem Material anregt. NK-Zellen sind besonders wichtig für die schnelle Reaktion auf Infektionen mit intrazellulären Keimen, bis es zur Ausbildung einer adaptiven Immunreaktion kommt. [2]

#### **1.1.1.4 Komplementsystem**

Als Komplement bezeichnet man ein System von mittlerweile mehr als 30 bekannten Proteinen im Blutplasma und auf Zelloberflächen, die in ihrer Gesamtheit eine Reaktionskaskade bilden, welche pathogene Oberflächen erkennt und als Antwort darauf Entzündungsmediatoren bildet, Pathogene opsonisiert und damit für das Immunsystem angreifbar macht und darüber hinaus über die Bildung eines Membrane Attack Complex (MAC) auch selbst die Lyse von Zielzellen herbeiführen kann. [11]

Die neun im Serum gelösten Komplementfraktionen werden mit C1 bis C9 bezeichnet.

Eine Aktivierung des Komplementsystems ist über drei verschiedene Wege möglich: klassischer Weg, alternativer Weg und Lectinweg.



**Abbildung 4:** Aktivierungswege des Komplementsystems. Klassischer Weg: antikörpervermittelt; Lectinweg: über Mannose-Bindendes-Lectin (MBL) vermittelt; alternativer Weg: aktiviert durch direkte Erkennung von mikrobiellen Oberflächenstrukturen. (aus [11])

Die klassische Aktivierung beginnt, wenn C1 IgM- oder bestimmte IgG-Antikörper gebunden an Fremdstrukturen detektiert.

Der alternative und der Lectinweg stammen phylogenetisch aus der Zeit vor der Entwicklung des adaptiven Immunsystems. Beide kommen daher ohne die Unterstützung durch Antikörper aus. Die Komplementaktivierung auf dem alternativen Weg wird durch das direkte Erkennen von pathogenen Oberflächen getriggert, der Lectinweg führt über sogenanntes Mannose-Bindendes-Lectin (MBL), welches Mannose auf mikrobiellen Glykopeptiden und Glykolipiden bindet und daraufhin ein Protein aus dem klassischen Weg aktiviert.

Der entscheidende und allen Aktivierungswegen gemeinsame Schritt in der Reaktionskaskade ist die Spaltung von C3 (in C3a und C3b), dem wichtigsten

Opsonierungsprotein und Ausgangspunkt für Zytolyse und Entzündungsmediation (siehe Abbildung 4). [12]

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Komplementproteine und deren Effektorfunktionen:

	<b>C3a</b>	<b>C3b</b>	<b>C5a</b>	<b>C5b-C9</b>
<b>Effektorfunktion</b>	Entzündung	Opsonisierung und Phagozytoseinduktion	Entzündung	MAC, Zytolyse

**Tabelle 2:** Komplementproteine und Funktionen. (nach [2])

Das C3b Fragment bindet an die Oberfläche des Erregers und dient als Opsonin, während C3a und C5a die Entzündungsreaktion vorantreiben. C5b veranlasst die Gruppierung der Faktoren C6-C9 zum MAC in den mikrobiellen Zellmembranen, wodurch diese löchrig werden und infolge des Wassereinstroms entlang des osmotischen Druckgradienten platzen.

Außerhalb des Komplementsystems existieren noch weitere Gruppen von löslichen Plasmaproteinen, die Mikroben erkennen können und das natürliche Immunsystem unterstützen. Dazu zählen die Pentraxine (z. B. das C-Reaktive Protein, CRP), Kollektine und Fikoline.

### 1.1.1.5 Zytokine

Zytokine sind Signalmoleküle, die von Leukozyten aber auch von anderen Körperzellen sezerniert werden. Sie spielen sowohl in der natürlichen, wie auch in der erworbenen Immunität eine Rolle und vermitteln verschiedenste Reaktionen der Immunzellen bei Infektionen. Dazu zählen die Aktivierung und Differenzierung insbesondere von Lymphozyten, aber auch die Anregung von hämatopoietischen Zellen. Tabelle 3 zeigt eine Einteilung der zahlreichen Zytokine in sechs Hauptgruppen und deren Funktionen.

Zytokinfamilie	Funktion
Interleukine IL-1 bis IL-26	Signalübertragung zwischen Leukozyten
Interferone IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$	Schutz gegen intrazelluläre Pathogene
Colony Stimulating Factors, CSFs	veranlassen die Produktion verschiedener Leukozytenpopulationen
Chemokine	Migration und Aktivierung von Immunzellen
Tumornekrosefaktoren TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	beteiligt an Entzündungsreaktionen
Transforming Growth Factors, TGFs	vermitteln Zellwachstum

**Tabelle 3:** Zytokinfamilien und deren Funktion (mod. nach [13])

Häufig wirken Zytokine lokal am Ort der Entzündung (auto- oder parakrin), manche werden aber in ausreichend großen Mengen produziert, dass sie systemische Wirkungen zeigen (z. B. TNF). Der Effekt wird über sehr spezifische Zytokinrezeptoren vermittelt, die sich aber häufig auf mehreren verschiedenen Zelltypen finden.

Jene Zytokine, die für die natürliche Immunität von Bedeutung sind, werden in der Mehrheit von aktivierten Makrophagen sezerniert, als wichtige Vertreter können TNF und IL-1 (Entzündungsmediatoren), Chemokine (Lockstoffe für Leukozyten), IL-12 und IL-18 (stimulieren IFN $\gamma$ -Produktion) genannt werden.

## 1.1.2 Spezifische Immunität [2]

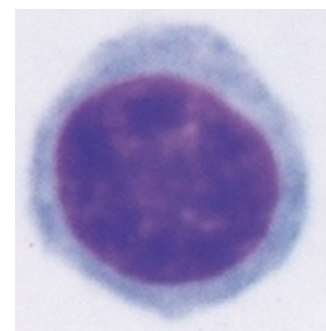
Kennzeichnend für das spezifische Immunsystem ist, dass sich seine Abwehrfunktion gegen ein bestimmtes Pathogen (Antigen) erst durch dessen Anwesenheit aktivieren und sich auf dieses spezielle Antigen adaptieren (daher auch die Bezeichnung adaptives oder erworbenes Immunsystem). Diese Adaptierungsprozesse erfordern beim ersten Kontakt mit einem Pathogen relativ viel Zeit (ca. eine Woche), kommt der Organismus jedoch zu einem späteren Zeitpunkt erneut mit dem gleichen Antigen in Kontakt, so verfügt das erworbene Immunsystem über ein Gedächtnis, das eine wesentlich schnellere und effektivere zweite Immunantwort ermöglicht, die sich mit jedem weiteren Kontakt noch verstärkt.

Die Antigenrezeptoren des spezifischen Immunsystems sind nicht vererbt, sondern entstehen durch somatische Genrekombination, was eine unheimlich große Vielfalt bewirkt. Trotz dieser zufälligen Generierung von Rezeptoren gegen alle denkbaren Epitope (Angriffspunkte der Rezeptoren) auf Antigenen, kann das adaptive Immunsystem eines Gesunden zwischen Fremd (Immunreaktion) und Selbst (immunologische Toleranz) unterscheiden. Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu Störungen in diesem Unterscheidungsprozess.

Die Hauptdarsteller in der spezifischen Immunabwehr sind die Lymphozyten.

### 1.1.2.1 Lymphozyten

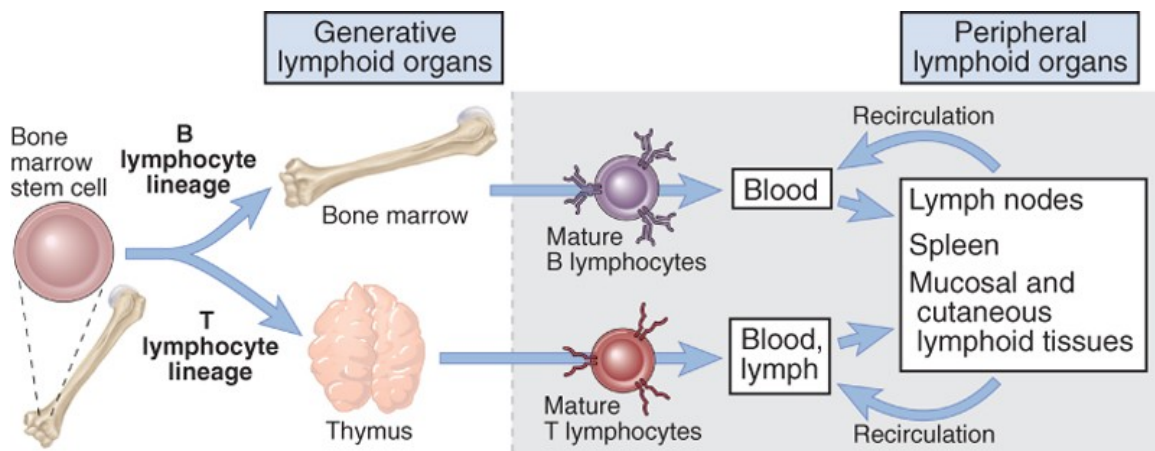
Lymphozyten stellen etwa 25-40% der Leukozyten im peripheren Blut und sind morphologisch eine sehr einheitliche Gruppe von Zellen (Abbildung 5), die sich jedoch bei genauerer Betrachtung aus zahlreichen Subpopulationen mit vielfältigen (oft noch nicht vollständig geklärten) Funktionen zusammensetzt.



**Abbildung 5:** Lymphozyt im peripheren Blutausstrich (mod. nach [2])

Die beiden Hauptgruppen von Lymphozyten, die für die adaptive Immunität verantwortlich sind, nennt man B- und T-Zellen. Auch sie werden im Knochenmark gebildet, entwickeln sich dann direkt im Knochenmark (B-Zellen) oder im Thymus (T-Zellen) zu reifen Lymphozyten und wandern anschließend ins Blut und in die

peripheren lymphatischen Organe aus, wo sie auf den Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen warten.

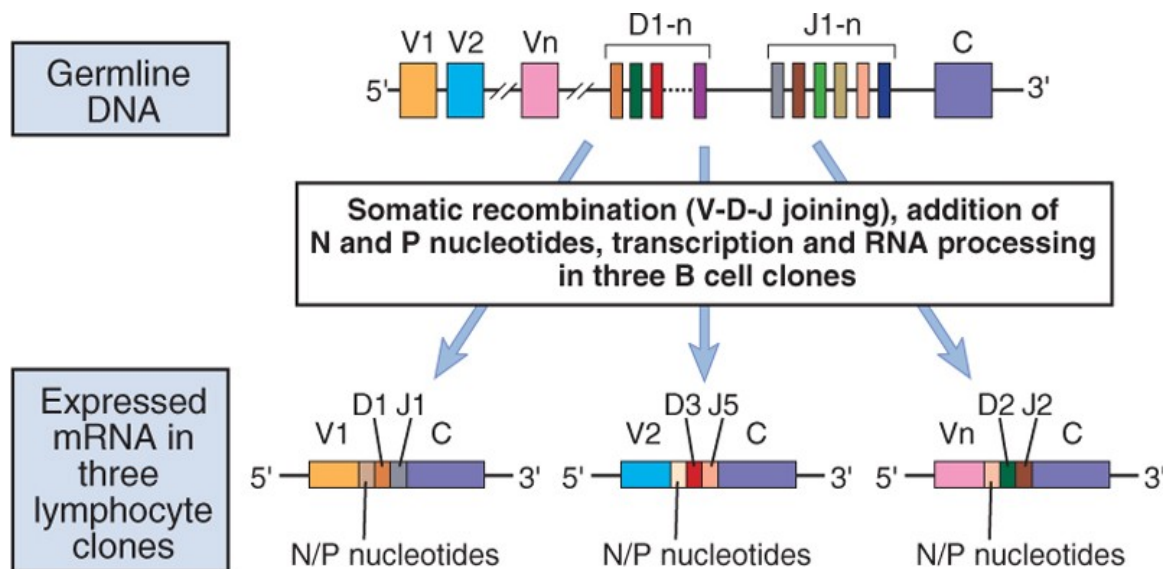


**Abbildung 6:** Reifung der Lymphozyten. Reife B- und T-Zellen wandern aus den generativen lymphatischen Organen in die Peripherie und warten auf Antigenkontakt. (nach [2])

Die Vielfalt an Antigenrezeptoren (das sogenannte immunologische Repertoire) entwickelt sich unter anderem durch den bemerkenswerten Umstand, dass die für die Rezeptoren kodierenden Gene aus verschiedenen variablen Segmenten (Variable V, Diversity D und Joining J) bestehen, welche erst im Zuge der Lymphozytenreifung zufällig zu einem funktionellen Gen kombiniert werden. [14]

Diesen Vorgang nennt man daher V(D)J-Rekombination, er findet ausschließlich in B- und T-Lymphozyten statt und wird von den Enzymen Rag1 und Rag2 (Recombination Activation Genes) vermittelt [15]. Dies ist der einzige bekannte Prozess, bei dem physiologisch die Erbinformation einer somatischen Körperzelle verändert wird.

Um die Vielfalt der Rekombinationsprodukte noch weiter zu erhöhen, werden an den Verbindungsstellen zwischen den neu kombinierten Segmenten zufällig Nukleotide eingefügt oder ausgeschnitten (junktionale Diversifizierung) [16]. Auf diese Art und Weise können aus ein und derselben Erbinformation ca.  $10^7$  verschiedene B- bzw. T-Zellklone mit individuellen Antigenrezeptoren entstehen.



**Abbildung 7:**Vielfalt von Antigenrezeptoren. Die DNA jeder Körperzelle enthält die Erbinformation für mehrere Varianten der V-, D- und J-Sequenzen eines Antigenrezeptorgens. Durch somatische Rekombination und zufällige Änderungen an den Verbindungsstellen entstehen über  $10^7$  verschiedene Rezeptoren. (mod. nach [2])

Die **Klon-Selektionstheorie** wurde in den 1950er Jahren von Jerne [17] und Burnet [18] begründet und stellt bis heute ein fundamentales Konzept zum Verständnis des erworbenen Immunsystems dar. Die Kernaussage besteht darin, dass die durch oben beschriebene Rekombination entstandenen Lymphozytenklone (Zellen, die von einer gemeinsamen Mutterzelle abstammen und daher über idente Antigenrezeptoren verfügen) vor Antigenkontakt in relativ geringer Anzahl vorhanden sind, aber durch Antigenbindung an ihrem spezifischen Rezeptor selektiv zur Zellteilung angeregt werden und sich rasch vermehren, um mit der Infektion schritthalten zu können.

## T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten verdanken ihren Namen dem Ort ihrer Reifung, also dem Thymus. Durch chemotaktische Signale wandern Lymphozytenstammzellen in dieses Organ ein und beginnen mit der Produktion der sogenannten Thymozyten. Die Thymozyten durchlaufen auf ihrem Weg zum reifen T-Lymphozyten mehrere Entwicklungsstadien, wobei die unreifen Vorstufen in der Rindenregion des Thymus anzutreffen sind, die reiferen in der Medulla. [3]

Der Thymus ist auch der Ort der TCR (T Cell Receptor)-Genrekombination. Von den unzähligen produzierten T-Zellen mit einzigartigem TCR überleben allerdings

nur 1-2% bis zum Stadium des reifen T-Lymphozyten. Der Grund dafür ist ein rigoroser Selektionsprozess, der nur Thymozyten überleben lässt, die einerseits keine zu starke Affinität zu den im Thymus präsentierten MHC/Peptid-Komplexen haben, damit es zu keinen autoimmunologischen Aktivierungen kommt, andererseits müssen die Zellen aber auch eine minimale Bindungsstärke zum MHC aufweisen, damit sie später ihre immunologische Funktion ausüben können. Bindungen am TCR sind für die T-Zellen ein Überlebenssignal, somit sterben Zellen mit zu geringer Affinität durch Vernachlässigung von selbst ab (positive Selektion). Hyperreaktive T-Zellen werden hingegen durch Apoptoseinduktion eliminiert (negative Selektion). [19]

Wenn eine Zelle diese Überprüfung besteht, verlässt sie als naive T-Zelle (T-Zelle, die noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatte) den Thymus und wandert in die peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten aus.

T-Lymphozyten sind innerhalb des adaptiven Immunsystems für die zelluläre Immunität verantwortlich und können anhand des Aufbaus ihres TCRs in zwei Gruppen unterteilt werden, die  $\alpha\beta$ -T-Zellen und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Innerhalb des wesentlich häufigeren  $\alpha\beta$ -Typus unterscheidet man weiters  $CD4^+$  Helfer-T-Zellen,  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen und die seit kurzem bekannte Gruppe der regulatorischen T-Zellen. Die CD-Nomenklatur (Cluster of Differentiation) wird zur Bezeichnung von Oberflächenantigenen auf Leukozyten verwendet. [2]

In Tabelle 4 sind die T-Zell-Subklassen mit ihren Funktionen, Spezifitäten der Antigenrezeptoren und kennzeichnenden Oberflächenmarkern angeführt:

Klasse		Funktion	TCR spezifisch für	Oberflächenmarker
$\alpha\beta$ -T-Zellen	$CD4^+$ Helfer-T-Zellen	B-Zell Differenzierung Makrophagenaktivierung	Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe	$CD3^+$ $CD4^+$ $CD8^-$
	$CD8^+$ zytotoxische T-Zellen	Lyse von mikrobiell infizierten Zellen und Tumorzellen	Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe	$CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^+$
	regulatorischen T-Zellen	unterdrücken die Funktion anderer T-Zellen (Erhalt der Selbst-Toleranz)		$CD3^+$ $CD4^+$ $CD25^+$
	$\gamma\delta$ -T-Zellen	Helfer- und Zytotoxische Funktionen	Limitierte Spezifität für Peptid- und Nicht-Peptid-Antigene	$CD3^+$ CD4 und CD8 variabel

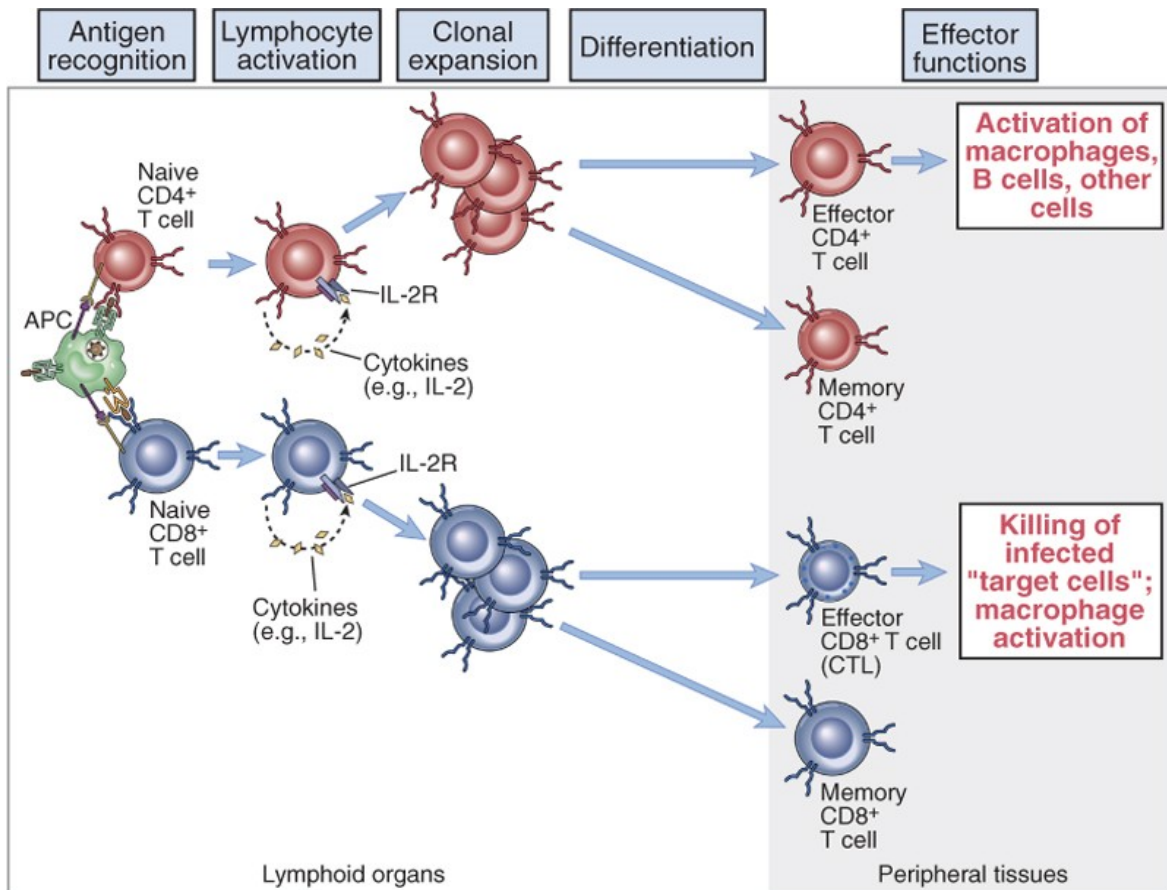
Tabelle 4: T-Zell-Subtypen (mod. nach [2])

In den peripheren lymphatischen Organen können die naiven T-Lymphozyten schließlich auf ihre Antigene treffen, die sie allerdings nur erkennen, wenn sie von antigenpräsentierenden Zellen (APCs, Antigen Presenting Cells) als Peptid-MHC-Komplex auf der Zelloberfläche dargeboten werden. Für den ersten Antigenkontakt im Leben einer T-Zelle ist sogar die Präsentation durch eine dendritische Zelle, die professionellste aller APCs, notwendig. APCs nehmen extrazelluläre Proteinantigene ins Zellinnere auf, verarbeiten diese zu kurzen Proteinabschnitten und externalisieren sie MHC-gekoppelt an der Zellmembran. Erkennt der T-Lymphozyt sein Antigen, muss für eine vollständige Aktivierung zusätzlich noch ein Kostimulationsmolekül (z. B. B7) an der Oberfläche der APC gebunden werden. Der Mechanismus der T-Zellaktivierung mittels Antigenpräsentation erklärt, warum sich T-Lymphozyten nicht direkt gegen lösliche Antigene richten können. **[2]**

Eine Ausnahme stellt die kleine Gruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (<5% aller T-Zellen) dar. Sie verfügen über ein eingeschränktes Rezeptorrepertoire und können auch MHC-unabhängig Antigene erkennen, die auch keine Peptide sein müssen. **[20]**

Im Zuge der antigenabhängigen Aktivierung einer naiven T-Zelle kommt es zytokinvermittelt zur klonalen Expansion und Differenzierung in Effektor und Memory T-Zellen. Einige der Effektorzellen wandern nun in die verschiedensten Gewebe aus und sorgen am Ort der Infektion für die Elimination des Antigens. Die Effektorfunktion der  $CD4^+$  Helfer-Zellen liegt in der Produktion von Zytokinen, die Makrophagen, B-Zellen und andere aktivieren.  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen lysieren direkt infizierte Zellen. (Abbildung 8)

Nach erfolgreicher Bekämpfung der Infektion nimmt die Zahl der T-Zellen des betreffenden Klons wieder stark ab, die Zellen gehen in Ruhestellung (Homöostase). Die Gedächtniszellen persistieren jedoch und können im Fall einer neuerlichen Infektion sofort eine Immunantwort auslösen.



**Abbildung 8:** Phasen der T-Zellantwort. Naive T-Zellen erkennen ihr Antigen auf APCs und werden aktiviert. Es folgt die Vergrößerung des Zellklons und die Differenzierung in Effektor und Gedächtniszellen. (aus [2])

## B-Lymphozyten

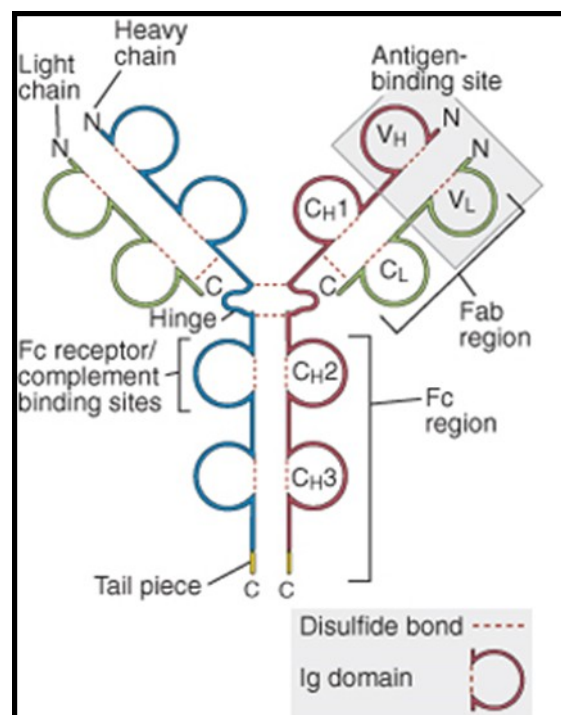
B-Zellen werden in Kapitel 1.2 detailliert besprochen.

## 1.2 B-Lymphozyten

Der Name B-Zellen leitet sich ursprünglich von „Bursa Fabricii“ ab, einem Organ, das bei Vögeln der Reifung dieser Zellen dient. B-Lymphozyten sind für die Produktion von Antikörpern (Ak) und damit für die humorale Immunität gegen extrazelluläre Pathogene verantwortlich.

### 1.2.1 Antikörper [19]

Als Antikörper (oder Immunglobuline, Ig) bezeichnet man bestimmte Y-förmige Glykoproteine, die von B-Zellen synthetisiert werden. Die Enden der beiden Arme dienen der spezifischen Bindung von Antigenen (wobei Antikörper im Gegensatz zu TCRs verschiedenste Substanzklassen wie Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nucleinsäuren und sogar Kunststoffe binden können), der Stamm hingegen vermittelt die Effektorfunktionen und fungiert als Andockstelle für Immunzellen und Effektormoleküle [21]. Diese beiden funktionell unterschiedlichen Abschnitte eines Aks nennt man demnach auch Fab-Region (Fragment of Antigen Binding) und Fc-Region (Constant Fragment). Siehe Abbildung 9.

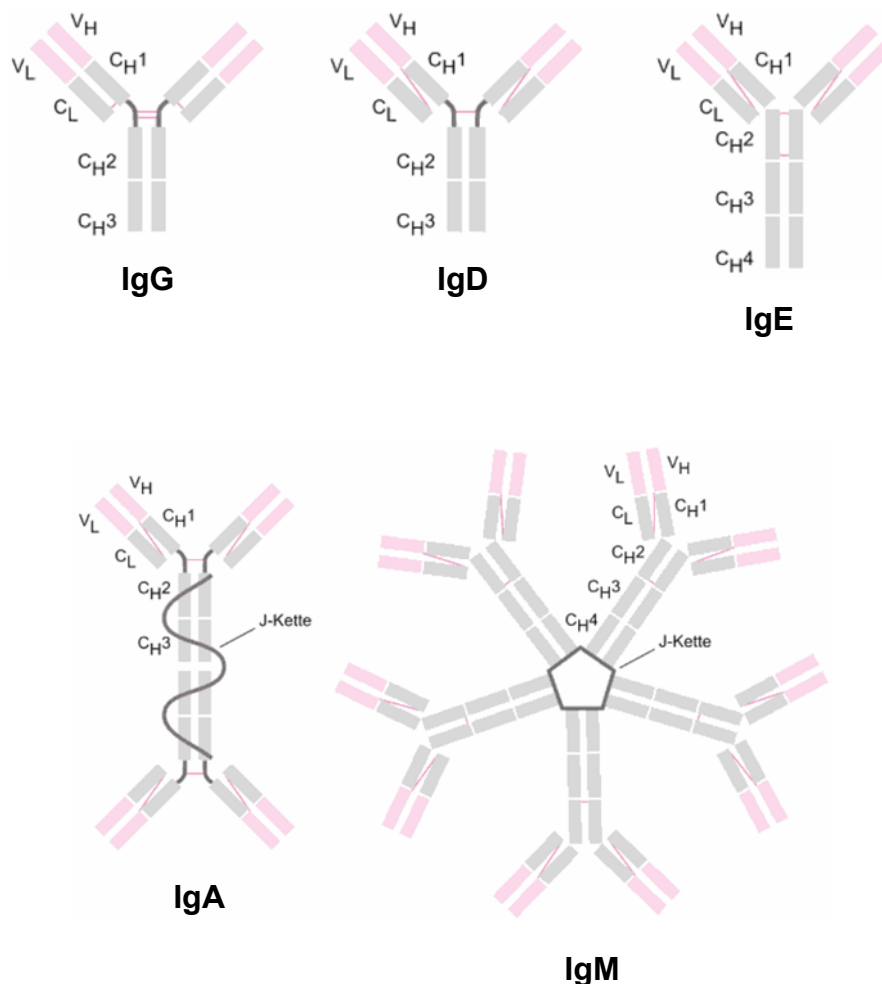


**Abbildung 9:** Struktur eines sezernierten IgG-Antikörpers. V, variable; C, constant; H, heavy (chain); L, light (chain). (mod. nach [2])

Die Grundstruktur jedes Ak setzt sich aus zwei identen Schwer- und zwei identen Leichtketten zusammen, damit verfügen auch beide Arme über eine idente Antigenbindungsstelle. Verbunden sind die einzelnen Ketten untereinander über Disulfidbrücken.

Am Ende der Fab-Regionen finden sich die mit V (Variable) bezeichneten Sequenzabschnitte höchster Variabilität, welche die Antigenbindungsstellen bilden und auf dem Weg der oben beschriebenen somatischen Rekombination entstehen. Die übrigen Regionen eines Ak-Moleküls sind wenig variabel und tragen das Kürzel C (Constant). [22]

Der Stamm des Ak-Proteins kommt nur in fünf bestimmten Formen vor, den sogenannten Isotypen:



**Abbildung 10:** Struktureller Aufbau der Immunglobulin Isotypen. V, variable; C, constant; H, heavy (chain); L, light (chain). (mod. nach [19])

Je nach Entwicklungsstadium einer B-Zelle produziert sie Ak eines bestimmten Isotyps, die Antigen-spezifität der Fab-Region bleibt aber unverändert. Tabelle 5 zeigt einige grundlegenden Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Ak-Isotypen:

Antikörper-Isotyp	Subtypen	Serum-T <sub>1/2</sub> (Tage)	sezernierte Form	Funktionen
<b>IgG</b>	IgG 1-4	23	Monomer	Opsonisierung, Komplementaktivierung, Ak-abhängige zellmedierte Zytotoxizität, neonatale Immunität, Feedback-Hemmung von B-Zellen
<b>IgD</b>	-----	3	-----	naiver B-Zell Rezeptor
<b>IgE</b>	-----	2	Monomer	Abwehr gegen Würmer, allergische Reaktionen vom Soforttyp
<b>IgA</b>	IgA 1,2	6	Dimer	Immunität der Schleimhäute
<b>IgM</b>	-----	5	Pentamer, Hexamer	naiver B-Zell Rezeptor, Komplement Aktivierung

**Tabelle 5:** Antikörper-Isotypen. T<sub>1/2</sub>, Halbwertszeit. (mod. nach [2])

Immunglobuline kommen einerseits gelöst im Plasma und anderen extrazellulären Flüssigkeiten als Effektormoleküle der B-Lymphozyten vor, die gleichen Moleküle verwendet die B-Zelle andererseits aber auch an ihre Zellmembran gebunden als BCR (B Cell Receptor). Dazu wird an den Fc-Teil des Antikörpers eine zusätzliche hydrophobe Aminosäuresequenz angebaut, die dem neuen BCR als Anker in der Plasmamembran dient.

Die Effektorfunktion und die Verteilung eines sezernierten Aks im Organismus sind abhängig vom jeweiligen Isotyp.

Ak vom Typ **IgG** sind die mengenmäßig größte Gruppe der sezernierten Immunglobuline und weisen auch die längste Halbwertszeit im Serum auf. Sie spielen auch für den sogenannten „Nestschutz“ in den ersten Lebenswochen eines Neugeborenen eine wichtige Rolle, da sie diaplazentar übertragen werden können. Die Effektorfunktionen des IgG sind vielfältig, es kann im Sinne der Neutralisation an Antigene binden und deren Andocken an Zielstrukturen verhindern, mittels Opsonisierung Keime für das Immunsystem markieren und - vermittelt durch den Fc-Abschnitt - die Lyse des Antigens veranlassen.

**IgD** wird zusammen mit IgM als naiver BCR exprimiert, kommt aber im Plasma nicht vor.

**IgE** dient in Verbindung mit Mastzellen und eosinophilen Granulozyten der Abwehr gegen Parasiten und ist verantwortlich für allergische Reaktionen vom Soforttyp.

**IgA** zeichnet sich verantwortlich für die Immunität von Schleimhäuten (besonders durch Neutralisation von ubiquitären Keimen) und kommt zudem noch in der Muttermilch vor.

Membrangebundenes **IgM** schließlich ist ein Marker für naive B-Zellen und wird daher im Rahmen einer Immunreaktion als erstes sezerniert. Es ist ein hochpotenter Aktivator des Komplementsystems.

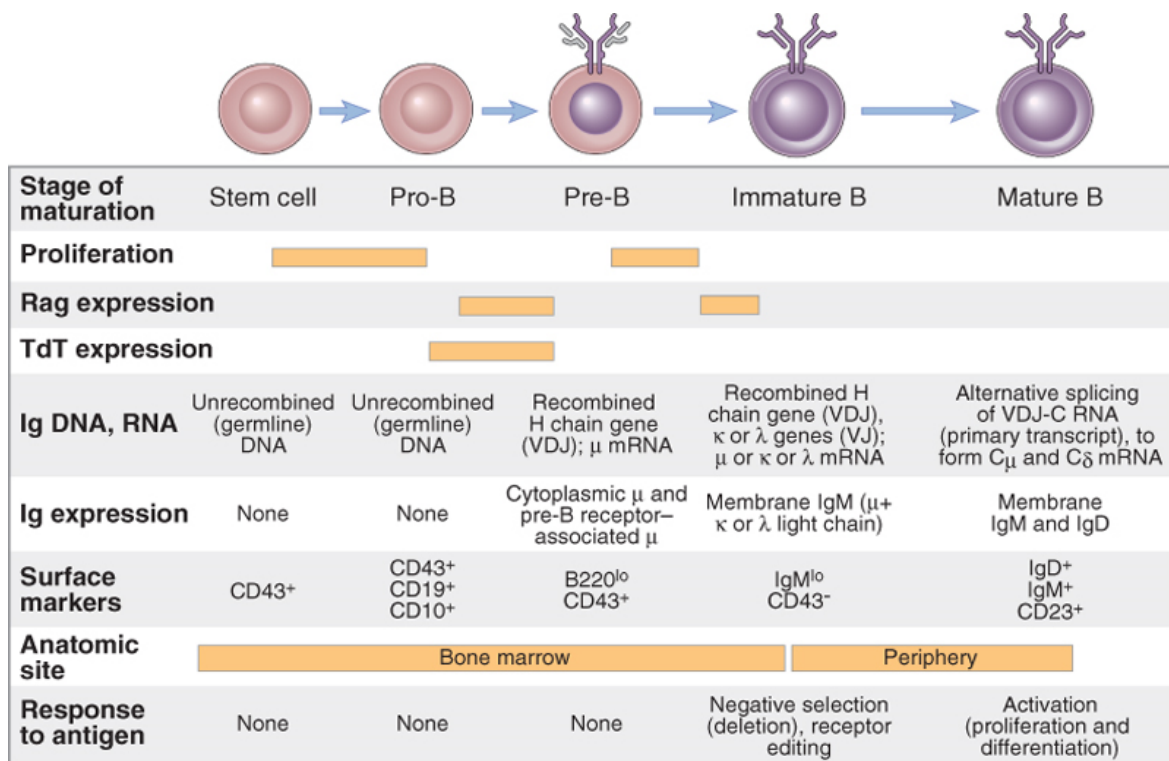
## **1.2.2 Entwicklung der B-Zellen**

### **1.2.2.1 Zentrale B-Zellreifung [2],[23]**

Der Ort der B-Zellbildung und Reifung ist das Knochenmark, während der Fetalperiode auch die Leber. Ausgehend von einer gemeinsamen hämatopoietischen Stammzelle werden im Knochenmark über spezifische Transkriptionsregulatoren die Weichen in Richtung B- oder T-Zellentwicklung gestellt.

Die gesamte B-Zellreifung im Knochenmark findet antigenunabhängig statt. Als erste Form, die auf Grund ihrer CD19-Expression der B-Zelllinie zugeordnet werden kann, ist die Pro-B-Zelle zu nennen. Sie verfügt noch über kein Ig, dessen Bildung aber in der weiteren Entwicklung der B-Lymphozyten große Bedeutung zukommt.

Der Übergang vom Pro-B zum Prä-B Stadium ist gekennzeichnet durch die erstmalige Aktivität der Rag-Enzyme, die zunächst mit der Rekombination der Schwereketten beginnen. Ist dabei eine funktionsfähige Schwerekette entstanden, spricht man nun von einer Prä-B-Zelle. Die fertige Schwerekette tritt nun erstmals verbunden mit einer sogenannten Surrogat-Leichtkette (nicht rekombinierter Leichtkettensatz) als Prä-BCR an die Zelloberfläche. Wurden diese Schritte erfolgreich ausgeführt, kommt es zur starken Proliferation der Zelle.



**Abbildung 11:** Stadien der B-Zell-Reifung. Die wichtigsten Entwicklungsschritte von der hämatopoietischen Stammzelle bis zur reifen B-Zelle sind dargestellt. (aus [2])

Die Bildung eines funktionsfähigen Prä-BCRs führt außerdem dazu, dass eine Rekombination des Schwerekettenlocus auf dem zweiten vorhandenen Chromosom unterbunden wird. War das Rearrangement des ersten Chromosoms nicht erfolgreich, gibt es sehr wohl noch eine zweite Chance. Dieser Mechanismus der allelischen Exklusion sorgt für den Erhalt der klonalen Spezifität des Rezeptors. Zellen, die auch bei zweimaligem Versuch der Schwerekettenrekombination kein funktionsfähiges Produkt zustande gebracht haben, gehen in die Apoptose.

Als nächster Schritt folgt dann die Rekombination der Leichtkette und deren Verknüpfung mit der fertigen Schwerekette zum membrangebundenen IgM-Ak. In diesem Stadium des unreifen B-Lymphozyten werden die Zellen auf Autoreaktivität getestet. Gegebenenfalls kann die Leichtkette dann ein zweites Mal rekombiniert werden, ansonsten werden die Zellen negativ ausselektiert.

Am Übergang vom unreifen zum reifen B-Lymphozyten beginnen die Zellen als sogenannte transitorische B-Zellen (die sich durch hohe Expression aller typischen B-Zellmarker auszeichnen) das Knochenmark zu verlassen.

### **1.2.2.2 Periphere B-Zellreifung [2],[24]**

Die letzten Schritte zur reifen B-Zelle finden in den peripheren lymphatischen Organen (insbesondere der Milz) statt. Aus den transitorischen Zellen entwickeln sich hier zwei reife Formen, die folliculären und die Marginalzonen (MZ) B-Zellen. MZ B-Zellen sind die zahlenmäßig kleinere Gruppe und finden sich fast ausschließlich in der Marginalzone der Milz. Diese Zellen verfügen über limitierte Antikörperdiversität, können dafür aber sehr schnell auf Mikroben im Blutkreislauf reagieren, indem sie sich zu kurzlebigen antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren.

Die folliculären B-Lymphozyten sind die häufigste B-Zellpopulation im Blut und den peripheren lymphatischen Organen. Sie verdanken ihren Namen dem Ort an dem sie sich vorwiegend aufhalten: den Lymphfollikeln in Milz und Lymphknoten. Folliculäre B-Zellen sind typischerweise in T-Zell-abhängige Immunantworten involviert, nehmen an Keimzentrumsreaktionen (siehe unten) teil und differenzieren sich dann in langlebige Gedächtniszellen oder Plasmazellen.

### **1.2.3 B-Zell-Aktivierung [2]**

Der entscheidende Stimulus für die B-Zell-Aktivierung ist der Kontakt eines naiven B-Lymphozyten mit seinem Antigen, vor allem in den sekundären lymphatischen Organen. Dazu bindet die B-Zelle das Antigen mit ihrem BCR (vom Isotyp IgM oder IgD).

Die Aktivierung kann entweder abhängig von der Hilfe durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Protein-Antigene) oder T-Zell unabhängig geschehen (andere Antigenklassen).

Es kommt primär zur klonalen Expansion, daraufhin entwickeln sich einige der Zellen weiter in die Endstufe einer B-Zelle, die Ak-sezernierende Plasmazelle. Andere Zellen aus dem expandierenden Klon ändern im Rahmen der Keimzentrumsreaktion den exprimierten Ak-Isotyp (Isotyp-Switching), verbessern ihren Ak durch somatische Hypermutation in der Affinitätsreifung oder differenzieren zu Memory-B-Zellen. (Siehe Abbildung 12)

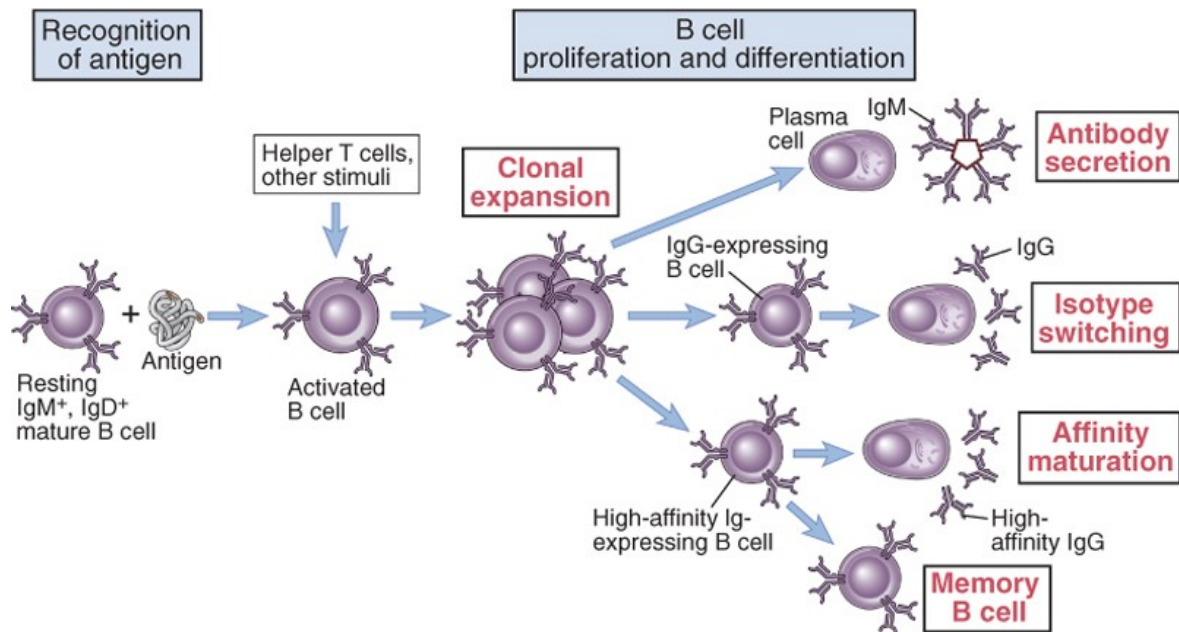


Abbildung 12: Phasen der humoralen Immunantwort. (aus [2])

### 1.2.3.1 T-Zell abhängige Aktivierung und Keimzentrumsreaktion [25],[2]

T-Zell abhängige Antigene erfordern für eine entsprechende Ak-Antwort das Zusammenspiel von T- und B-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen.

Ein Protein-Antigen wird den T-Zellen von dendritischen Zellen präsentiert, woraufhin diese aktiviert werden, an der Oberfläche CD40L (Ligand) exprimieren und in Richtung eines Lymphfollikels zu wandern beginnen. Ebenso werden für dasselbe Antigen spezifische B-Zellen in einem Primärfollikel aktiviert und begeben sich in Richtung der T-Zellregion.

Die B-Zelle präsentiert nun ihr gebundenes und prozessiertes Antigen über ein MHC-Klasse-II-Molekül der passenden T-Zelle, als zweites wichtiges Aktivierungssignal bindet das Membranmolekül CD40 an CD40L.

In weiterer Folge entwickeln sich durch schnelle Proliferation der aktivierten B-Zellen noch in der T-Zell-Zone sogenannte B-Zell-Foci, in denen bereits erste kurzlebige Plasmazellen gefunden werden, die Ak mit geringer Antigenaffinität sezernieren.

Einige Zellen des aktivierten B-Lymphozytenklons wandern zurück in den Lymphfollikel und bilden dort sogenannte Keimzentren. Die folgenden Vorgänge, die der Verbesserung des Ak und der Bildung von Gedächtniszellen dienen, werden als Keimzentrumsreaktion zusammengefasst:

**Klassen-Switch:** Vermittelt durch die Bindung einer aktivierten T-Zelle an das CD40-Oberflächenmolekül des B-Lymphozyten und Zytokine, kommt es bei einigen Zellen des Klons im Keimzentrum zu einem Wechsel des Schwereketten-Isotyps von IgM bzw. IgD zu IgG, IgA oder IgE. Das Schlüsselenzym, das für den Klassenwechsel verantwortlich ist, heißt AID (Activation-Induced Deaminase) und sorgt dafür, dass sich bestimmte Switch-Regionen innerhalb des Schwereketten-genoms aneinanderlagern und schneidet die dazwischenliegenden DNA-Abschnitte heraus. Das Ergebnis ist die Fähigkeit der B-Zelle, Aks einer anderen Ig-Klasse mit neuen Effektorfunktionen produzieren zu können.

**Affinitätsreifung:** Im Keimzentrum erfahren die B-Zellen ein weiteres Mal Mutationen in den Genen, die für die variablen Regionen ihres Ak kodieren. Es handelt sich dabei um eine enorm hohe Rate an Punktmutationen, die etwa  $10^3$ - $10^4$  mal über der Spontanmutationsrate von anderen Körperzellen liegt (daher auch die Bezeichnung somatische Hypermutation).

Diese zufälligen Mutationen verändern die Antigenbindungsstelle des fertigen Aks und können in einigen Fällen zu einer verbesserten Antigenbindung führen. Meist jedoch bewirken die Veränderungen eine Abnahme bzw. den Verlust der Bindungsfähigkeit.

Im nächsten Schritt müssen die B-Zellen mit der höchsten Antigenaffinität ausgewählt werden: In den Keimzentren befinden sich sogenannte folliculäre dendritische Zellen, die den hypermutierten B-Zellen Antigene präsentieren. Können die präsentierten Antigene gut gebunden werden, ist das ein positives Selektionssignal für die B-Lymphozyten, Zellen mit schlechteren Bindungseigenschaften gehen in die Apoptose. Der Selektionsdruck im Keimzentrum wird mit abnehmender Menge an Antigen größer, was am Ende zur Produktion hochaffiner Aks führt.

Nachdem noch weitere Zellen einen Klassenwechsel vollzogen haben, verlassen die B-Lymphozyten schließlich das Keimzentrum und entwickeln sich entweder zu Memory B-Zellen oder zu Plasmazellen, die hochaffine Ak sezernieren und sich nicht weiter teilen. Eine noch mitosefähige Vorstufe der Plasmazellen sind die Plasmablasten.

Plasmazellen, die im Zuge einer Keimzentrumsreaktion entstehen, sind langlebig und können in lymphatischen Geweben extrafollikulär angetroffen werden, die meisten wandern jedoch an den Ursprungsort aller B-Zellen zurück, das Knochenmark. Dort kommen sie auch Monate oder Jahre nach Antigenexposition noch ihrer Hauptfunktion nach und sezernieren Aks, die einen sofortigen Schutz gegen ein wiederkehrendes Pathogen bieten.

Die zweite Gruppe an langlebigen B-Lymphozyten, die der Keimzentrumsreaktion entspringen, sind die Memory-B-Zellen. Sie gehen in einen Ruhezustand über und zirkulieren zwischen Lymphknoten und Milz, bis sie, durch neuerlichen Antigenkontakt geweckt, sehr schnell eine hochaffine Ak-Antwort produzieren.

### **1.2.3.2 T-Zell unabhängige Aktivierung [2]**

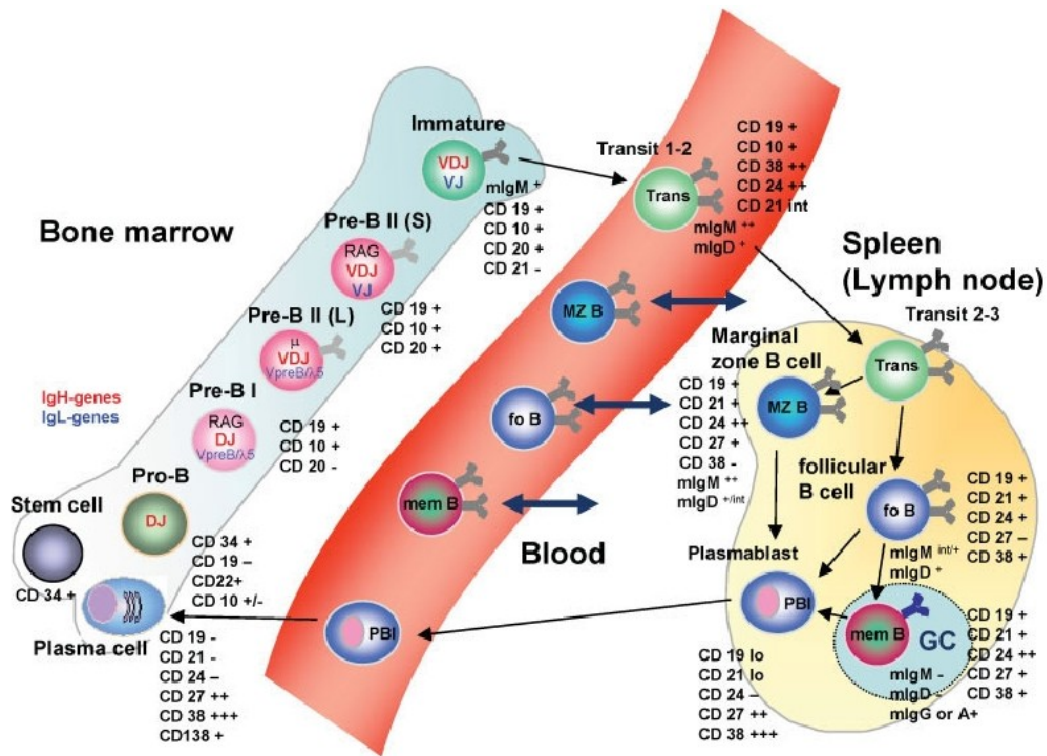
Da T-Lymphozyten ausschließlich Proteinantigene erkennen können, müssen B-Zellen, die andere Antigenklassen als Ziele haben, ohne T-Zell-Hilfe auskommen.

Dies hat allerdings auch zur Folge, dass die beteiligten B-Zellen nicht in Keimzentrumsreaktionen eintreten (sie können also kaum andere Antikörperklassen als IgM produzieren), keine Affinitätsreifung durchlaufen und auch nur über eingeschränktes und kurzfristiges Gedächtnis verfügen.

T-Zell unabhängige Antigene sind häufig solche mit multiplen identischen Epitopen an der Oberfläche (z. B. Polysaccharidketten von bekapselten Bakterien), was dazu führt, dass die B-Zellen mit mehreren BCRs gleichzeitig binden können und damit ein ausreichendes Aktivierungssignal generiert wird.

## 1.2.4 Subtypisierung anhand der Expression von Oberflächenmarkern

Lymphozyten lassen sich auf Grund der Expression von charakteristischen Strukturen an ihrer Zelloberfläche unterscheiden.



**Abbildung 13:** B-Zell-Entwicklung und entsprechende Oberflächenmarker. „Blood“ repräsentiert die zirkulierenden B-Zell-Populationen. fo B, folliculäre B-Zelle; GC, Germinal Center (Keimzentrum); mem B, memory B-Zellen; Pbl, Plasmablast; Trans(it), transitorische B-Zelle. (aus [24])

Während z. B. CD3 ein Marker für T-Zellen ist, erkennt man B-Lymphozyten im peripheren Blut typischerweise an den Membranmolekülen CD19, CD20 und CD21 [26].

Der von uns verwendete B-Zell-Marker CD19 fungiert zusammen mit CD21 und CD81 als B-Zell-Korezeptor und tritt erstmals im Stadium der Prä-B-Zelle an die Oberfläche. Die Expression nimmt allerdings bei den Plasmablasten bereits ab und geht schließlich bei den enddifferenzierten Plasmazellen gänzlich verloren.

Mit Hilfe von Mehrfarben-FACS-Analysen können gleichzeitig mehrere Oberflächenantigene auf einer B-Zelle bestimmt werden, wodurch eine weitere Unterteilung in verschiedene Subtypen möglich wird:

Der Oberflächenmarker CD27 wird von B-Zellen ab dem Zeitpunkt des ersten Antigenkontaktes exprimiert und zum Nachweis von B-Gedächtniszellen verwendet [27]. In Kombination mit membrangebundenem IgD kann weiter in nicht Klassen-gewechselte IgD Memory B-Zellen und Postswitch Memory B-Zellen (IgD<sup>-</sup>) unterteilt werden.

Ein weiteres wichtiges Oberflächenmolekül für die B-Zell-Subtypisierung ist CD38, welches einen guten Marker zur Analyse von B-Zell-Differenzierungsstufen abgibt. Es wird auf B-Zell-Vorläufern stark exprimiert und ist an naiven B-Lymphozyten noch messbar. Memory Zellen zeigen keine CD38-Expression mehr. Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion werden die Zellen erneut CD38 positiv und ab dem Stadium der Plasmablasten ist die Expression wieder hoch. [26]

Anhand der CD24-Expression können transitorische B-Zellen (CD38<sup>++</sup> CD24<sup>++</sup>) von Plasmablasten (CD38<sup>++</sup> CD24<sup>-</sup>) unterschieden werden.

In jüngeren Arbeiten wurden CD27<sup>-</sup> Memory B-Zell-Populationen beschrieben [28], von denen eine CD95<sup>+</sup> Untergruppe vermutlich eine aktivierte Form von Memory Zellen darstellt, die bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnten [29]. CD95 ist der Rezeptor für den sogenannten Fas-Liganden, über den die Apoptoseinduktion vermittelt wird.

Damit B-Lymphozyten T-Zellen aktivieren können, müssen sie neben dem präsentierten Antigen auch Kostimulationsmoleküle exprimieren. Eines davon ist CD80, das auf T-Zellen an CD28 andockt. Für die rheumatoide Arthritis konnte eine erhöhte Frequenz von CD80<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> Memory B-Zellen gezeigt werden [30].

## Probanden/Patienten und Methoden

### 2.1 Probanden- bzw. Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden nach Einholen eines entsprechenden Ethikkommissionsvotums insgesamt 41 freiwillige Probanden (medianes Alter 25 Jahre, Spannweite 20-85 Jahre), davon 14 männlich und 27 weiblich, akquiriert. Dabei wurde das Kollektiv rein nach Verfügbarkeit und den unten angeführten Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt, wobei sich der Großteil aus Studenten und Angehörigen der Medizinischen Universität Graz, sowie durch eine Zusammenarbeit mit der Albert Schweitzer Klinik Graz auch einigen geriatrischen Patienten ergab. In dieser Gruppe von älteren untersuchten Personen fanden sich zum Teil erhöhte CRP- und BSG-Werte, jedoch klinisch keine Hinweise auf eine akute Infektion, die zum Ausschluss hätten führen müssen.

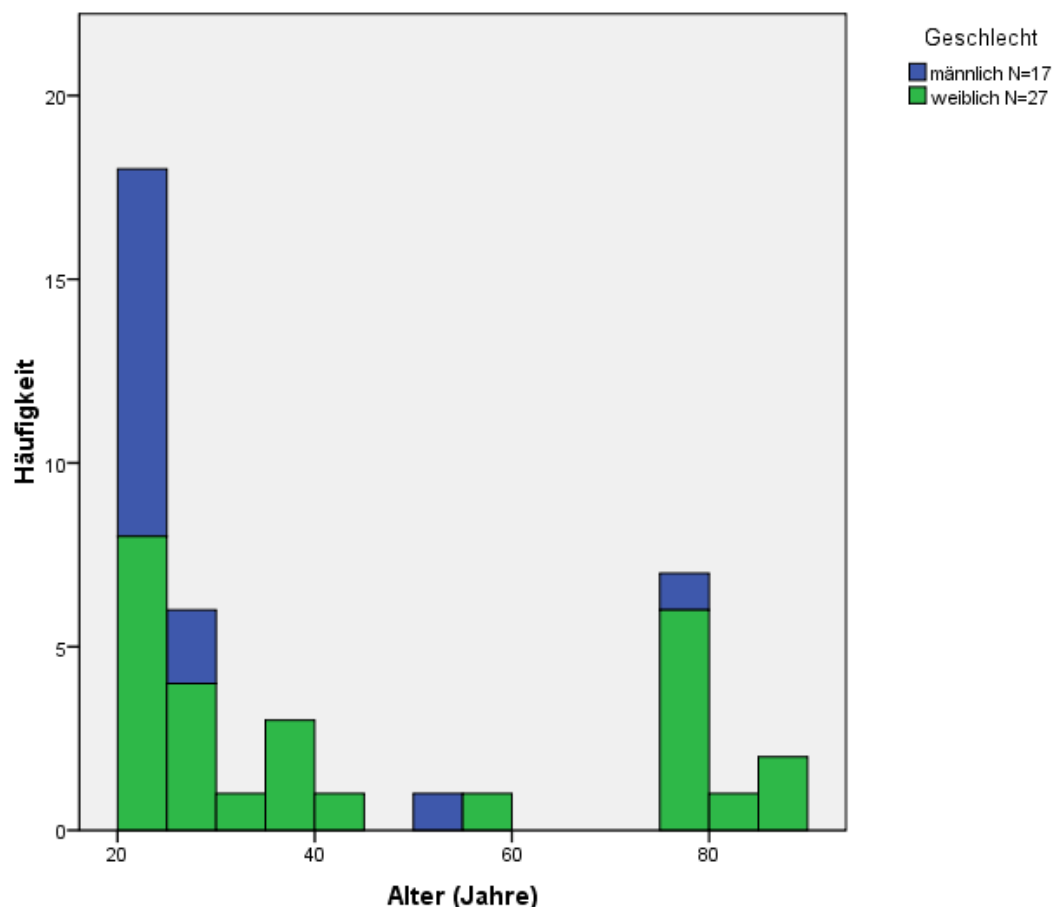


Abbildung 14: Altersverteilung des Probandenkollektivs

## 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

### Einschlusskriterien:

1. Alter von mindestens 19 Jahren ohne Beschränkung nach oben
2. unterzeichnete Einverständniserklärung

### Ausschlusskriterien:

1. keine unterzeichnete Einverständniserklärung
2. Probanden mit aktiver viraler oder bakterieller Infektion
3. Probanden mit Autoimmunerkrankungen
4. Probanden mit einer malignen Erkrankung
5. Probanden mit einem angeborenen Immundefekt
6. Probanden mit Allergien
7. chronische Niereninsuffizienz: Creatinin  $> 1,5$  mg/dL bzw.  
Creatininclearance  $< 30$  mL/min
8. chronische Leberinsuffizienz: GPT, GGT, AP  $> 200\%$  des oberen  
Normbereiches
9. Störungen des Blutbildungssystems
10. Schwangerschaft und Stillperiode

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 PBMC-Isolation

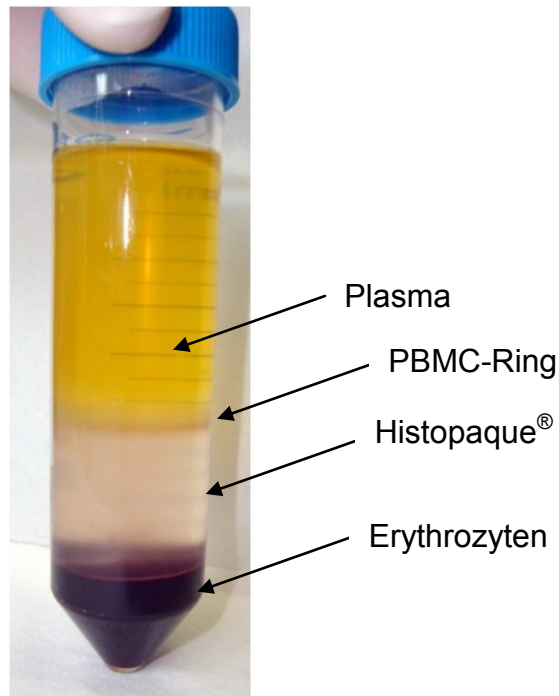
PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sind Zellen des peripheren Blutes mit rundem Zellkern, insbesondere Lymphozyten und Monozyten. Diese dienen als Ausgangspunkt für unsere B-Zell-Analysen.

Von jedem Probanden wurden für die FACS-Analyse zwei Lithium-Heparin Röhren vom Typ VACUETTE<sup>®</sup> zu je 8mL Blut benötigt, deren Analyse jeweils noch am Tag der Blutabnahme erfolgte. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS (Phosphate Buffered Saline; isotone Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4) verdünnt und mit dem Gemisch 15mL vorgelegtes Histopaque<sup>®</sup> 1077 (Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, Reagenz zur Dichtegradientenzentrifugation) in einem 50mL Röhren überschichtet.



Abbildung 15: Überschichten

Anschließend wurde bei 400g ohne Bremse für 30 Minuten zentrifugiert, was die Trennung gemäß dem Dichtegradienten in Plasma, PBMC-Ring, Histopaque<sup>®</sup> und Erythrozyten bewirkte.



**Abbildung 16:** Röhren nach der Zentrifugation

Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abgehoben und in ein 13mL-Röhren überführt, mit PBS aufgefüllt und zweimal bei 1200U/min für 10 Minuten gewaschen.

Als nächstes erfolgte die Messung der Zellzahl in der Suspension mittels eines Beckman COULTER® 5diff AL und das Einstellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL.

## 2.2.2 Färben mit monoklonalen Antikörpern

Zur Bestimmung charakteristischer Oberflächenstrukturen auf den B-Zellen mit dem Durchflusszytometer, müssen diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden.

Um diese Antikörper einer bestimmten Spezifität herzustellen, werden häufig Mäuse auf das gewünschte Antigen sensibilisiert und anschließend die entsprechenden B-Zellen aus der Milz gewonnen. Für die Antikörperisolation werden die B-Lymphozyten mittels der sogenannten Hybridomtechnik (für deren Entwicklung Köhler und Milstein [31] 1984 den Nobelpreis erhielten) immortalisiert. Dies geschieht durch Fusion der B-Zellen mit den unsterblichen Zellen einer Myelomzelllinie, die entstehenden Hybridome produzieren fortan monoklonale Antikörper.

Die auf diese Art gewonnenen Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) konjugiert, damit sie später im Durchflusszytometer detektiert werden können.

Oberflächenstrukturen auf Zellen, die von Antikörpern gebunden werden, bezeichnet man mittels der CD-Nomenklatur (Cluster of Differentiation) [2].

Um unspezifische Bindungen von spezifischen unterscheiden zu können, verwendet man Isotyp-Antikörper als Negativkontrollen. Es handelt sich dabei um einen Antikörper, der in seinen Eigenschaften möglichst dem zu testenden entspricht und mit dem gleichen Fluorochrom konjugiert ist, aber nicht über die jeweilige Bindungsstelle verfügt. Somit kann man ein Niveau für die Hintergrundfluoreszenz festlegen und Signale über diesem Level können als spezifische Bindungen angesehen werden. [32]

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Fluorochrom	Bestellnummer	Lieferant
CD3	PerCP	345766	BD
CD14	PerCP	345786	BD
CD19	Horizon Blue	560353	BD PHARMINGEN
CD45	APC-H7	641399	BD PHARMINGEN
IgD	FITC	555778	BD PHARMINGEN
CD27	APC	337169	BD
CD38	PE-Cy7	335825	BD
CD24	PE	555428	BD PHARMINGEN
CD80	PE	567227	BD PHARMINGEN
CD95	PE	555674	BD PHARMINGEN
Isotyp	FITC	555573	BD PHARMINGEN
Isotyp	PE	555749	BD PHARMINGEN
Isotyp	APC	555751	BD PHARMINGEN
Isotyp	PE-Cy7	557872	BD PHARMINGEN

**Tabelle 6:** Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper. BD: Becton-Dickinson Biosciences, Heidelberg / Deutschland; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat; PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein; APC: Allophycocyanin; PE: Phycoerythrin; PE-Cy7: Phycoerythrin-Cyanin7

Für jeden Probanden wurden Antikörper vorgemischt (siehe Tabelle 7), in vier FACS-Tubes vorgelegt und mit je 100µL Zellsuspension versetzt.

Tube 1 (Isotypkontrolle)		Tube 2		Tube 3		Tube 4	
CD3 PerCP	10µL	CD3 PerCP	10µL	CD3 PerCP	10µL	CD3 PerCP	10µL
CD14 PerCP	10µL	CD14 PerCP	10µL	CD14 PerCP	10µL	CD14 PerCP	10µL
CD19 Horizon Blue	10µL	CD19 Horizon Blue	10µL	CD19 Horizon Blue	10µL	CD19 Horizon Blue	10µL
CD45 APC-H7	5µL	CD45 APC-H7	5µL	CD45 APC-H7	5µL	CD45 APC-H7	5µL
Isotyp FITC	20µL	IgD FITC	20µL	IgD FITC	20µL	IgD FITC	20µL
Isotyp PE	20µL	CD27 APC	10µL	CD27 APC	10µL	CD27 APC	10µL
Isotyp APC	10µL	CD38 PE-Cy7	2µL	CD38 PE-Cy7	2µL	CD38 PE-Cy7	2µL
Isotyp PE-Cy7	2µL	CD24 PE	20µL	CD80 PE	20µL	CD95 PE	20µL

**Tabelle 7:** Antikörperansätze

Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte ein Waschschrift mit 3mL Cell Wash (BD) für 5 Minuten bei 1500U/min und das Resuspendieren mit 200µL Cell Wash. Somit waren die Zellen bereit für die Messung am Durchflusszytometer.

### 2.2.3 Durchflusszytometer [26]

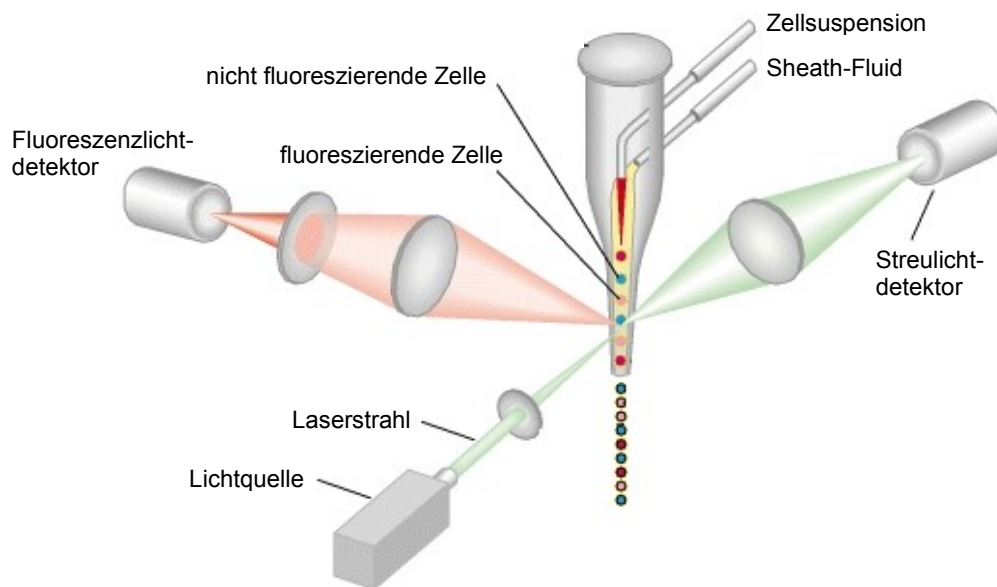
Die Durchflusszytometrie (auch Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) entwickelte sich in den letzten 20 Jahren von einer Methode der Grundlagenforschung, mit deren Hilfe quantitativ lebende Zellen vermessen und charakterisiert werden können, hin zu einem breit verfügbaren Instrument mit zunehmenden Anwendungen auch im Routinebereich.

Bei der FACS-Analyse wird eine Zellsuspension mit Hilfe eines Hüllstromes (sog. Sheath-Fluid) derart verdünnt und fokussiert, dass die in der Flüssigkeit enthaltenen Zellen einzeln und im rechten Winkel eine Lichtquelle (Laser) passieren. Wenn der Laserstrahl auf die Zelle auftrifft, wird er zum einen - abhängig von den Eigenschaften der Zelle - gestreut, zum anderen werden durch das Laserlicht an der Zelloberfläche gebundene Fluorochrome zum Leuchten angeregt.

Das Streulicht in Richtung des Laserstrahls (Forward Scatter, FSC) gibt Aufschluss über die Größe der detektierten Zelle, das orthogonal zum Laserstrahl gestreute Licht (Side Scatter, SSC) gilt hingegen als Maß für die Granularität.

Ebenso wird das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht gemessen (dessen Intensität unter bestimmten Voraussetzungen als Maß für das quantitative Vorkommen des

Zielantigens auf der Zelle dient) und all diese Daten für jede Einzelzelle gespeichert.



**Abbildung 17:** Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Zellen passieren einzeln den Laserstrahl und mittels Detektoren werden Streu- und Fluoreszenzlicht jeder Zelle gemessen. (mod. nach [33])

Für unsere Analysen wurde ein BD FACSCanto II verwendet, ein modernes Zytometer, das mit drei Lasern die Detektion von bis zu acht Fluoreszenzfarben gleichzeitig erlaubt. Die Messgeschwindigkeit liegt bei bis zu 10.000 Ereignissen pro Sekunde, was die Analyse von 500.000 Zellen pro FACS-Tube ermöglichte.



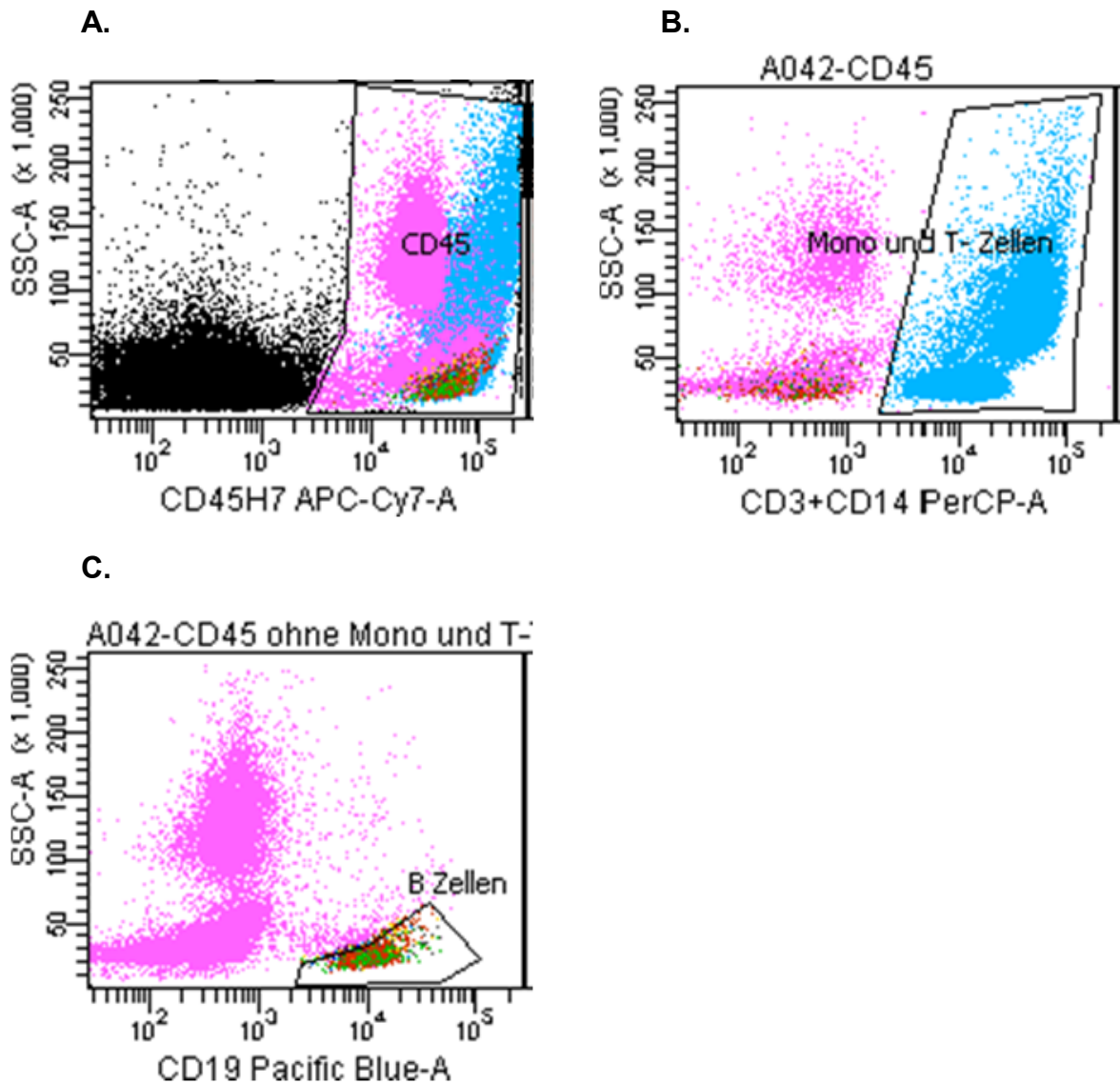
**Abbildung 18:** BD FACSCanto II

## 2.2.4 Gating [26]

Im Anschluss an die Messung und Speicherung der Daten erfolgt die Auswertung mit einer entsprechenden Software, in unserem Fall BD FACSDiva (Version 6.1.3). Ziel dabei ist es, Populationen innerhalb der gemessenen Zellen zu definieren und deren anteilmäßige Verteilung zu erheben, sowie Zusammenhänge zwischen verschiedenen gemessenen Parametern herzustellen. Zur graphischen Darstellung der Messwerte verwendeten wir überwiegend sogenannte Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen), in denen zwei Messparameter zweidimensional gegeneinander aufgetragen werden und jeder Punkt einem gemessenen Event entspricht.

Unter dem Begriff „Gating“ versteht man das Auswählen bestimmter Regionen und Zellgruppen im Dot-Plot, wodurch die selektierten Zellen gesondert betrachtet oder auch exkludiert werden können.

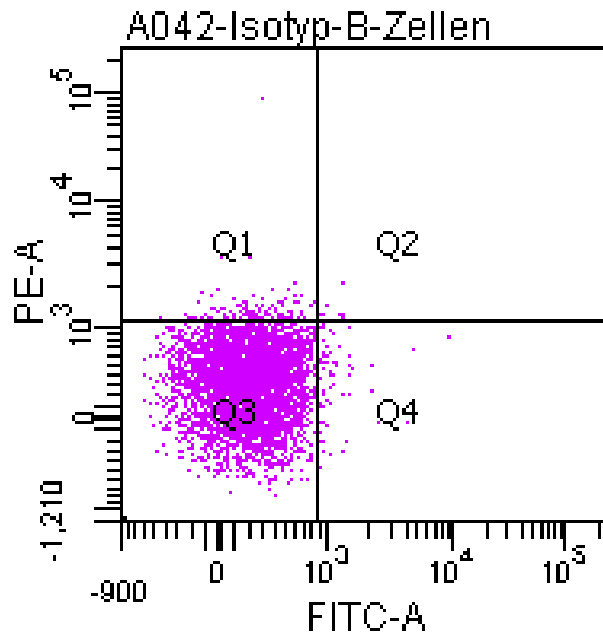
In allen vier gemessenen FACS-Tubes mussten auf diese Weise zunächst die Zellen, die von Interesse waren, ausgewählt werden - die B-Lymphozyten: Als Erstes wurden die Zellen, die den Panleukozytenmarker CD45 exprimieren, selektiert. Da sowohl unser CD3- als auch der CD14-Antikörper PerCP als Fluorochrom tragen, konnten T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und Monozyten (CD14<sup>+</sup>) als PerCP-fluoreszierende-Zellen exkludiert werden. Im letzten Schritt wurden in der Restpopulation die CD19<sup>+</sup> Zellen mit niedriger Granularität, also die B-Lymphozyten, gated (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Gating der B-Lymphozytenpopulation. **A.** Die  $CD45^+$  Leukozyten werden ausgewählt. **B.** Exklusion der  $CD3^+$  T-Zellen und  $CD14^+$  Monozyten aus der  $CD45^+$  Population. **C.** Selektieren der B-Zellen:  $CD19^+$ , niedrige Granularität.

### Tube 1 (Isotypkontrolle)

Tube 1 diente als Isotypkontrolle - wie oben bereits erwähnt - zum Festlegen der Grenze zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung. Dazu wurden - wie in Abbildung 20 beispielhaft gezeigt - zwei Isotyp-Antikörper gegeneinander aufgetragen und manuell die Grenzen festgelegt:



**Abbildung 20:** Festlegen der Grenzen für spezifische Bindungen mittels Isotypkontrollen.

Die Fluoreszenzen außerhalb von Quadrant Q3 wurden demnach durch spezifische Bindungen hervorgerufen.

Die auf diese Weise bestimmten Grenzen wurden für die Definition der Quadranten bei den Tubes 2 bis 4 verwendet.

## **Tube 2**

Mittels eines Dot-Plots IgD versus CD27 können die B-Zell Subtypen Doppelnegative ( $CD19^+ CD27^- IgD^-$ ), Naive ( $CD19^+ CD27^- IgD^+$ ), IgD Memory ( $CD19^+ CD27^+ IgD^+$ ), Postswitch Memory ( $CD19^+ CD27^+ IgD^-$ ) und Plasmablasts ( $CD19^+ CD27^{++} IgD^-$ ) definiert werden (Abbildung 21A.).

Die Population der T1-Zellen zeichnet sich als Untergruppe der Naiven durch hohe Expression von CD38 und CD24 aus (Abbildung 21B.). Außerdem wurden in diesem Tube noch jeweils Subpopulationen der Plasmablasts und Postswitch Memory Zellen mit besonders hoher CD38 Expression bestimmt.

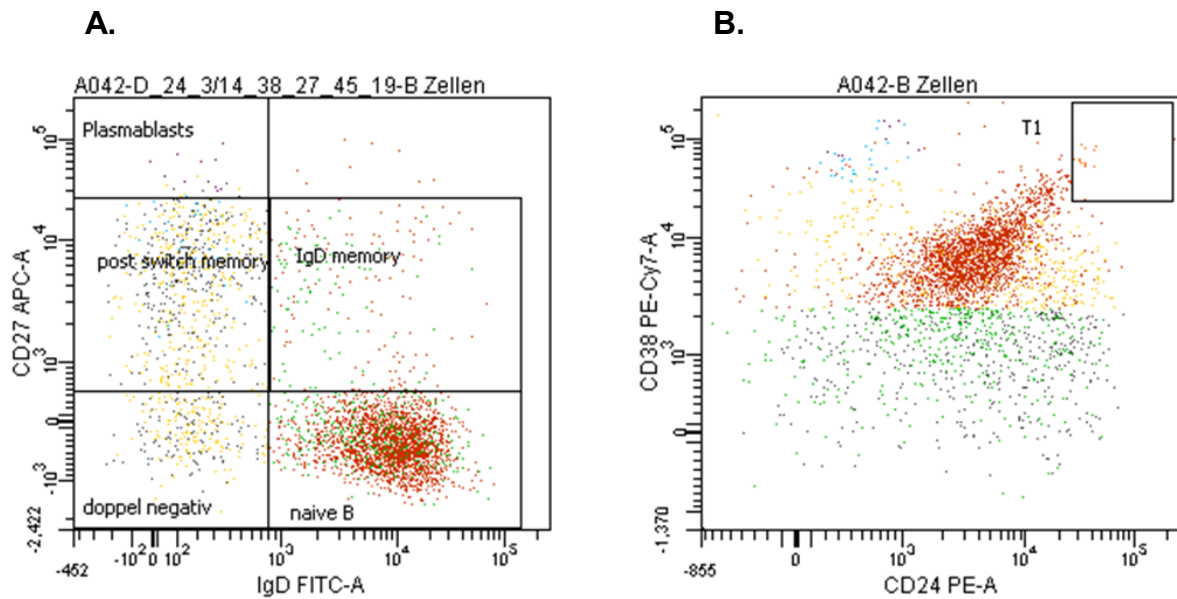


Abbildung 21: Tube 2. **A.** Dot-Plot IgD versus CD27 **B.** Gating der T1-Zellen

Als Ausgabe erhält man eine Tabelle mit den absolut gezählten Events und den relativen Anteilen z. B. an allen B-Zellen. (Abbildung 22)

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	500,000	###	100.0
CD45	358,802	71.8	71.8
Mono und T- Zellen	278,025	77.5	55.6
CD45 ohne Mono und T-Zellen	80,777	22.5	16.2
B Zellen	3,703	4.6	0.7
Plasmablasts	22	0.6	0.0
CD38high-Plasmablast	13	59.1	0.0
post switch memory	647	17.5	0.1
CD38high-postswitch memory	26	4.0	0.0
doppel negativ	270	7.3	0.1
IgD memory	204	5.5	0.0
naive B	2,570	69.4	0.5
T1	18	0.7	0.0

Abbildung 22: Datenausgabe

### Tube 3

Tube 3 diente der Subtypisierung der Populationen Doppelnegative, Naive, IgD Memory und Postswitch Memory, wobei als zusätzliche Parameter für jede Population folgende Kombinationen gemessen wurden:

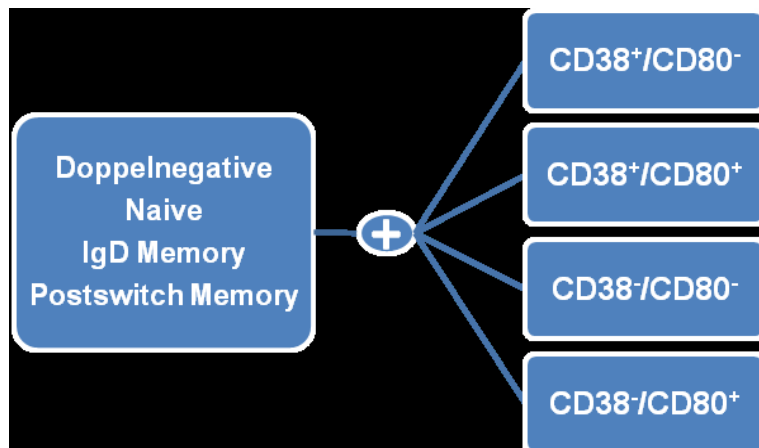


Abbildung 23: Gemessene Subtypen Tube 3

### Tube 4

Wie Tube 3, aber an Stelle von CD80 wurde CD95 verwendet:

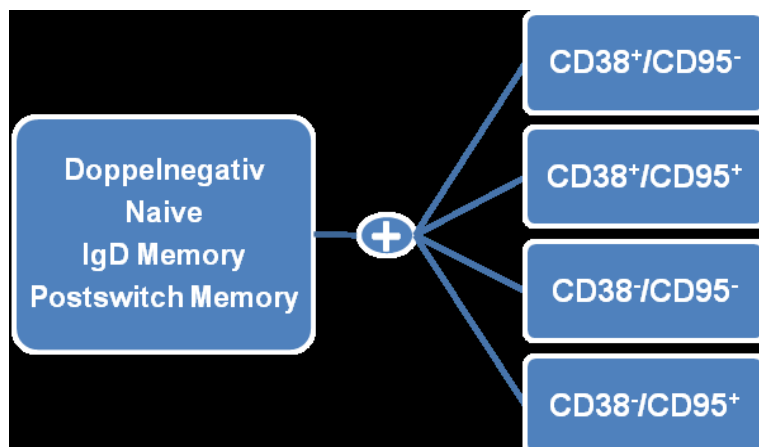


Abbildung 24: Gemessene Subtypen Tube 4

### 2.2.5 Quantitative Zellzahlmessungen

Neben den Messungen am BD FACSCanto II wurden von jedem Probanden zusätzlich BSG und CRP als Entzündungsmarker bestimmt, sowie ein großes Blutbild und eine Routine-FACS-Analyse zur quantitativen Zellzahlbestimmung im Probenmaterial durchgeführt. Aus diesen Untersuchungen stammen die Werte für die Parameter Lymphozyten/ $\mu\text{L}$  Blut und B-Zellen/ $\mu\text{L}$  Blut.

## 2.2.6 Statistische Datenanalyse

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 17.0) verwendet. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

Die Prüfung der Messwerte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte für die meisten gemessenen Lymphozytenpopulationen keine Normalverteilung, weshalb wir für die weiteren Datenanalysen grundsätzlich nicht-parametrische Tests verwendeten: Geschlechtsspezifische Unterschiede in unseren Daten wurden durch einen Mann-Whitney U-Test untersucht. Um altersbedingte Verschiebungen in der Verteilung der B-Zell Subpopulationen feststellen zu können, gruppierten wir unser Kollektiv in vier Alterskategorien (20-40 Jahre, 41-60 Jahre, 61-80 Jahre, über 80 Jahre) und prüften diese unter Verwendung eines Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede.

Die nicht normalverteilten Daten werden dementsprechend als Median mit oberem und unterem Quartil (25. und 75. Perzentile) angegeben. Da die Ergebnisse auch als Referenzwerte Anwendung finden sollen, führen wir ebenfalls die Perzentilen 2,5 und 97,5 an (innerhalb dieses Bereiches liegen definitionsgemäß 95% der Messwerte von Gesunden).

Zur grafischen Darstellung der Daten wurden in SPSS Balkendiagramme und Box-Plots generiert.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Messungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

	Median	Spannweite	Quartilen		Perzentilen		
			untere	obere	2,5	97,5	
<b>Lymphozyten</b> (#/ $\mu$ l)	1.940	(920-2.920)	1.400	2.240	923	2.903	
<b>B-Zellen</b> (#/ $\mu$ l)	182	(67-488)	152	278	67	487	
<b>B-Zellen</b> (#/500.000 Events)	13.737	(3.567-37.570)	8.393	19.615	3.573	37.441	
<b>B-Zellen</b> (% aller Events)	2	(0-7)	1	3,5	0	6,95	
<b>Plasmablasts</b> (%)	0	(0-7)	0	1	0	6,95	
<b>PS Memory</b> (%)	17	(6-44)	11	22	6	43,75	
<b>Doppelnegative</b> (%)	4	(2-10)	2	5	2	9,95	
<b>IgD Memory</b> (%)	14	(4-46)	10	18	4	45,85	
<b>Naive</b> (%)	62	(31-86)	44,5	73	31	85,9	
<b>T1 von Naive</b> (%)	1	(0-13)	0	2	0	12,85	
<b>T1</b> (absolut #)	92,5	(1-1.719)	20,75	330,75	1	1.705,75	
<b>% T1</b> (von B-Zellen)	1	(0-9)	0	2,5	0	8,9	
<b>CD38<sup>hi</sup> PSMemory</b> (%PS)	2	(0-24)	1	5,5	0	23,4	
<b>CD38<sup>hi</sup> PB</b> (% PB)	62	(18-97)	46,5	81	18,05	96,8	
<b>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup></b>	<b>38+/80-</b> (%)	33	(7-63)	21	39	7,25	62,55
	<b>38+/80+</b> (%)	14	(4-53)	10	26,5	4,05	52,35
	<b>38-/80-</b> (%)	30	(2-57)	22,5	36,5	2,65	56,45
	<b>38-/80+</b> (%)	18	(2-47)	12,5	24	2,05	46,65
<b>IgD Memory</b>	<b>38+/80-</b> (%)	28	(10-54)	19,5	37	10,05	53,85
	<b>38+/80+</b> (%)	14	(5-28)	9	19	5	28
	<b>38-/80-</b> (%)	39	(18-73)	28,5	51	18,05	72,75
	<b>38-/80+</b> (%)	13	(3-35)	8,5	18,5	3	34,75
<b>Naive</b>	<b>38+/80-</b> (%)	79,4	(42,7-93,2)	72,4	85,6	43,92	93,15
	<b>38+/80+</b> (%)	1	(0-13)	0	1	0	12,6
	<b>38-/80-</b> (%)	17	(6-54)	12	23	6,05	52,85
	<b>38-/80+</b> (%)	0	(0-6)	0	1	0	5,95
<b>PS Memory</b>	<b>38+/80-</b> (%)	23	(7-54)	16	30	7,05	53,7
	<b>38+/80+</b> (%)	22	(8-60)	16,5	34	8	59,55
	<b>38-/80-</b> (%)	22	(7-44)	14	28	7	43,95
	<b>38-/80+</b> (%)	27	(8-51)	22	34	8,1	50,45

		Median	Spannweite	Quartilen		Perzentilen	
				untere	obere	2,5	97,5
<b>27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup></b>	<b>38+/95-</b> (%)	39	(4-67)	27,5	45,5	4,1	66,9
	<b>38+/95+</b> (%)	10	(2-47)	6,25	19,25	2,05	46,93
	<b>38-/95-</b> (%)	28,5	(10-54)	22,25	36,75	10,1	53,9
	<b>38-/95+</b> (%)	16	(5-33)	13	22,75	5	32,95
<b>IgD Memory</b>	<b>38+/95-</b> (%)	24,5	(6-50)	17,25	33	6,1	49,78
	<b>38+/95+</b> (%)	17	(6-32)	11,25	24,5	6,03	32
	<b>38-/95-</b> (%)	39,5	(20-68)	27,25	48,75	20,05	67,93
	<b>38-/95+</b> (%)	14	(3-40)	10	18,75	3,03	39,83
<b>Naive</b>	<b>38+/95-</b> (%)	77	(45-92)	69	84	45,4	91,9
	<b>38+/95+</b> (%)	2	(0-16)	1	3	0	15,85
	<b>38-/95-</b> (%)	17	(6-51)	12	22	6,05	50,53
	<b>38-/95+</b> (%)	0,95	(0-7)	0,4	2,08	0,1	6,99
<b>PS Memory</b>	<b>38+/95-</b> (%)	21	(4-46)	13,5	27,75	4	45,83
	<b>38+/95+</b> (%)	26	(7-80)	2	34,75	7,07	79,65
	<b>38-/95-</b> (%)	19,5	(4-46)	12,25	26,75	4,07	45,78
	<b>38-/95+</b> (%)	28	(9-48)	21,5	32,75	9,05	47,95

**Tabelle 8:** Messergebnisse. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Prozentwerte auf den Anteil an allen B-Zellen, bei den Subtypen CD38/CD80 bzw. CD38/CD95 ist die Fraktion an der übergeordneten Population dargestellt. PS, Postswitch (Memory); PB, Plasmablasts.

Die Daten wurden hinsichtlich geschlechtsspezifischer und altersabhängiger Abweichungen untersucht.

### 3.1 Männer versus Frauen

Der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden zeigte einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Anzahl der B-Zellen in den Proben. Diese ist bei Frauen geringer als bei Männern ( $p \leq 0,017$ ).

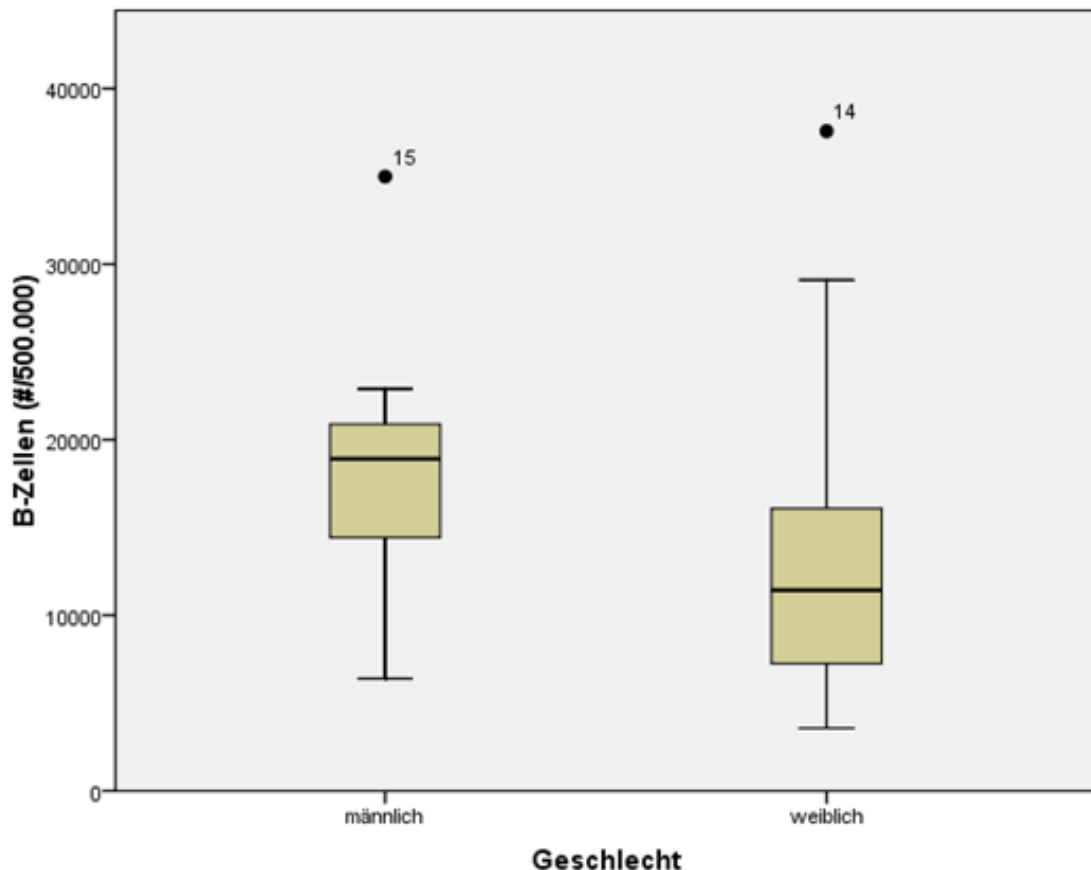


Abbildung 25: B-Zellen/500.000 Events: Männer vs. Frauen

Für die übrigen Parameter fanden sich keine signifikanten Geschlechtsbezüge, daher wurden die weiteren Tests nicht für Männer und Frauen getrennt durchgeführt.

### 3.2 Altersabhängige Veränderungen

Das Alter der Probanden nimmt größeren Einfluss auf die Verteilung der B-Zellen als das Geschlecht, es konnten einige signifikante Unterschiede zwischen den vier Gruppen gezeigt werden:

### 3.2.1 Anzahl der B-Zellen

Die Altersgruppen unterscheiden sich signifikant in der Anzahl der B-Zellen/ $\mu\text{L}$  Blut ( $p \leq 0,012$ ) und B-Zellen/500.000 Events ( $p \leq 0,0001$ ).

Der Median der B-Zellen/ $\mu\text{L}$  nimmt mit dem Alter stetig ab, ebenso wie die Spannweite.

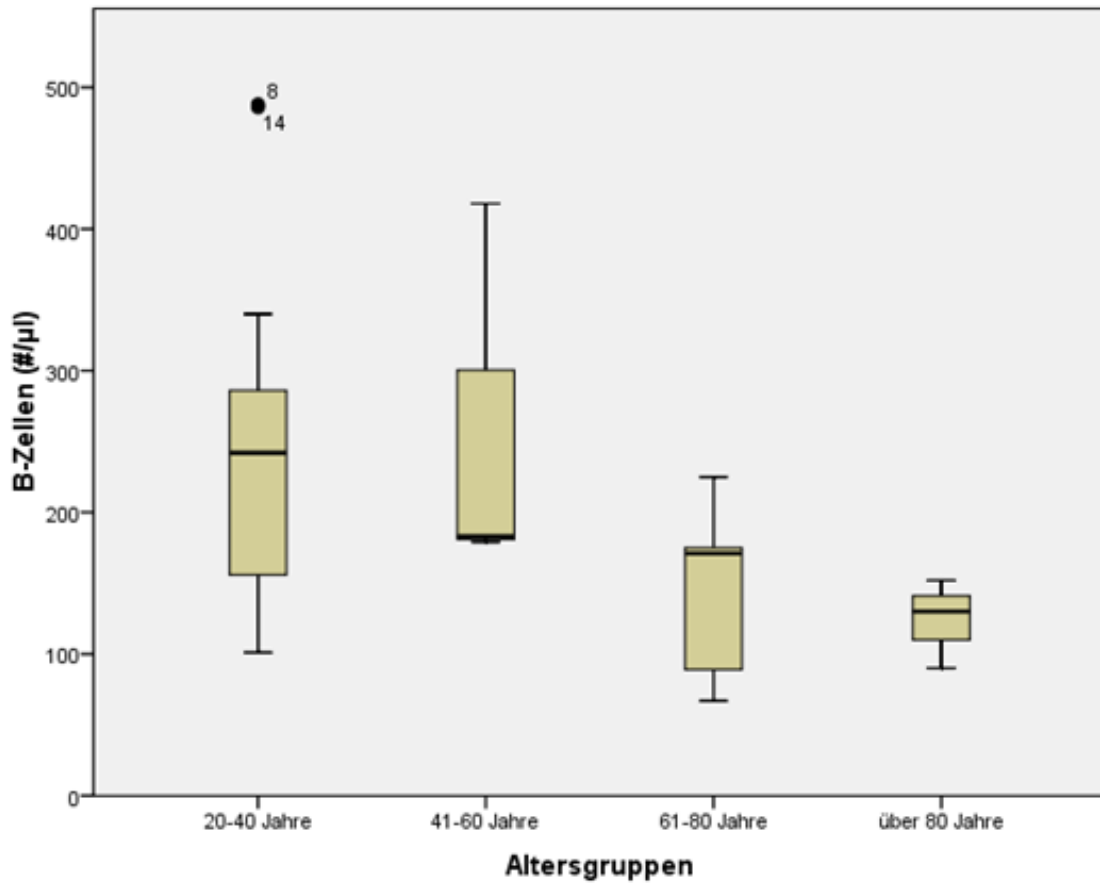


Abbildung 26: B-Zellen/ $\mu\text{L}$  Blut in den vier Altersgruppen

### 3.2.2 Plasmablasts

Der relative Anteil der Plasmablasts an den B-Zellen ist in den vier Altersgruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,022$  verschieden.

Median und Streubreite nehmen tendenziell mit dem Alter zu.

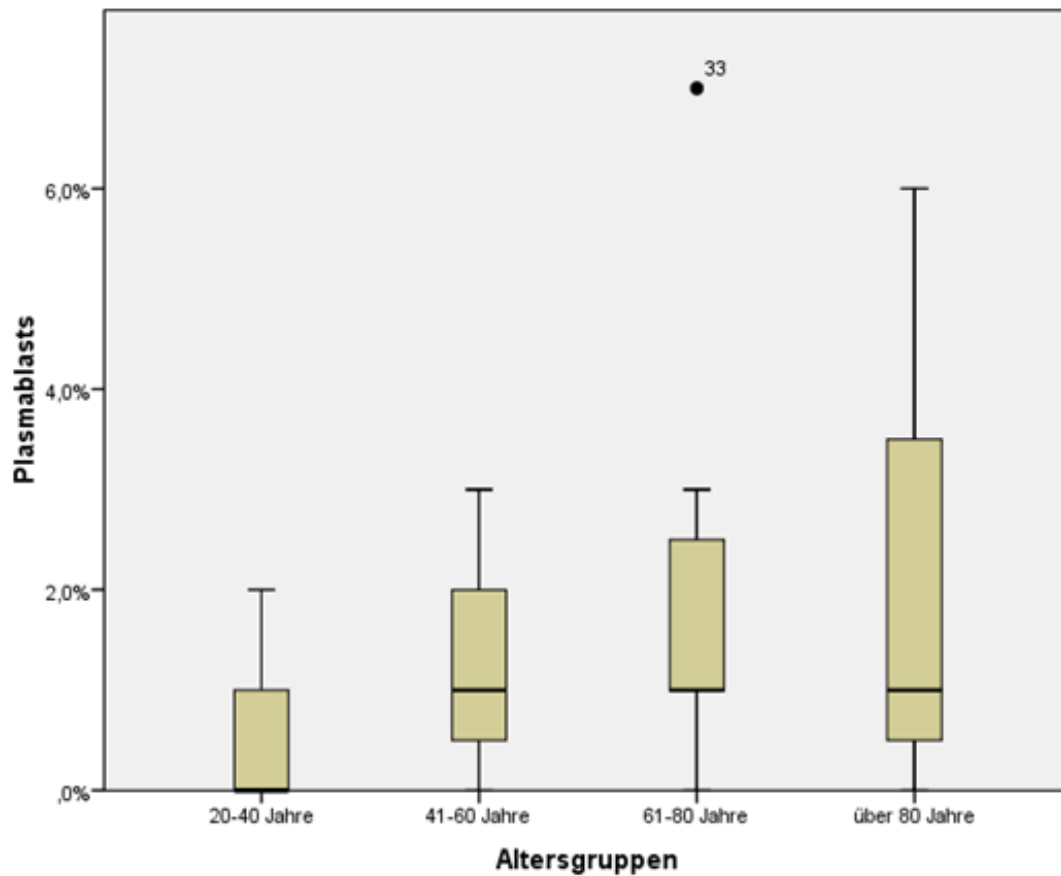


Abbildung 27: Plasmablasts in den vier Altersgruppen

### 3.2.3 Postswitch Memory B-Zellen

Signifikante Unterschiede findet man auch in der Postswitch Memory Population ( $p \leq 0,022$ ).

Nach anfänglichem Abfall zwischen erster und zweiter Altersgruppe, zeigt sich ein sprunghafter Anstieg des Medianwertes der Postswitch Memory Zellen von 11% auf 35% bei den 61-80-Jährigen.

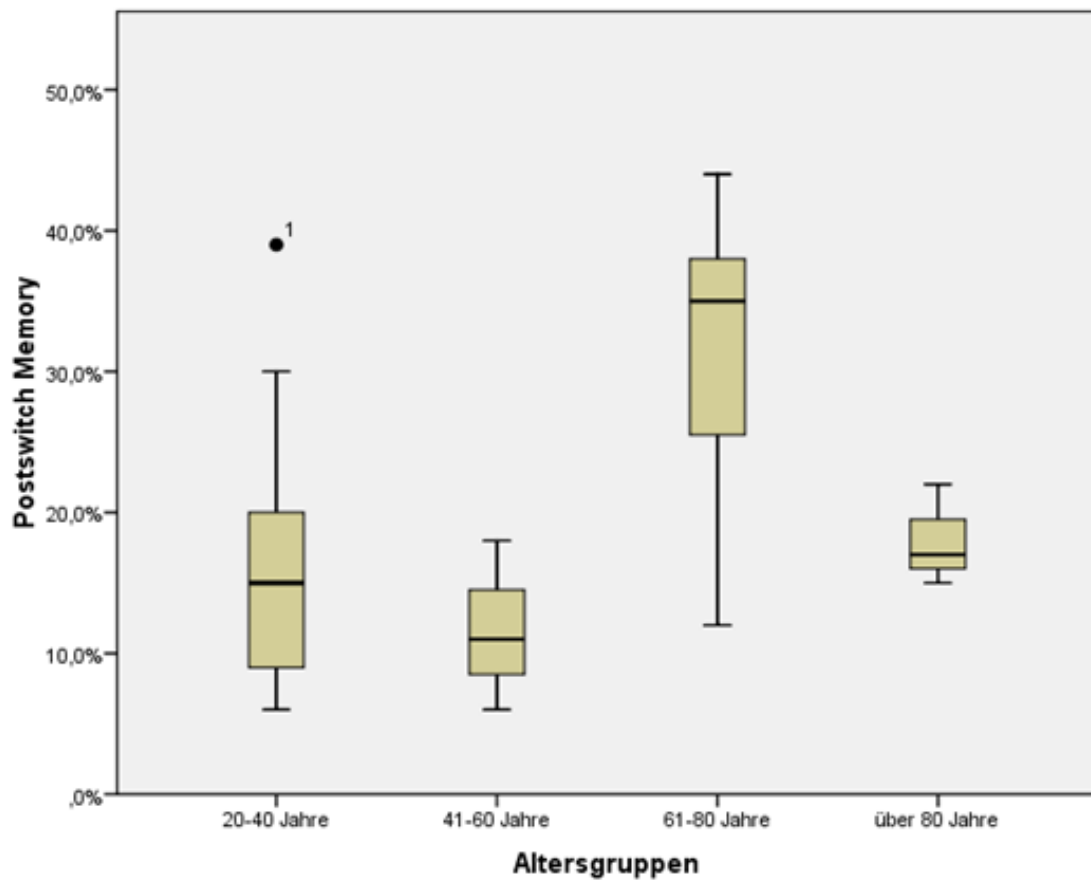


Abbildung 28: Postswitch Memory B-Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.4 Transitorische B-Zellen

Sowohl die Absolutzahlen der transitorischen T1-Zellen, als auch der Anteil der T1-Zellen an den naiven B-Lymphozyten sind altersabhängig verschieden ( $p \leq 0,0001$  bzw.  $p \leq 0,002$ ).

Beide Parameter fallen bei über 60-jährigen Probanden gegen Null.

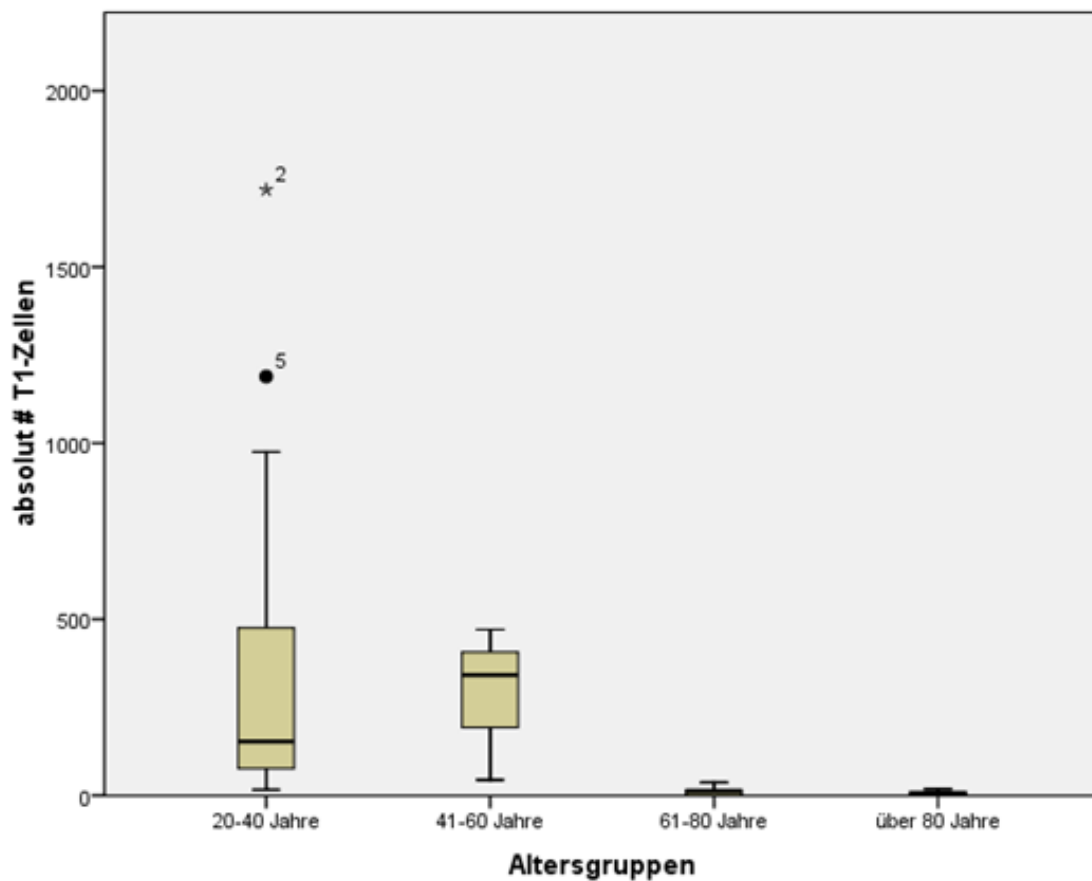


Abbildung 29: Absolutzahlen der T1-Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.5 CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup> B-Zellen

Auch CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup> B-Zellen sind in den verschiedenen Lebensabschnitten keine homogene Gruppe ( $p \leq 0,013$ ).

Tendenziell nehmen die Prozentwerte zwischen dem 20. und dem 80. Lebensjahr ab, die über 80-Jährigen verzeichnen interessanterweise wieder einen leichten Anstieg.

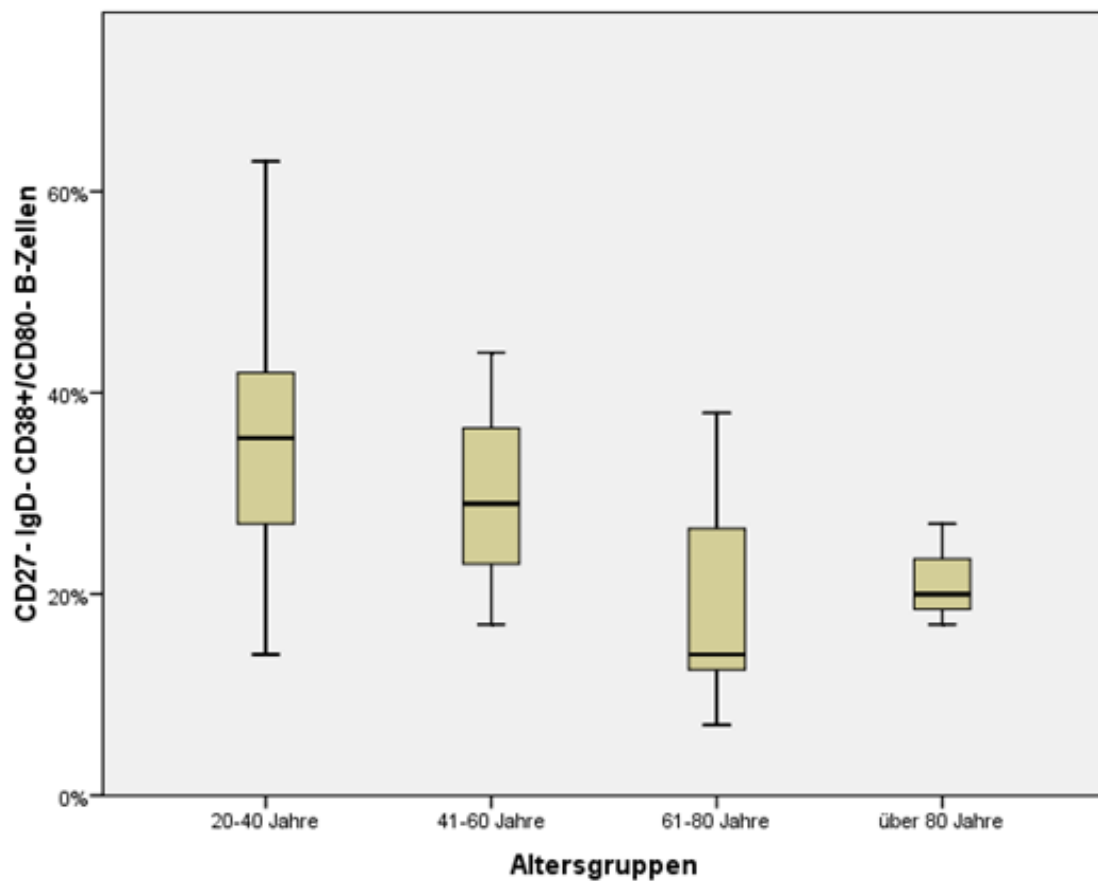


Abbildung 30: CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup> B-Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.6 CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> B-Zellen

Mit  $p \leq 0,046$  zeigen sich auch in der Population CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> Unterschiede in den Altersgruppen.

Im Gegensatz zur ähnlichen Zellgruppe CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup> sind diese Zellen im höheren Alter eher häufiger anzutreffen.

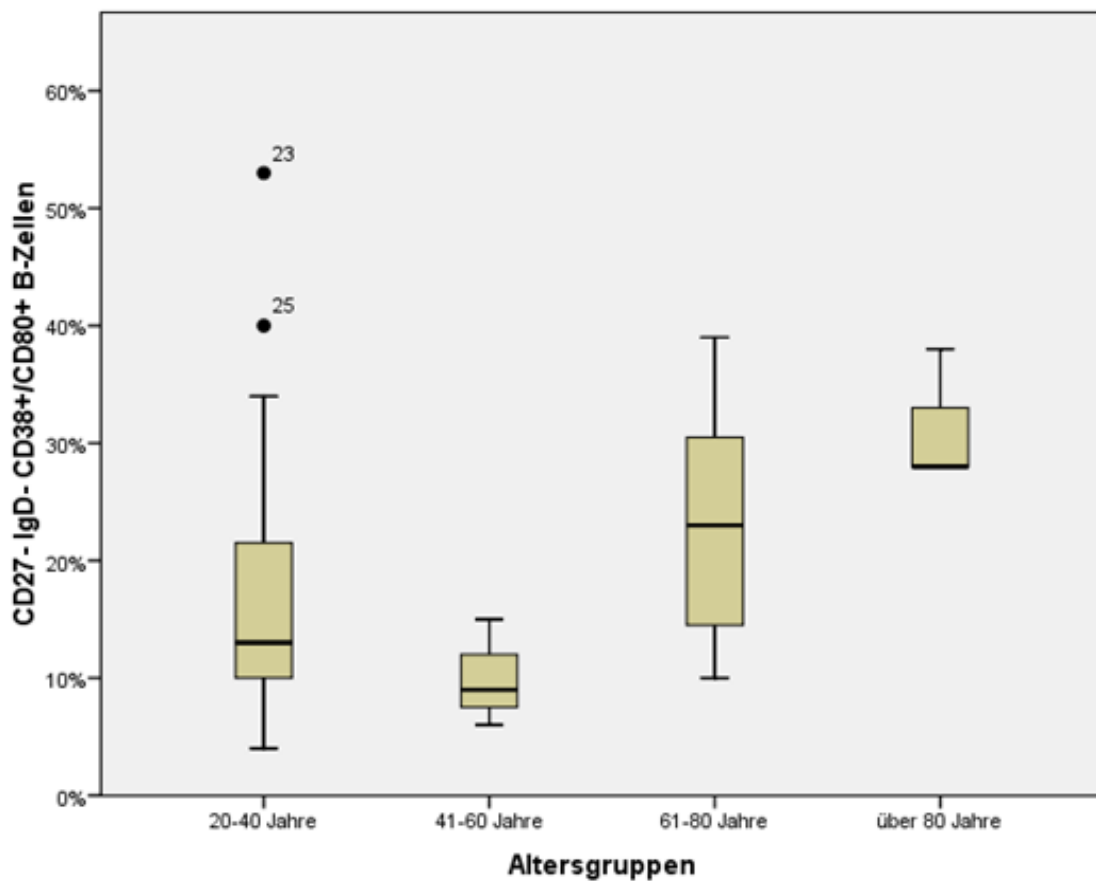


Abbildung 31: CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> B-Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.7 Postswitch Memory CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup> B-Zellen

Der p-Wert für die Unterschiede der vier verschiedenen Altersgruppen liegt hier bei  $p \leq 0.029$ .

Die recht große Spannweite in der Gruppe der 20-40-jährigen Probanden pendelt sich im höheren Lebensalter auf ca. 10%-25% ein.

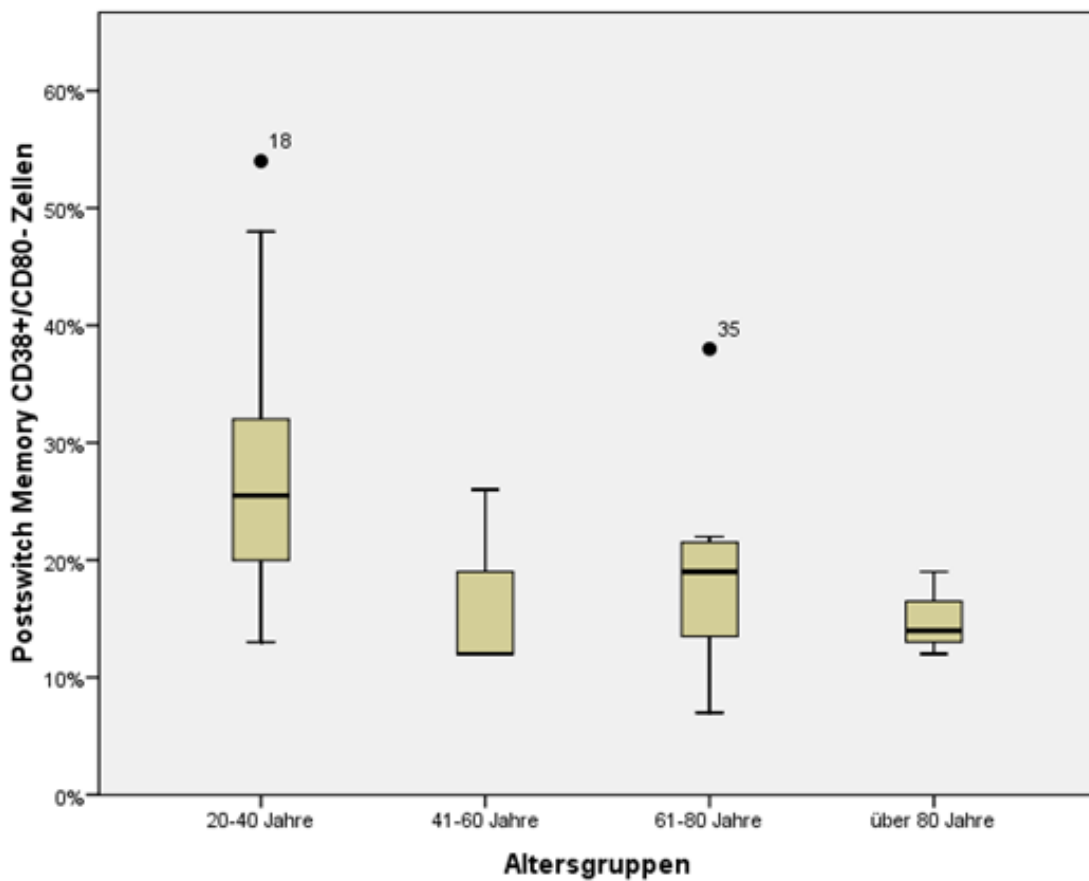


Abbildung 32: Postswitch Memory CD38<sup>+</sup>/CD80<sup>-</sup>Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.8 CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD95<sup>-</sup> B-Zellen

Dieser Subtyp der Doppelnegativen B-Zellen ist ebenfalls altersabhängigen Schwankungen unterworfen ( $p \leq 0.008$ ).

Der Median fällt vom 20. bis zum 80. Lebensjahr von 42% auf 19%, dann folgt wiederum ein Anstieg auf 30%.

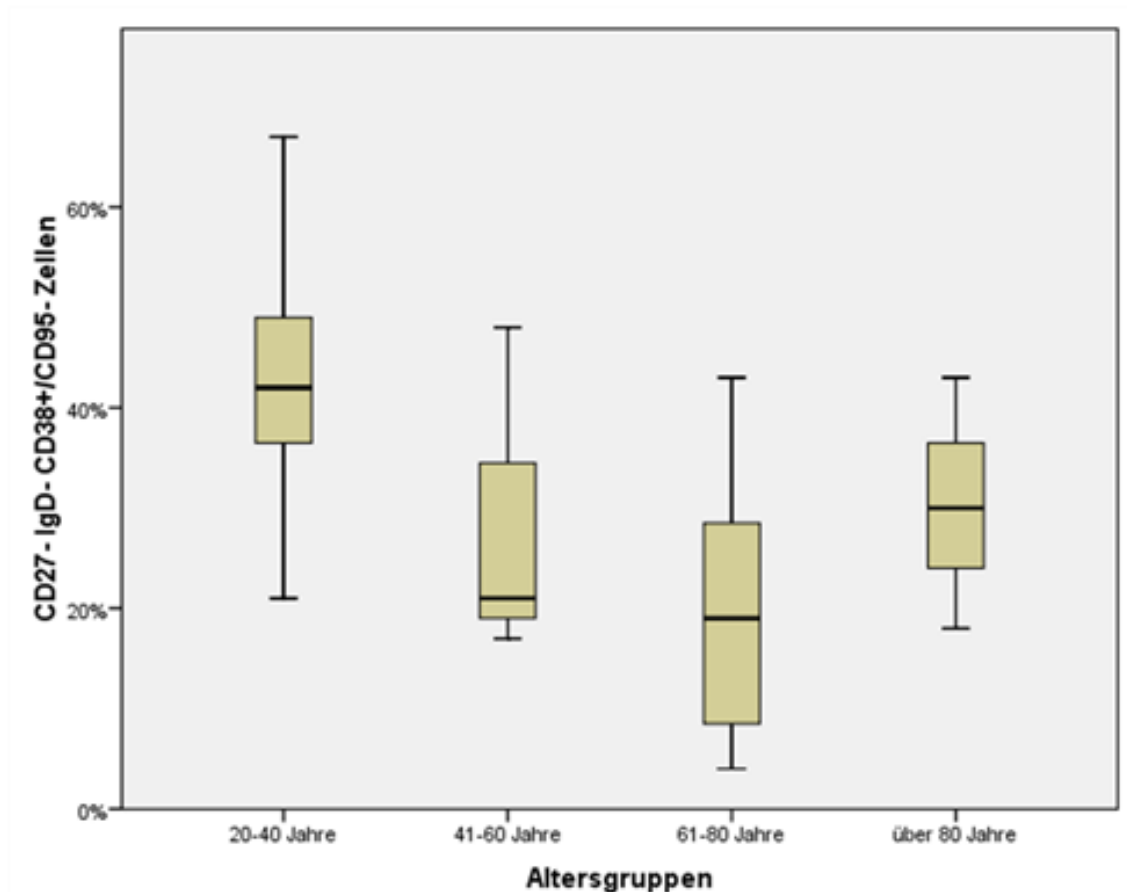


Abbildung 33: CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>/CD95<sup>-</sup> Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.9 CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>/CD95<sup>+</sup>B-Zellen

Der altersabhängige Frequenzunterschied in dieser Population wird mit  $p \leq 0.037$  deutlich.

Auffällig ist auch hier, dass die Gruppe der über 80-Jährigen nicht dem steigenden Trend der anderen drei Gruppen folgt.

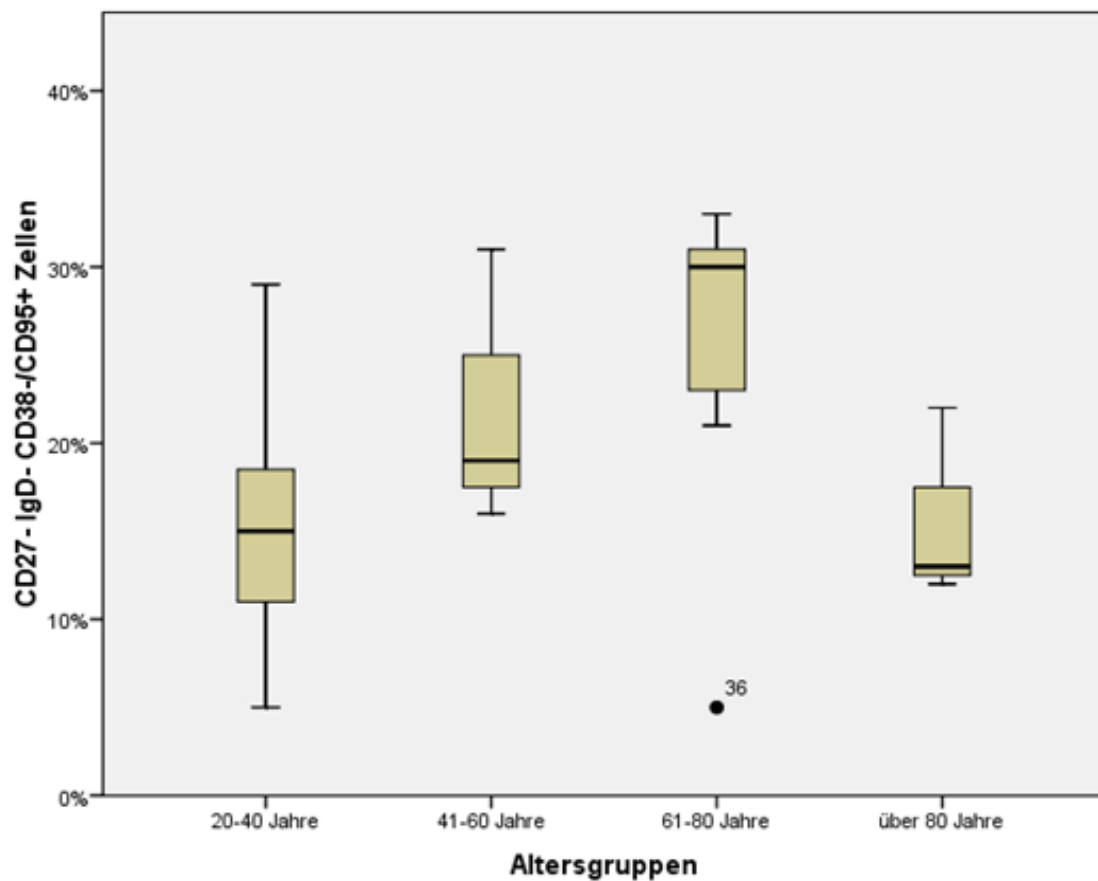


Abbildung 34: CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>/CD95<sup>+</sup> Zellen in den vier Altersgruppen

### 3.2.10 Postswitch Memory CD38<sup>+</sup>/CD95<sup>-</sup>B-Zellen

Als letzte Population mit signifikanten altersbedingten Schwankungen ( $p \leq 0,001$ ) sind die Postswitch Memory CD38<sup>+</sup>/CD95<sup>-</sup> Zellen bis zum 40. Lebensjahr variabler und auf höherem Niveau als in den älteren Testgruppen.

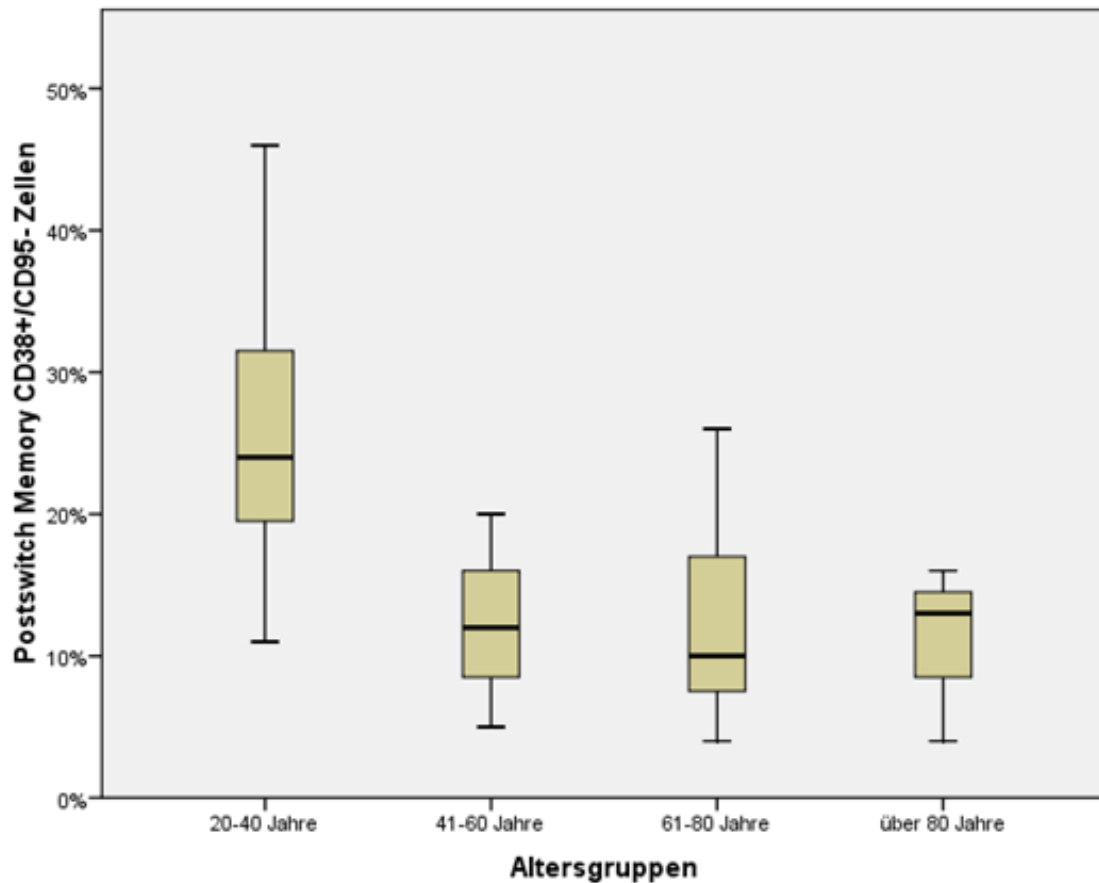


Abbildung 35: Postswitch Memory CD38<sup>+</sup>/CD95<sup>-</sup> Zellen in den vier Altersgruppen

## Diskussion

Mit dem Einzug der Antikörpertherapie als revolutionäres Konzept in der Rheumatologie, hat sich auch der Fokus der immunologischen Forschung in den letzten Jahren vermehrt auf die B-Lymphozyten gerichtet. Der erfolgreiche Einsatz von B-Zell depletierenden Therapien bei Autoimmunerkrankungen [34-39] unterstreicht die bisher vielleicht unterschätzte pathogenetische Bedeutung dieser Zellen.

Die breitere Verfügbarkeit der Durchflusszytometrie und die technischen Verbesserungen dieser Methode erlauben heute die relativ einfache multiparametrische Charakterisierung von B-Zellen aus dem peripheren Blut. Im Zuge dieser Fortschritte werden ständig neue B-Zell Subgruppen definiert und mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Erstaunlicherweise sind allerdings in der Literatur für viele der neuen Subsets keine ausreichend fundierten Referenzwerte bei Gesunden definiert, welche die Bestimmung beim Kranken erst sinnvoll erscheinen lassen.

Als grundlegende Einschränkung der Analyse von B-Zellen aus dem Blut ist zu berücksichtigen, dass sich nur ca. 2% aller Lymphozyten eines gesunden Erwachsenen in der Zirkulation befinden und damit der Untersuchung zugänglich sind [40]. Die leichte Verfügbarkeit im Vergleich zur B-Zell Gewinnung aus dem Knochenmark macht die Analyse von peripherem Blut aber zur wesentlich praktikableren Variante.

Unsere Daten sollen als Referenzwerte für B-Zellanalysen dienen. In der Labormedizin werden Referenzbereiche in aller Regel als Mittelwert  $\pm$  zweifache Standardabweichung aus den Werten eines gesunden Kollektivs bestimmt [41], was ca. 95% der Messwerte von Gesunden einschließt.

In unserem Fall sind die Messergebnisse häufig nicht normal verteilt (ein bekanntes Phänomen bei Lymphozytenanalysen [42, 43]), daher geben wir die Daten wie in der Literatur üblich als Median mit Perzentilen an. Um auch bei dieser asymmetrischen Verteilung einen Bereich festlegen zu können, in den 95%

der Messwerte von Gesunden fallen, entschieden wir uns für die Angabe der Perzentilen 2,5 und 97,5 zusätzlich zu den Quartilen.

Die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit der bestehenden Literatur ist aus mehreren Gründen eingeschränkt:

Neben der in unserer Studie verwendeten Technik mit PBMC-Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation, werden in einigen Labors B-Zell Färbungen mit gewaschenem Vollblut durchgeführt. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Ergebnisse untereinander sehr gut vergleichbar sind **[44]**.

Vor allem in älteren Studien werden oft nur einparametrische Angaben gemacht, d. h. es wird aufgeführt, wie häufig ein bestimmter Oberflächenmarker auf allen B-Zellen vorkommt, aber nicht auf die differentielle Expression in verschiedenen Subpopulationen eingegangen. Diese Werte sind daher kaum hilfreich. **[26]**

In einigen Papers werden die B-Zellsubsets in Prozent der PBLs (Peripheral Blood Lymphocytes) angegeben, was den Vergleich mit der heute weitgehend empfohlenen Angabe als Prozent aller B-Zellen **[45]** erschwert.

Ein weiteres Problem beim Datenvergleich ist, dass für die Subtypisierung der B-Zellen nicht immer die gleichen Marker und Exklusionsmarker verwendet werden. Als B-Lymphozytenmarker finden sich z. B. sowohl CD19 als auch CD20, einige Autoren färben auf IgM oder auf IgD oder sogar beides, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

In zwei Arbeiten aus dem Jahr 1994 von Pascual et al. **[46]** und Liu et al. **[47]** werden fünf periphere B-Zell Subtypen anhand der Expression von IgD und CD38 definiert, aber ein Vergleich mit diesen Analysen würde den Rahmen dieser Diplomarbeit sprengen.

Vier Jahre später führten Klein et al. **[27]** CD27 als Marker für Memory B-Zellen ein, die Grundlage unserer Subtypisierung. Darin wird ein  $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+ \text{CD27}^-$  Subset als eine Population mit nicht mutierten V-Genen definiert, welche ca. 60% der peripheren B-Zellen ausmacht. Einen ähnlichen Prozentsatz von 55% an nicht oder kaum mutierten V-Genen in  $\text{CD19}^+$  peripheren B-Zellen geben Brezinschek et al. **[48]** an. Diese Zahlen decken sich sehr gut mit den von uns gemessenen naiven B-Lymphozyten mit 62% (44,5-73%; Median und Quartilen). Klein

beschreibt weiters ca. 15% der peripheren B-Zellen als CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> (entsprechen unserer IgD Memory Population: 14% (10-18%)) und ca. 15% sind CD27<sup>+</sup> und IgG<sup>+</sup> oder IgA<sup>+</sup> (entsprechen unserer Postswitch Memory Population: 17% (11-22%)). Die Arbeit von Klein stützt sich auf die B-Zellanalyse von nur drei erwachsenen Probanden, ist aber gut mit unseren Zahlen vereinbar.

Von Deneys et al. [49] gibt es aus 2001 eine größere Studie mit 38 erwachsenen Probanden und zahlreichen getesteten Oberflächenmarkern. Leider werden hier nur einparametrisch die Frequenzen der Marker in allen CD19<sup>+</sup> Zellen angegeben (siehe oben). Interessant sind die CD80<sup>+</sup> Zellen in den CD19<sup>+</sup> mit 18% (bei uns 14%) und die CD95<sup>+</sup> Zellen mit 13% (bei uns 16,4%).

In einem Paper aus dem Jahr 2008 von Martinez-Gamboa et al. [50], das sich primär mit der Autoimmunthrombozytopenie und B-Zellen beschäftigt, werden zum Vergleich Daten von 20 gesunden Probanden angegeben. Diese Werte korrelieren sehr gut mit unseren:

		Martinez-Gamboa et al.[50]	Huck et al. (11-18 Jährige) [45]	unsere Werte
CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Median	66%	74,5%	62%
	Spannbreite	38-85%		31-86%
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	Median	13%	11%	14%
	Spannbreite	5-40%		4-46%
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	Median	16%	9%	17%
	Spannbreite	4-29%		6-44%
CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>	Median	4%		4%
	Spannbreite	2-10%		2-10%

**Tabelle 9:** Vergleich der Studien. Werte in % der CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> Zellen.

In einer erst kürzlich erschienenen interessanten Studie von Huck et al. [45] wurden Referenzwerte für B-Zellpopulationen bei 166 gesunden Kindern bestimmt. Die jungen Probanden wurden in fünf Altersgruppen zwischen einem bis 18 Jahren eingeteilt und die Subsets CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> in den CD20<sup>+</sup> Zellen gemessen. Es zeigte sich in dieser Studie ein kontinuierlicher Anstieg der IgD Memory und Postswitch Memory Fraktionen (in % B-Zellen) mit dem Alter, wobei die Veränderungen so gravierend sind, dass für Kinder eigene Referenzwerte verwendet werden müssen. In der Gruppe der 11- bis 18-Jährigen findet man - im Vergleich zu unseren Werten bei Erwachsenen - eine

Verschiebung in Richtung Naive und verminderte Memory B-Zellen, was man als Folge eines noch weniger erfahrenen Immunsystems deuten kann (siehe Tabelle 9). Auch in unseren Daten zeigt sich eine weitere Anstiegstendenz der Memory Subsets im Erwachsenenalter, über 80-Jährige haben dann wieder niedrigere Prozentwerte an Gedächtniszellen.

In einem Review von Warnatz und Schlesier 2008 [24] wird am Rande und ohne Angaben zum Analyseverfahren eine Tabelle mit Referenzwerten veröffentlicht, die im Wesentlichen mit unseren Subtypen übereinstimmt. Die Daten basieren auf der Auswertung von 54 gesunden Probanden im Alter zwischen 19 und 61 Jahren, zusätzlich zu IgD wurde von den Autoren auch mit IgM-Aks gefärbt:

		Warnatz und Schlesier [24]	unsere Werte
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	Naive	42,6-82,3%	31,1-83,7%
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	IgD Memory	7,4-32,5%	4,1-42,1%
IgD <sup>-</sup> (IgM <sup>-</sup> ) CD27 <sup>+</sup>	Postswitch Memory	6,5-29,1%	6,1-39%
IgD <sup>++</sup> (IgM <sup>++</sup> ) CD24 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>	Transitional B	0,6-3,4%	0-6,8%
(IgM <sup>±</sup> ) CD24 <sup>-</sup> CD38 <sup>+++</sup> CD27 <sup>++</sup>	Plasmablasts	0,4-3,6%	0-3,5%

**Tabelle 10:** Vergleich der Studien. Werte als 5.-95. Perzentile in % aller B-Zellen.

Die Referenzbereiche von Warnatz und Schlesier sind etwas enger als unsere, ansonsten aber ähnlich.

Ein großes Plus unserer Untersuchung ist die Anwendung einer hochsensitiven FACS-Methode und die Analyse von 500.000 Events pro Messung, was für zuverlässige Daten sorgt und in der Folge für solide Referenzbereiche. Andere Autoren geben kaum die Anzahl der gemessenen Events in ihren Studien an, ein üblicher Wert wäre aber im Bereich von 10.000 Events (z. B. in [51]).

Eine Studie von Dass et al. [52] aus dem Jahr 2008 verwendet allerdings auch dieses hochsensitive Verfahren und diente als Vorlage für unser Protokoll. In diesem Paper wird das Ansprechen von Patienten mit rheumatoider Arthritis auf Therapie mit dem monoklonalen CD20 depletierenden Ak Rituximab untersucht, jedoch keine Referenzwerte für Gesunde angegeben.

Die letzte Studie, die ich hier anführen möchte, stammt von Jacobi et al. [29]. In dieser Arbeit konnte ein aktiviertes CD27<sup>-</sup> Memory B-Zell Subset mit dem Phänotyp CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD95<sup>+</sup> gefunden werden, dessen Häufigkeit mit der

Krankheitsaktivität von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses korreliert. Zusätzlich zu den Patientenkohorten werden kleine Kontrollgruppen mit 16 bzw. 18 Gesunden untersucht, jedoch werden von dieser Kontrollgruppe nur Werte für die Subtypen CD95<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> und CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> angeführt:

	Jacobi et al. [29]	unsere Werte
<b>CD95<sup>+</sup></b>	7,8% (5,5-16,1%)	16,4%
<b>CD27<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup></b>	5,1% (2,7-13,7%)	13,5%
<b>CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup></b>	3,4% (1,0-10,1%)	4% (2-10%)

**Tabelle 11:** Vergleich der Studien. Werte als Median (Spannweite) in % B-Zellen.

CD95 kommt bei Jacobi (7,8%) seltener auf B-Zellen vor als bei uns (16,4%) und auch bei Deneys et al. (13%). Auch die CD27<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> Memory-Zellen sind bei uns häufiger, die Werte für CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> Zellen sind ähnlich (siehe Tabelle 11).

In der Literatur konnten auch keine Referenzwerte für Personen im hohen Alter (z. B. über 80-Jährige) gefunden werden, damit sind in dieser Arbeit erstmals Veränderungen in der Verteilung der B-Zellsubsets bei Erwachsenen in verschiedenen Altersklassen dokumentiert.

## **Konklusion**

Das wachsende Wissen über Existenz und Funktion neuer Subpopulationen innerhalb der B-Lymphozyten setzt voraus, dass solide Referenzwerte bei Gesunden etabliert werden, bevor die neuen Erkenntnisse in Diagnostik und Therapie von Krankheiten Anwendung finden können. In dieser Arbeit konnten solche Referenzbereiche für zahlreiche Subsets generiert werden.

Bei der Datenanalyse zeigt sich kein signifikanter Geschlechtsbezug in der Verteilung der B-Zellen, aber - wie in der pädiatrischen B-Zellforschung bereits bekannt - es gibt auch beim Erwachsenen beachtliche altersabhängige Veränderungen, die auch in zukünftigen Untersuchungen zu berücksichtigen sein werden.

## Literaturverzeichnis

[1]Holländer GA. Immunologie Grundlagen für Klinik und Praxis. München: Elsevier; 2006.

[2]Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.

[3]Roitt IM, Brostoff J, Male DK, Harabacz I. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3., neubearb. Aufl.. ed. Stuttgart [u. a.]: Thieme; 1995.

[4]Ferencik M. Kompendium der Immunologie: Grundlagen und Klinik. Wien: Springer; 2006.

[5]Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:119-144.

[6]Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2010 Jan;87(1):93-106.

[7]Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010 Feb 5;327(5966):656-661.

[8]Janeway C. Immunobiology : the immune sytem health & disease. 5. ed. New York: Garland; 2001.

[9]Fietta P, Delsante G. Focus on human natural killer cells. *Riv Biol.* 2009 May-Aug;102(2):219-235.

[10]Biassoni R, Ugolotti E, De Maria A. NK cell receptors and their interactions with MHC. *Curr Pharm Des.* 2009;15(28):3301-3310.

[11]Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34-50.

[12]Frank MM. Complement disorders and hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S262-271.

[13]Male D. Infectious disease immunology. Milton Keynes, UK: The Open University; 2003.

[14]Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983 Apr 14;302(5909):575-581.

[15]Fugmann SD. The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination. *Semin Immunol.* 2010 Feb;22(1):10-16.

- [16]Livak F, Petrie HT. Somatic generation of antigen-receptor diversity: a reprise. *Trends Immunol.* 2001 Nov;22(11):608-612.
- [17]Jerne NK. The Natural-Selection Theory of Antibody Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1955 Nov 15;41(11):849-857.
- [18]Burnet F. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection *Australian Journal of Science.* 1957;20:67-69.
- [19]Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie.* 2. Aufl.. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009.
- [20]Male DK. *Immunology : an illustrated outline.* 4th ed. Edinburgh: Mosby; 2004.
- [21]Ganten D, Aretz S. *Grundlagen der molekularen Medizin.* 3., überarb. und erw. Aufl.. ed. Heidelberg: Springer; 2008.
- [22]Male D. *Immunologie auf einen Blick.* 1. dt. Aufl., entspr. der 4. engl. Aufl.. ed. München: Urban & Fischer; 2005.
- [23]Siegenthaler W, Amann-Vesti BR. *Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen.* 9., völlig neu bearb. Aufl.. ed. Stuttgart {[u.a.]}: Thieme; 2006.
- [24]Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 Sep;74(5):261-271.
- [25]Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol.* 2009 Jun;30(6):277-285.
- [26]Sack U. *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel: Karger; 2007.
- [27]Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998 Nov 2;188(9):1679-1689.
- [28]Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6624-6633.
- [29]Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1762-1773.
- [30]Amu S, Tarkowski A, Dorner T, Bokarewa M, Brisslert M. The human immunomodulatory CD25+ B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scand J Immunol.* 2007 Jul;66(1):77-86.

- [31]Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-497.
- [32]O’Gorman MR, Thomas J. Isotype controls--time to let go? *Cytometry*. 1999 Apr 15;38(2):78-80.
- [33]Lodish HF. *Molecular cell biology*. 4th ed. Basingstoke: Freeman; 2000.
- [34]Keystone EC. B cells in rheumatoid arthritis: from hypothesis to the clinic. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 May;44 Suppl 2:ii8-ii12.
- [35]Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Nov;50(11):3580-3590.
- [36]Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum*. 2004 Aug;50(8):2580-2589.
- [37]Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Dec;44(12):1542-1545.
- [38]Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):2793-2806.
- [39]Cohen SB, Keystone E, Genovese MC, Emery P, Peterfy C, Tak PP, et al. Continued inhibition of structural damage over 2 years in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in combination with methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):1158-1161.
- [40]Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Oct;5(10):572-577.
- [41]Halwachs-Baumann G, Brezinschek H-P. *Labormedizin Klinik - Praxis - Fallbeispiele*. Wien: Springer; 2006.
- [42]Le Caer F, Tubiana N, Sampol J, Carcassonne Y. [Lymphocyte phenotyping in the cord blood of newborn infants]. *Pathol Biol (Paris)*. 1987 Feb;35(2):184-186.
- [43]Hicks MJ, Jones JF, Minnich LL, Weigle KA, Thies AC, Layton JM. Age-related changes in T- and B-lymphocyte subpopulations in the peripheral blood. *Arch Pathol Lab Med*. 1983 Oct;107(10):518-523.

- [44]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 Jun;140(3):532-539.
- [45]Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol*. 2009 Apr;131(1):50-59.
- [46]Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):329-339.
- [47]Liu YJ, de Bouteiller O, Arpin C, Durand I, Banchereau J. Five human mature B cell subsets. *Adv Exp Med Biol*. 1994;355:289-296.
- [48]Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol*. 1995 Jul 1;155(1):190-202.
- [49]Deneys V, Mazzon AM, Marques JL, Benoit H, De Bruyere M. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Methods*. 2001 Jul 1;253(1-2):23-36.
- [50]Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper C, Ballmer B, Hansen A, Lipsky PE, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol*. 2009 Feb;130(2):199-212.
- [51]Lin Q, Gu JR, Li TW, Zhang FC, Lin ZM, Liao ZT, et al. Value of the peripheral blood B-cells subsets in patients with ankylosing spondylitis. *Chin Med J (Engl)*. 2009 Aug 5;122(15):1784-1789.
- [52]Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Oct;58(10):2993-2999.

# Anhang

## Probandeninformation

### ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der klinischen Prüfung

#### Erstellung eines normalen Referenzbereichs immunologischer Parameter

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband!

Wir laden Sie ein an der oben genannten epidemiologischen Erhebung teilzunehmen. Die Aufklärung darüber erfolgt in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch.

**Die Teilnahme an dieser Erhebung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne daß Ihnen hierdurch Nachteile entstehen.**

Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung dieser Erhebung ist Ihr schriftliches Einverständnis. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum Informationsgespräch mit Ihrem Arzt sorgfältig durch und zögern Sie nicht Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der Erhebung vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als TeilnehmerIn an dieser Erhebung im klaren sind.

Die epidemiologische Erhebung und diese ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und positiv beurteilt.

#### 1. Was ist der Zweck dieser Datenerhebung?

Für die Etablierung neuer Tests im Routinebetrieb sollte neben dem von den Herstellern angegebenen Referenzbereichen auch Normalwerte der Bevölkerung aus dem Einzugsgebiet ermittelt werden. Ausserdem gibt es für spezielle Bestimmungen, wie z.B. die B-Zell-Subtypisierung, keine bekannten Normbereiche. Durch Ihre Blutspende ist es möglich für immunologische Tests Referenzbereiche zu erstellen. Um eine subklinische Aktivierung des Immunsystems auszuschließen werden Blutbild, CRP und BSG bestimmt.

#### 2. Wie läuft die Datenerhebung ab?

Diese epidemiologische Erhebung wird an der Universitätsklinik für Innere Medizin, Klinische Abteilung für Rheumatologie durchgeführt. Es werden ungefähr 200 Personen daran teilnehmen.

Vor Aufnahme in diese Datenerhebung muss die TeilnehmerInneninformation gelesen und unterschrieben werden. Nach der einmaligen Blutabnahme (40ml) werden die Röhrchen mit einer fortlaufenden Nummer gekennzeichnet und das Alter und Geschlecht der Spenderin/des Spenders notiert. Es werden keine weiteren Angaben oder Proben benötigt.

Ich bin von Dr. \_\_\_\_\_ ausführlich und verständlich über mögliche Belastungen und Risiken, sowie über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Prüfung aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text dieser ProbandInnenaufklärung und Einwilligungserklärung, die insgesamt 3 Seiten umfasst gelesen. Aufgetretene Fragen wurden mir vom Prüfarzt/von der Prüffärztin verständlich und genügend beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Ich habe zur Zeit keine weiteren Fragen mehr.

Ich werde den ärztlichen Anordnungen, die für die Durchführung der Datenerhebung erforderlich sind, Folge leisten, behalte mir jedoch das Recht vor, meine freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden, ohne dass mir daraus Nachteile für meine weitere medizinische Betreuung entstehen.

Ich bin zugleich damit einverstanden, dass meine im Rahmen dieser Datenerhebung ermittelten Daten aufgezeichnet werden. Um die Richtigkeit der Datenaufzeichnung zu überprüfen, dürfen Beauftragte des Auftraggebers und der zuständigen Behörden beim Prüfarzt Einblick in meine personenbezogenen Krankheitsdaten nehmen.

Beim Umgang mit den Daten werden die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet.

Eine Kopie dieser ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Prüfarzt.

.....  
(Datum und Unterschrift des Probanden / der Probandin)

.....  
(Datum, Name und Unterschrift des verantwortlichen Arztes/der verantwortlichen Ärztin)

***(Der Teilnehmer/die Teilnehmerin erhält eine unterschriebene Kopie der ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung, das Original verbleibt im Studienordner des Prüfarztes.)***

3. **Worin liegt der Nutzen einer Teilnahme an der Klinischen Prüfung?**  
Für die Teilnehmerin/den Teilnehmer ergeben sich keine unmittelbaren Nutzen. Die Ergebnisse dieser Datenerhebung sollen dazu beitragen, dass PatientInnen mit immunologischen Erkrankungen besser diagnostiziert und therapiert werden können.
4. **Gibt es Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen?**  
Die im Rahmen dieser Datenerhebung durchgeführten Blutabnahmen stellen Routinemaßnahmen dar, können aber schmerzhaft sein und in sehr seltenen Fällen zu lokalen Infektionen und der Bildung von Blutgerinnseln führen.
5. **In welcher Weise werden die im Rahmen dieser Datenerhebung gesammelten Daten verwendet ?**  
Ihre Teilnahme an dieser Studie wird streng vertraulich behandelt. Die PrüferInnen und deren MitarbeiterInnen haben nur Zugang zu den anonymisierten Daten, da die Röhren nur mit einer fortlaufenden Nummer beschriftet werden.
6. **Entstehen für die TeilnehmerInnen Kosten? Gibt es einen Kostenersatz oder eine Vergütung?**  
Durch Ihre Teilnahme an dieser Datenerhebung entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten.
7. **Möglichkeit zur Diskussion weiterer Fragen**  
Für weitere Fragen im Zusammenhang mit dieser Datenerhebung stehen Ihnen Ihr Prüfartz und seine MitarbeiterInnen gern zur Verfügung. Auch Fragen, die Ihre Rechte als PatientIn und TeilnehmerIn an dieser Datenerhebung betreffen, werden Ihnen gerne beantwortet.

Name der Kontaktperson: Prof. Dr. Hans-Peter Brezinsek  
Ständig erreichbar unter: 0316 385 81835

Name der Kontaktperson: Dr. Babak Yazdani-Biuki  
Ständig erreichbar unter: 0316 385 81783

Name der Kontaktperson: Dr. Kerstin Brickmann  
Ständig erreichbar unter: 0316 385 80787

Name der Kontaktperson: Norbert Tripolt, BSc.  
Ständig erreichbar unter: 0316 385 6856

## 8. Einwilligungserklärung

Name des Probanden/Probandin: in Druckbuchstaben:

.....

Geb. Datum: .....

Ich erkläre mich bereit, an der oben genannten Datenerhebung teilzunehmen.

## LEBENS LAUF

Name	<b>Gregor GRADWOHL</b>	
Adresse	Mehlplatz 3, 8010 Graz, Österreich	
e-mail	<a href="mailto:gregor.gradwohl@stud.medunigraz.at">gregor.gradwohl@stud.medunigraz.at</a>	
Mobil	+43 676 9 45 45 33	
<b>Persönliches</b>		
Geburtsdatum	29.10.1984	
Geburtsort	Graz	
Staatsbürgerschaft	Österreich	
<b>Ausbildung</b>		
1990-1995	Volksschule in Gössendorf	
1995-2003	Gymnasium HIB Graz-Liebenau	
2003-2004	Wehrdienst (Sanitäter)	
2004-2010	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz	
04/2010	Winterlehrgang für Alpinmedizin zum „Diploma in Mountain Medicine“	
<b>Arbeitserfahrung</b>		
Ferialpraktikum	Sappi Austria Produktions-GmbH, Gratkorn	
Ferialpraktikum	Holz und Dach, Hausmannstätten	
	Tennis- und Schilehrer	
<b>Medizinische Arbeitserfahrung</b>		
	Mehrjährige ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter beim RK Lieboch	
2 Wochen	Herzchirurgie, LKH Graz	
2 Wochen	Kinderchirurgie, LKH Graz	
2 Wochen	Radiologie, LKH Graz	
2 Wochen	Pulmonologie, LKH Graz West	
4 Wochen	Traditionelle Chinesische Medizin, Cardinal Tien Hospital, Taipei / Taiwan	

4 Wochen	Anästhesiologie, UKH Graz
4 Wochen	Intensive Care Unit / Internal Medicine, Hospital Central Universitario, Chihuahua / México
<b>6. Studienjahr</b>	
Fächergruppe I	Thorax- und Hyperbare Chirurgie, LKH-Graz
Fächergruppe II	Innere Medizin, Barmherzige Brüder Graz-Eggenberg
Fächergruppe III	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Elisabethinen Graz
Famulatur Allgemeinmedizin	Ordination Dr. Elke Suetter, Gössendorf
<b>Spezielle Studienmodule (SSM)</b>	<p>topografische Anatomie der Extremitäten</p> <p>klinisch-topografische Anatomie der Eingeweide</p> <p>Case-based Learning in Klinik und Praxis</p> <p>Modernste Methoden zur Messungen der Body Composition</p> <p>Notfallmedizin</p>
<b>Wissenschaftliche Arbeit</b>	<p><u>G. Gradwohl</u>, V. Hagspiel, K. Gründl, W.B. Graninger, H.P. Brezinschek. Increased frequency of naive and transitional B cells in RA-patients. Ann Rheum Dis. 2010;69(Suppl3):667.</p> <p><u>G. Gradwohl</u>, V. Hagspiel, K. Gründl, W.B. Graninger und H.P. Brezinschek. Erhöhte Frequenz naiver und transitorischer B-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. „Rheuma Plus“ der Ärzte Woche. 2010;9(2):8-10.</p> <p>Poster akzeptiert V.Hagspiel, <u>G. Gradwohl</u>, U.Demel, W.B. Graninger, H.P. Brezinschek. Diminished naïve B cells in patients with selective immunoglobulin deficiencies. XIV ESID Congress 2010, 06.-09. Okt., Istanbul, Türkei.</p>
<b>Fähigkeiten</b>	<p>Führerschein der Klassen A+B</p> <p>Landesschullehrer-Anwärter</p> <p>Rettungssanitäterausbildung</p>
<b>Sprachkenntnisse</b>	<p>Englisch (8 Jahre im Gymnasium), Cambridge First Certificate (Grade A)</p> <p>Französisch (4 Jahre im Gymnasium)</p>
<b>Hobbies</b>	Tennis, Ski alpin und Tourenschielauf, Klettern, Windsurfen, Musik (Klavier), Reisen, etc.