

# **Altersabhängige Veränderungen im menschlichen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Pool auf Einzelzellebene**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kevin Bronischewski

aus Bochum, Deutschland

März 2023

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Marc Seifert
2. Gutachter: Prof. Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Katharina Fleischhauer

Tag der Disputation: 27.07.2023

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN  
*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/78831  
**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230825-062333-5

Alle Rechte vorbehalten.

Vermerk:

Teilergebnisse der Arbeit wurden publiziert:

Human Cord Blood B Cells Differ from the Adult Counterpart by Conserved Ig Repertoires and Accelerated Response Dynamics (2021).

Bettina Budeus, Artur Kibler, Martina Brauser, Ekaterina Homp, **Kevin Bronischewski**, J. Alexander Ross, Andre Görgens, Marc A. Weniger, Josefine Dunst, Taras Kreslavsky, Symone Vitoriano da Conceicao Castro, Florian Murke, Christopher C. Oakes, Peter Rusch, Dimitrios Andrikos, Peter Kern, Angela Köninger, Monika Lindemann, Patricia Johansson, Wiebke Hansen, Anna-Carin Lundell, Anna Rudin, Jan Dürig, Bernd Giebel, Daniel Hoffmann, Ralf Küppers, and Marc Seifert

The Journal of Immunology, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100113>

# Inhalt

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Das humane Immunsystem .....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Das humane angeborene Immunsystem .....</i>	<i>1</i>
1.3 <i>Das humane adaptive Immunsystem .....</i>	<i>4</i>
1.3.1 <i>Charakteristika der humanen adaptiven Immunantwort .....</i>	<i>4</i>
1.3.2 <i>B-Zell-Entwicklung und V(D)J-Rekombination.....</i>	<i>6</i>
1.3.3 <i>Humane B-Zell-Linien.....</i>	<i>9</i>
1.3.4 <i>Aufbau von Antikörpern und deren Funktion .....</i>	<i>11</i>
1.3.5 <i>Aktivierung von B-Zellen .....</i>	<i>13</i>
1.3.6 <i>Keimzentrumsreaktion.....</i>	<i>15</i>
1.3.7 <i>Antikörpersezernierende Zellen .....</i>	<i>17</i>
1.3.8 <i>Gedächtnis-B-Zellen.....</i>	<i>18</i>
1.3.9 <i>Unterschiede zwischen frühkindlichen und adulten Immunsystemen .....</i>	<i>20</i>
1.4 <i>Zielsetzung.....</i>	<i>22</i>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1 <i>Material.....</i>	<i>23</i>
2.1.1 <i>Geräte .....</i>	<i>23</i>
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>25</i>
2.1.3 <i>Nährmedien, Enzyme, Lösungen und Chemikalien.....</i>	<i>26</i>
2.1.4 <i>Puffer .....</i>	<i>28</i>
2.1.5 <i>Kits .....</i>	<i>29</i>
2.1.6 <i>Primer .....</i>	<i>29</i>
2.1.7 <i>Antikörper Durchflusszytometrie und FACS.....</i>	<i>30</i>
2.1.8 <i>Total-seq-Antikörper.....</i>	<i>31</i>
2.1.9 <i>Zelllinien.....</i>	<i>35</i>
2.1.10 <i>Software und Erweiterungen .....</i>	<i>35</i>
2.2 <i>Methoden .....</i>	<i>36</i>
2.2.1 <i>Probenmaterial.....</i>	<i>36</i>
2.2.2 <i>Isolierung humaner B-Zellen .....</i>	<i>36</i>

2.2.3 Durchflusszytometrie und Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen.....	37
2.2.4 Kultivierung und <i>in-vitro</i> -Aktivierung von humanen B-Lymphozyten.....	37
2.2.5 Proliferationsmessung .....	38
2.2.6 Messung von Zelltod und Apoptose .....	38
2.2.7 Messung der ASC-Differenzierung.....	39
2.2.8 Einzelzellanalyse ( <i>10X Genomics</i> ) .....	39
2.2.9 <i>Infinity Flow</i> Analyse .....	40
2.2.10 Antikörperproduktion .....	41
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1 Funktionelle Untersuchungen von neonatalen und adulten B-Zellen.....	49
3.2 Einzelzellanalyse der Genexpression humaner B-Zellen im Altersverlauf .....	56
3.3 Integrierte Einzelzellanalyse der Genexpression humaner B-Lymphozyten im Altersverlauf.....	59
3.3.1 Analyse von naiven B-Zellen im Altersverlauf .....	63
3.3.2 Analyse von Gedächtnis-B-Zellen im Altersverlauf .....	65
3.4 Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten PB-B-Zellen und UCB-B-Zellen.....	69
3.4.1 Etablierung von Nuklei-Isolierungen.....	69
3.4.2 Epigenetische Einzelzellanalysen.....	70
3.5 Isolierung und funktionelle Studien einzelner B-Zell-Populationen .....	74
3.5.1 Isolierung von Clustern .....	74
3.5.2 Funktionelle Studien zu putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen.....	81
3.6 Synthese von humanen rekombinanten Antikörpern .....	83
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>88</b>
4.1 B-Zellen aus Nabelschnurblut reagieren stärker auf T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Stimulierung .....	88
4.2 Die Transition von einem neugeborenen bzw. frühkindlichen zu einem ausgereiften und „adulten“ Immunsystem findet zwischen sieben und zehn Jahren statt. ....	89
4.3 Integrierte Einzelzellanalysen von B-Zell-Populationen verschiedener Altersstufen.....	90
4.4 Naive B-Zellen von Erwachsenen und Neugeborenen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung.....	92
4.5 In Neugeborenen existieren B-Zellen mit Gedächtnis-Signatur.....	94
4.6 Neugeborene B-Zellen unterscheiden sich in ihrer Chromatinzugänglichkeit.....	96
4.7 Putative naive und Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen zeigen ähnliche Proliferationseigenschaften ..	97

<i>4.8 Über die Produktion von klonotypischen Antikörpern aus Neugeborenen können Rückschlüsse auf die Spezifität dieser Antikörper gewonnen werden</i> .....	98
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>100</b>
<b>6 Summary</b> .....	<b>101</b>
<b>7 Ausblick</b> .....	<b>102</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>139</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>142</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>143</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>144</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sortierstrategie für funktionelle Untersuchungen an humanen UCB-B-Zellen sowie adulten PB-B-Zellen .....	50
Abbildung 2: Untersuchung des Proliferationsverhaltens von stimulierten UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen .....	51
Abbildung 3: Analyse der Differenzierung von UCB-B-Zellen bzw. adulten PB-B-Zellen zu antikörpersezernierenden Zellen .....	53
Abbildung 4: Analyse von Apoptose und Zelltod bei proliferierten UCB-B- und adulten PB-B-Zellen.....	54
Abbildung 5: Darstellung der Sortierstrategie für Einzelzellanalysen .....	56
Abbildung 6: Einzelzellanalyse der Genexpression von sieben verschiedenen Spenden im Alter von null bis 30 Jahren.....	57
Abbildung 7: Integrierte Analyse von acht Einzelzell-RNA-Profilen von Spendern im Alter von null bis 30 Jahren.....	60
Abbildung 8: Einzelzell-GSEA von acht integrierten Einzelzellprofilen.....	62
Abbildung 9: Integrierte Analyse der als naiv annotierten B-Zellen vom Neugeborenen bis zum adulten Spender.....	64
Abbildung 10: Analyse der als Gedächtnis-B-Zellen annotierten integrierten B-Zellen vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen.....	66
Abbildung 11: <i>Trajectory</i> -Analyse der als Gedächtnis-B-Zellen annotierten B-Zellen .....	67
Abbildung 12: Anteil von Gedächtnis-B-Zellen am Gesamt-B-Zell-Pool.....	68
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Beurteilung der Zell-Lyse-Effizienz.....	70
Abbildung 14: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen B-Zellen .....	71
Abbildung 15: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen putativen naiven B-Zellen .....	72
Abbildung 16: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen Gedächtnis-B-Zellen .....	73

Abbildung 17: Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen, die zwischen putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei UCB-B-Zellen unterscheiden. ....	75
Abbildung 18: <i>Infinity Flow</i> Analyse von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellmarkern bei UCB-B-Zellen .....	77
Abbildung 19 <i>Infinity Flow</i> Analyse von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellmarkern bei adulten PB B-Zellen.....	79
Abbildung 20: Repräsentative Durchflusszytometrische Analysen von naiven und Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen .....	80
Abbildung 21: Sortierstrategie von putativen Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut .....	81
Abbildung 22: Proliferationsverhalten von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zell- Populationen im Neugeborenen und Erwachsenen .....	82
Abbildung 23: PCR der Sequenzen der variablen Regionen von schwerer und leichter Kette.....	85
Abbildung 24: Restriktionsverdau von VH- und VL-Sequenz im pGEMT-Vektor.....	86
Abbildung 25: Gesamtproteinbestimmung der Antikörperproduktion .....	87
Abbildung 26: Bestimmung von Antikörpern im aufgereinigten Zellkulturüberstand.	87
Abbildung 27: Expressionsvektoren für Antikörperproduktion .....	140
Abbildung 28: Klonierungsvektor.....	141



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte .....	23
Tabelle 2: Liste der in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 3: Liste der in der Arbeit verwendeten Nährmedien, Enzyme, Lösungen und Chemikalien .....	26
Tabelle 4: Liste der in der Arbeit verwendeten Puffer .....	28
Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten Kits .....	29
Tabelle 6: Liste der in der Arbeit verwendeten Primer .....	29
Tabelle 7: Liste der in der Arbeit verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie und FACS.....	30
Tabelle 8: Liste der in der Arbeit verwendeten Antikörper für <i>scCITE-seq</i> .....	31
Tabelle 9: Liste der in der Arbeit verwendeten Zelllinien .....	35
Tabelle 10: Liste der in der Arbeit verwendeten Software bzw. deren Erweiterung ..	35
Tabelle 11: Mastermix der PCR .....	42
Tabelle 12: Programm PCR .....	42
Tabelle 13: Programm Sequenzreaktion.....	45
Tabelle 14: Schema Restriktionsverdau.....	45
Tabelle 15: Klonotypen von Neugeborenen beim Vergleich der schweren Ketten von Einzelzell-BCR-Sequenzierungen und Tiefensequenzierungen von BCRs.....	84
Tabelle 16: Verwendete <i>Genesets</i> für die GSEA .....	139

# Abkürzungsverzeichnis

AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i> (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase)
ASC	<i>Antibody secreting cell</i> (Antikörpersezernierende Zelle)
ATAC	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	<i>Brilliant violett</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>CITE</i>	<i>Cellular indexing of transcriptomes and epitopes</i>
CDR	<i>Complementary determining Region</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CpG	Unmethyliertes CpG-Dinukleotid
CXCL	Chemokin-Ligand
CXCR	Chemokin-Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DZ	<i>Dark zone</i>
Et al.	Et alia (und andere)
Fab-Fragment	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FB	<i>Feature barcode</i>
Fc-Fragment	<i>Fragment crystallizable</i>

FDCs	<i>Follicular dendritic cells</i> (follikuläre dendritische Zellen)
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FR	<i>Framework region</i>
GC	<i>Germinal center</i> (Keimzentrum)
GEX	<i>Gene expression library</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney-Zellen</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i> (Hämatopoetische Stammzellen)
HV	Hypervariable Region
Ig	Immunglobulin
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Immunglobuline der Klassen A, D, E, G und M
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
kDa	Kilodalton
L-Kette	Leichte Kette
LZ	<i>Light zone</i>
MACS	<i>Magnet-activated cell sorting</i> (Magnetisch-aktivierte Zellsortierung)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-Nukleotide	<i>Non-germline</i> Nukleotide
PAMP	<i>Pattern</i>
PB	Peripheres Blut
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

PCA	<i>Principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
P-Nukleotide	Palindromische Nukleotide
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RIG-I-like	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHM	Somatische Hypermutation
sMZ	Splenische Marginalzone
TAE-Puffer	Tris-acetat-EDTA-Puffer
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TD	<i>T cell dependent</i> (T-Zell-abhängig)
TdT	Terminale Desoxynucleotidyltransferase
Tfh	T-follikuläre Helferzelle
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TI	<i>T cell independent</i> (T-Zell-unabhängig)
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
UCB	<i>Umbilical cord blood</i> (Nabelschnurblut)
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
V-, D-, J-, C-Segment	<i>variability-, diversity, joining, constant-</i> Segment
WB	Western Blot

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein aufeinander abgestimmtes Geflecht aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Proteinen. Es ist verantwortlich für die Abwehr körperfremder Pathogene, beispielsweise Bakterien oder Giftstoffe sowie für die Homöostase des Organismus selbst, wie der Neutralisierung von entarteten, körpereigenen Zellen. (Murphy und Weaver 2017).

Man unterscheidet zwei Komponenten des Immunsystems: Das angeborene Immunsystem sowie das adaptive Immunsystem (Kindt et al. 2007). Das angeborene Immunsystem reagiert schnell und unspezifisch auf pathogene Strukturen, das adaptive Immunsystem durch Reifung und durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses (Alberts et al. 2008). Grundlegende Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem ist die korrekte Unterscheidung zwischen fremd und selbst (Chaplin 2006). Ist das Immunsystem nicht in der Lage, diesen Unterschied zu leisten, drohen schwere Immundefekte oder Autoimmunkrankheiten wie beispielsweise multiple Sklerose (Sospedra und Martin 2005), systemischer Lupus erythematodes (Mok und Lau 2003) oder Diabetes mellitus Typ 1 (DiMeglio et al. 2018). Darüber hinaus erhöhen Dysregulationen des Immunsystems die Chancen für die Bildung von Krebs (Gonzalez et al. 2018) oder Allergien (Ring et al. 2001). Im Folgenden wird auf die jeweiligen Komponenten des Immunsystems sowie deren Rolle bei Immunantworten eingegangen.

## 1.2 Das humane angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter als das adaptive (Thompson 1995). Bereits sehr früh in der Evolution von Vielzellern haben sich Mechanismen ausgebildet, die eine unspezifische Erkennung und Neutralisierung einer großen Bandbreite an Pathogenen ermöglichten. Diese Mechanismen sind vielschichtig ausgeprägt und auch im Menschen, besonders zu Beginn einer Infektion, von entscheidender Bedeutung (Alberts et al. 2008).

Die erste Linie der Verteidigung gegenüber Pathogenen bilden anatomische Barrieren wie die Haut oder Schleimhäute der respiratorischen Gewebe und des Darmtraktes,

welche das Eindringen von Pathogenen verhindern. (Gallo und Hooper 2012). Zusätzlich befinden sich auf diesen anatomische Barrieren eine Vielzahl antimikrobieller Peptide (Zasloff 2002). Aufgabe dieser Peptide, darunter Defensine, Cathelicidine oder C-Typ Lektine ist die Lyse oder Markierung von kontaktierenden Pathogenen (Mukherjee et al. 2008). Die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen erfolgt bei antimikrobiellen Strukturen auf unterschiedlichen Wegen. Einige antimikrobielle Peptide, wie beispielsweise das Lysozym, binden und spalten bestimmte Oberflächenmuster, die ausschließlich in Zellwänden von Bakterien und nicht beim Menschen vorkommen (Callewaert und Michiels 2010).

Überwindet ein Erreger diese Barrieren und dringt in den Organismus ein, wird er mit dem Komplementsystem konfrontiert. Das Komplementsystem umfasst eine Gruppe von Proteinen, die gelöst im Blut vorliegen und bei Pathogenkontakt in einer geordneten Kaskade miteinander interagieren (Janssen et al. 2005). Das Ziel dieser Reaktionen ist die Etablierung eines entzündlichen Milieus, die Markierung eindringender Erreger für bestimmte Immunzellen sowie die direkte Lyse von ebendiesen Erregern (Hosea et al. 1980). Das Komplementsystem ist in der Lage, Kohlenhydrate, gebundene Proteine oder allgemeine Oberflächenstrukturen auf Mikroorganismen zu erkennen und so von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden (Gros et al. 2008).

Zusätzlich zum Komplementsystem umfasst die angeborene Immunität eine zelluläre Komponente. Die meisten Zellen der angeborenen Immunität sind Teil der myeloischen Zelllinie und haben somit den *common myeloid progenitor* (CMP) als Ursprungszelle (Alberts et al. 2008). Aus dieser Ursprungszelle gehen unter anderem Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten (eosinophile, basophile und neutrophile Zellen) (Akashi et al. 2000), ein Großteil der dendritischen Zellen (Steinman und Inaba 1999) und Mastzellen (Franco et al. 2010) hervor. Makrophagen (Hirayama et al. 2017), Granulozyten (Lin und Loré 2017) sowie dendritische Zellen (Henderson et al. 1997) gehören zur Gruppe der phagozytierenden Zellen, welche Pathogene nach Erkennung aufnehmen und lysieren. Darüber hinaus sind Makrophagen beim Auslösen von Entzündungsreaktionen (Fujiwara und Kobayashi 2005) und Präsentieren von Antigenen (Unanue 1984) involviert. Mastzellen sind hauptsächlich aufgrund ihres IgE-vermittelten Mechanismus bei allergischen Reaktionen bekannt,

haben aber auch andere Aufgaben wie beispielsweise die Abwehr von Parasiten (Krystel-Whittemore et al. 2015). Mehr noch als Makrophagen gelten dendritische Zellen als wichtigste antigenpräsentierende Zellen, welche eine Vielzahl pathogener Stoffe durch Phagozytose oder Makropinozytose aufnehmen und den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. Aus diesem Grund gelten dendritische Zellen als ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität (Cabeza-Cabrero et al. 2021). Aus der lymphoiden Vorläuferlinie (*common lymphoid progenitor*, CLP), gehen unter anderem die angeborenen lymphatischen Zellen (*innate lymphoid cells*, ILCs) sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) hervor (Spits et al. 2013). ILCs sezernieren Zytokine, die wichtig für die Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, der Abwehr von Parasiten sowie der Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden sind (Panda und Colonna 2019). NK-Zellen spielen besonders bei der Abtötung von entarteten Zellen und von virusinfizierten Zellen eine Rolle. Sie wirken direkt über die Ausschüttung zytotoxischer Granula (Vivier et al. 2008).

Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen für die Erkennung von Pathogenen eine Vielzahl keimbahncodierter und unveränderlicher Rezeptoren, die sowohl intra- als auch extrazellulär Bedrohungen erkennen können. Diese Rezeptoren werden als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) und deren Liganden als pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet (Janeway und Medzhitov 2002; Akira et al. 2006). Es gibt viele verschiedene Familien von Mustererkennungsrezeptoren. Hierzu zählt die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLRs), welche beim Menschen aus mindestens zehn Mitgliedern besteht, die sowohl intra- als auch extrazellulär exprimiert werden und so unterschiedliche Antigene wie Lipopolysaccharide (TLR-4), Flagellin (TLR-5) einzelsträngige RNA (TLR-7 und TLR-8) sowie unmethyliertes CpG (TLR-9) erkennen (Akira et al. 2006). Neben den Toll-like-Rezeptoren stellen NOD-like-Rezeptoren (NLRs) eine weitere Familie von Mustererkennungsrezeptoren dar. NLRs sind Rezeptoren, welche ausschließlich intrazellulär exprimiert werden und mikrobielle Pathogene als Liganden besitzen (Fritz et al. 2006). Des Weiteren gibt es die Familie der *Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors* (RIG-I-like-Rezeptoren), welche spezifisch virale Nukleinsäuren erkennen (Pichlmair et al. 2006).

NK-Zellen unterscheiden zwischen gesunder und infizierter Zelle über ein Netzwerk aus inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren. Verliert eine virusinfizierte Zelle beispielsweise die Eigenschaft Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteine der Klasse I (MHC-Klasse-I-Proteine) auszuprägen, welche eine große Bedeutung bei der Präsentation von Antigenen haben, werden die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle nicht mehr aktiviert und die NK-Zelle geht dazu über, die infizierte Zelle zu töten (Lanier 2005).

Zusammenfassend verhindert das angeborene Immunsystem das Eindringen von Pathogenen in den Körper, etabliert durch das Ausschütten von Zytokinen Entzündungen und identifiziert sowie neutralisiert invadierende Pathogene schnell und effizient durch verschiedene Mechanismen. Es fungiert ebenso als Schnittstelle für das adaptive Immunsystem, indem es an der Antigenpräsentation beteiligt ist und auf diese Weise die Zellen des angeborenen Immunsystems, die B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen), aktiviert.

## **1.3 Das humane adaptive Immunsystem**

### **1.3.1 Charakteristika der humanen adaptiven Immunantwort**

Die hervorstechenden Merkmale des adaptiven Immunsystems sind die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses sowie eine individuell an den Erreger angepasste Spezifität. Diese Eigenschaften werden maßgeblich von den beiden Zelltypen des adaptiven Immunsystems, den B- und T-Zellen, vermittelt (Murphy und Weaver 2018).

B- und T-Zellen entstehen aus CLPs und erfahren ihre ersten Entwicklungsschritte im Knochenmark, einem primären lymphatischen Organ (Boehmer und Melchers 2010). Während B-Zellen ihre Reifung im Knochenmark vervollständigen (Ichii et al. 2014), wandern T-Zellen für deren finale Entwicklung in den Thymus, ein weiteres primäres lymphatisches Organ (Godfrey und Zlotnik 1993). Nach ihrer Reifung wandern Lymphozyten durch Blut und Lymphe und sitzen in sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten sowie im Gewebe (Springer 1994). B-Zellen und T-Zellen werden auf unterschiedliche Wege aktiviert. Die Art der Aktivierung ergibt sich aus der für den jeweiligen Subtyp charakteristischen Expression des Antigenrezeptors



und der sich daran anschließenden Signalkaskade. T-Zellen exprimieren den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) auf ihrer Oberfläche und erkennen über diesen Proteinantigene, die von antigenpräsentierenden Zellen über MHC-Moleküle präsentiert werden (Lanzavecchia und Sallusto 2001). MHC-Moleküle sind Proteine, die auf der Zellmembran verankert sind und in zwei Klassen unterteilt werden: MHC-Klasse I Moleküle und MHC-Klasse II Moleküle (Swain 1983). Diese beiden Klassen werden auf verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert. MHC-Klasse I Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen ausgeprägt, während die Expression von MHC-Klasse II Molekülen auf Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen, Makrophagen oder dendritische Zellen beschränkt ist (Rock et al. 2016). Mit MHC-Molekülen werden ausschließlich Proteinantigene präsentiert. Wird eine gesunde Zelle beispielsweise von Viren infiziert oder internalisiert Pathogene, werden deren Proteinanteile degradiert und ein MHC-Molekül mit dem resultierenden Peptid „beladen“. Das beladene MHC-Molekül wird zur Zellmembran transportiert und präsentiert dort das Antigen (Neefjes et al. 2011). Für die Erkennung von Antigen-MHC-Komplexen benötigen T-Zellen bestimmte Ko-Rezeptoren. MHC-Klasse I Moleküle können nur von T-Zellen erkannt werden, die den Ko-Rezeptor CD8 ausdrücken und MHC-Klasse II Moleküle nur von T-Zellen, die den Ko-Rezeptor CD4 exprimieren (König et al. 1992). CD4-positive Zellen werden als T-Helferzellen und CD8-positive Zellen als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterscheiden sich erheblich in ihren Effektorfunktionen (Salgame et al. 1991). CD8-positive T-Zellen neutralisieren Zellen, die über ihre MHC-I Moleküle bspw. virale Peptide präsentieren. Dies geschieht bei Säugern vor allem über die Ausschüttung von Perforin sowie über den FAS-Signalweg (Lowin et al. 1994). CD4-positive T-Zellen werden in mehrere Subgruppen unterteilt. Hierzu gehören Th1-, Th2- und Th17-Helferzellen sowie regulatorische T-Helferzellen (Yamane und Paul 2013). Th1-, Th2- und Th17-Helferzellen modulieren die Immunantwort über die Ausschüttung von Zytokinen und regulatorische T-Helferzellen können Immunreaktionen abschwächen oder ganz inhibieren (Zhu und Paul 2010). Eine weitere wichtige Gruppe von T-Helferzellen sind folliculäre T-Helferzellen (Tfh). Diese sind essenziell für die Aktivierung von B-Zellen und stellen somit das Bindeglied zwischen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten dar. Tfh sind darauf spezialisiert von B-Zellen präsentierte Antigene in lymphoiden Organen zu erkennen und spielen somit

eine gewichtige Rolle bei der Generierung hochspezifischer Antikörper sowie bei der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (King 2009).

### 1.3.2 B-Zell-Entwicklung und V(D)J-Rekombination

Die Entwicklung von CLPs zu funktionsfähigen und reifen B-Lymphozyten ist eine komplexe Kaskade von zellulären Differenzierungsschritten mit vielen Kontrollpunkten, die eng an die einzelnen Schritte der genetischen Rekombination gekoppelt ist (LeBien und Tedder 2008).

B-Zellen sind charakterisiert durch die Expression individueller B-Zell-Rezeptoren (*B cell receptors*, BCRs), die für die Erkennung von Antigenen zuständig sind (Marchalonis 1975; Stall et al. 1996; Nurieva et al. 2009; Rajewsky 1996; Nakayama et al. 2003; Yu et al. 2008). Die notwendige Vielfalt an BCRs wird generiert durch im Genom befindliche Gensegmente, die jeweils als Variabilitäts- (*variability*, V), Vielfalts- (*diversity*, D), Verknüpfungs- (*joining*, J) oder konstantes (*constant*, C) Segment bezeichnet werden (Rechavi et al. 1982). Diese Genfragmente, die frei kombinierbar sind, kodieren, sofern korrekt umgelagert, für einen funktionellen BCR (Brack et al. 1978). Jeder BCR besteht aus zwei schweren Ketten (*heavy chains*, H-Kette) und zwei leichten Ketten (*light chains*, L-Ketten). Der Genlocus für die schwere Kette befindet sich auf Chromosom 14. Im Menschen gibt es bei der schweren Kette ca. 40 V-Segmente, 23 D-Segmente und sechs J-Segmente (Ravetch et al. 1981; Ichihara et al. 1988; Cook et al. 1994; Corbett et al. 1997; Matsuda et al. 1998; Lefranc 2001). Bei der leichten Kette wird zwischen den Isotypen der  $\lambda$ -Kette und der  $\kappa$ -Kette unterschieden (Milstein 1966). Im  $\kappa$ -Ketten-Lokus existieren ca. 35 V- und fünf J-Segmente und im  $\lambda$ -Ketten-Lokus ca. 30 V-, vier bis fünf J-Segmente. Leichte Ketten besitzen keinen Genlocus für D-Segmente. Während der B-Zell-Entwicklung wird immer jeweils eines der verschiedenen Segmente für den Aufbau einer BCRs zufällig ausgewählt (Schäble und Zachau 1993; Jaenichen et al. 1984; Klobeck et al. 1985; Meindl et al. 1990; Huber et al. 1993; Fripiat und Lefranc 1994; Chuchana et al. 1990).

Die chemischen Reaktionen der Umlagerung der Gensegmente werden durch spezifische Proteine katalysiert. Die Transkription dieser Proteine wird durch die Ausprägung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie E2A und EBF (O'Riordan und Grosschedl 1999) ausgelöst. Dies führt zur Ausprägung der Proteine RAG1 und RAG2

(Oettinger et al. 1990). Diese Proteine bilden einen Komplex, der zuerst eine Faltung der DNA bewirkt und durch eine Nukleaseaktivität des RAG1-RAG2-Komplexes zu einer Spaltung an einer definierten Nukleotidsequenz mit anschließender Ausbildung einer Haarnadelstruktur an den Enden führt. Die ausgeschnittene Sequenz wird aus dem Genom entfernt und die codierenden Sequenzen werden neu zusammengefügt (Sadofsky 2001). Dies geschieht durch die Anlagerung des Ku70-Ku80-Komplexes an die jeweiligen Enden der DNA. An dieses Proteindimer bindet der DNA-PK-Artemis-Komplex und öffnet die Haarnadelstruktur an einer zufälligen Stelle, wodurch freie Einzelstränge entstehen (Spagnolo et al. 2006). Durch die Öffnung der Haarnadelstruktur entstehen an den Einzelsträngen palindromische DNA-Sequenzen, die als P-Nukleotide bezeichnet werden (Lafaille et al. 1989). An diese Sequenzen werden durch das Protein terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) zufällig und ohne DNA-*Template* Nukleotide hinzugefügt. Diese matrizunabhängig angehängten Nukleotide werden als N-Nukleotide (*non-germline nucleotides*) bezeichnet (Landau et al. 1987). Durch Exonukleaseaktivitäten werden beide Einzelstränge so lange enzymatisch abgebaut bis zueinander komplementäre Teilsequenzen vorliegen und durch den DNA-LigaseIV-XRCC4-Komplex wieder verknüpft werden (Francis et al. 2014). Dieser als junctionale Diversität bezeichneten Prozess trägt zu einem großen Teil zur Einzigartigkeit von BCRs bei (Jeske et al. 1984). Während der V(D)J-Rekombination werden alle Segmente auf diese Weise zusammengefügt.

Das erste Stadium der Entwicklung ist die Differenzierung von einer CLP-Zelle zu einer frühen Pro-B-Zelle (Loken et al. 1987). In diesem Stadium findet die Umlagerung eines D- an ein J-Segment statt, wodurch sich eine späte pro-B-Zelle entwickelt. In dieser Phase wird im Lokus der schweren Kette zufällig ein V-Gensegment zu dem bereits bestehenden DJ-Fragment angefügt (Davi et al. 1997; Francis et al. 2014; Bertrand et al. 1997). Die zufällige Verknüpfung von V-, D- und J-Segmenten wird als kombinatorische Diversität bezeichnet und ist ein weiterer Mechanismus, der zur Einzigartigkeit eines BCRs beiträgt (Glanville et al. 2009). Sofern die Umlagerungen nicht erfolgreich waren, bspw. durch Generierung eines Stopp-Codons, findet eine neue Umlagerung auf dem zweiten Allel statt. Ist diese Umlagerung ebenfalls nicht erfolgreich, stirbt die Zelle (LeBien 2000). Bei erfolgreicher Umlagerung wird das Stadium der großen Prä-B-Zelle erreicht. Hier wird an das Transkript des umgelagerten VDJ-Fragments ein Transkript des C-Segments gespleißt, wodurch

eine vollständige schwere Kette entsteht (Cooper 1981; Nishimoto et al. 1991). Diese wird gemeinsam mit einer Surrogat-L-Kette, die stellvertretend für eine spätere L-Kette eingebaut wird, als Prä-B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert und besteht aus den Proteinen VpreB und  $\lambda 5$  (Sakaguchi und Melchers 1986; Melchers 2005). Werden mehrere Prä-B-Zell-Rezeptoren stabil auf der Oberfläche ausgeprägt und sind in der Lage Cluster zu bilden, werden Überlebenssignale an die Zelle gesendet (Bankovich et al. 2007). Dies hat zur Folge, dass die Zelle beginnt zu proliferieren und dass das zweite Allel für die schwere Kette nicht weiter umgelagert wird (Allelausschluss). Andernfalls entstünde eine B-Zelle mit zwei unterschiedlichen BCRs und verschiedenen Spezifitäten (Vettermann und Schlissel 2010; Hauser et al. 2014). Die proliferierenden großen Prä-B-Zellen differenzieren in kleine Prä-B-Zellen und beginnen mit der Umlagerung der Genloki, die für die leichte Kette kodieren. In dieser Entwicklungsstufe wird kein Prä-B-Zell-Rezeptor ausgeprägt (Melchers et al. 2000). Da leichte Ketten kein D-Segment enthalten, wird an dieser Stelle nur ein V- mit einem J-Segment verbunden. Findet eine produktive Umlagerung statt, werden die anderen Allele wie bei der schweren Kette nicht weiter umgelagert. Zusätzlich kommt es zu einem Isotypenausschluss (Hieter et al. 1981; Bräuninger et al. 2001). Bei produktiver Umlagerung beider Ketten assoziieren diese miteinander und es wird ein BCR auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieses Stadium wird als unreife B-Zelle bezeichnet (Rolink et al. 1994). Durch die beliebige Kombination von schwerer und leichter Kette ergibt sich eine weitere Stufe der Vielfalt an BCRs. Unreife B-Zellen und deren neu rekombinierter Rezeptor werden in dieser Entwicklungsstufe auf Spezifitäten gegenüber körpereigenen Strukturen überprüft (zentrale Toleranz) (Nemazee 2017). Liegt eine starke Autoreaktivität vor, können die restlichen Allele für die leichte Kette nochmals umgelagert werden. Dieser Vorgang wird als Rezeptoreditierung (*receptor editing*) bezeichnet (Melamed et al. 1998; Pelanda et al. 1997). Liegt nach weiteren Umlagerungen erneut ein stark autoreaktiver Rezeptor vor, geht die Zelle in Apoptose (klonale Deletion) (Nemazee und Buerki 1989). Reagiert der BCR schwach auf Autoantigene, geht die B-Zelle in den Zustand der Anergie über. Anergie beschreibt einen reversiblen Zustand, in dem eine B-Zelle nicht mehr auf ihr Antigen reagiert (Pike et al. 1982). Bei keiner oder sehr schwacher Autoreaktivität verlässt die Zelle das Knochenmark. Dies geschieht bei Säugern durch die Expression des Rezeptors S1PR1 (Allende et al. 2010). Die weitere Reifung der B-Zelle findet in der Peripherie

statt. Unreife B-Lymphozyten in der Peripherie werden als transitionelle B-Zellen bezeichnet (Carsetti et al. 1995).

Da nicht alle Autoantigene des gesamten Körpers im Knochenmark vorhanden sind, müssen unreife B-Zellen in der Peripherie auf Autoreaktivität hin geprüft werden (periphere Toleranz) (Wardemann et al. 2003; Chen et al. 2022). Wie schon im Knochenmark, unterliegen auch periphere B-Zellen einem strengen Kontrollmechanismus. Abhängig vom Grad der Autoreaktivität gehen B-Zellen gegebenenfalls in Apoptose (klonale Deletion) oder Anergie über (Hartley et al. 1991; Hartley et al. 1993). Transitionelle B-Zellen wandern durch den Körper, insbesondere durch periphere lymphatische Organe, vor allem die Milz, und vervollständigen dort ihre Reifung (Chung et al. 2003; Loder et al. 1999). In Lymphfollikeln werden von verschiedenen Zelltypen Moleküle wie BAFF und APRIL ausgeschüttet, die an verschiedene Rezeptoren auf transitionellen B-Zellen wie dem BAFF-Rezeptor, BCMA und TACI binden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren sendet transitionellen Zellen Überlebenssignale (Wu et al. 2000; Yu et al. 2000; Batten et al. 2000; Mackay et al. 2003). Diese exprimieren, ermöglicht durch alternatives Spleißen, neben  $\mu$  überwiegend den Isotyp  $\delta$  und werden als IgD-positive reife, naive Zelle bezeichnet (Moore et al. 1981; Chen und Cerutti 2010; Enders et al. 2014; Pioli et al. 2014).

Reife B-Zellen bewegen sich durch verschiedene Gewebe, lymphatische Organe und Lymphe bis sie auf komplementäre Antigene treffen oder sterben nach einigen Wochen der Zirkulation, falls keine Aktivierung erfolgt ist. Neben dieser als folliculäre oder B2-Zellen bekannten B-Zell-Linie existieren mit B1-Zellen und splenischen Marginalzonen-B-Zellen weitere Linien im Menschen (Allman und Pillai 2008).

### **1.3.3 Humane B-Zell-Linien**

B1-Zellen, B2-Zellen und splenische Marginalzonen-B-Zellen unterscheiden sich durch verschiedene Entwicklungsstadien, ihrer Lokalisation im Körper, ihre Funktion während einer Immunantwort sowie durch ihr BCR-Repertoire (Prieto und Felipe 2017).

B1-Zellen wurden zuerst bei Mäusen entdeckt und durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD5 charakterisiert (Stall et al. 1996). Heute unterscheidet man

CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> B1-Zellen, die als B1a- bzw. B1b-Zellen bezeichnet werden (Baumgarth 2011). B1-Zellen entwickeln sich ontogenetisch früher als konventionelle B2-Zellen und stellen die Quelle natürlicher Antikörper (IgM) dar (Hayakawa et al. 1983). Diese natürlichen Antikörper werden von B1-Zellen ohne vorherige Stimulation sezerniert, sind polyreaktiv (Duan und Morel 2006), autoreaktiv (Hayakawa et al. 1986a) und spielen bei der angeborenen Immunabwehr eine Rolle (Hayakawa et al. 1986b). Murine B1-Zellen entwickeln sich bereits in der fötalen Leber, anders als konventionelle B2-Zellen, die erst kurz vor der Geburt im Knochenmark entstehen (Montecino-Rodriguez und Dorshkind 2012). Fötale hämatopoetische Stammzellen (HSCs) produzieren vornehmlich B1-, adulte HSCs überwiegend B2-Zellen (Montecino-Rodriguez et al. 2016). In erwachsenen Mäusen entstehen B1-Zellen hauptsächlich durch Selbsterneuerung, vor allem in der peritonealen Leibeshöhle (Beaudin und Forsberg 2016).

Die Existenz bzw. Definition von B1-Zellen beim Menschen wird kontrovers diskutiert. So ist beispielsweise CD5 als alleiniger Marker für eine Phänotypisierung unzureichend (Sims et al. 2005; Lee et al. 2009). Weitere typische murine B1-Zell-Marker (z.B. CD11b oder CD43) konnten ebenfalls nicht auf den Menschen übertragen werden (Budeus et al. 2021). Versuche, durch komplexere Kombinationen von Oberflächenmolekülen, ein humanes Gegenstück zu murinen B1-Zellen zu finden, schlugen ebenso fehl (Rock et al. 2016; Griffin et al. 2011). Vergleichende Genexpressionsanalysen bei Mäusen und Menschen zeigten, dass typische Gene wie *Arid3a* (Zhou et al. 2015) oder *Bhlhe41* (Kreslavsky et al. 2017), die in murinen B1-Zellen verstärkt ausgeprägt werden, in menschlichen B-Zell-Populationen keine signifikant erhöhte Expression aufweisen (Budeus et al. 2021). Im Gegensatz dazu wurden auf funktioneller Ebene Gemeinsamkeiten zwischen murinen B1-Zellen und menschlichen UCB-B-Zellen gefunden. Ein Beispiel für diese Übereinstimmungen sind eine schnelle T-Zell-unabhängige IgM-Sezernierung (Griffin et al. 2011). Die ontogenetische Entwicklung sowie die genauen Vorläuferzellen von humanen B1-Zellen sind weitgehend ungeklärt (Kageyama und Katayama 2020).

Splenische Marginalzonen-B-Zellen (sMZ-B-Zellen) sind gewebsresidente IgM<sup>+</sup> Lymphozyten, die an der Grenze von roter zu weißer Pulpa in der Milz lokalisiert und durch eine verstärkte Ausprägung des Komplementrezeptors CD21 charakterisiert

sind (Steiniger und Barth 2000; Cariappa et al. 2001). Die wichtigsten Aufgaben der Milz selbst sind die Filtration von Blut sowie die Neutralisierung von dort befindlichen Pathogenen, welche maßgeblich von sMZ-B-Zellen erkannt werden (Martin et al. 2001). Die Neutralisierung von Pathogenen erfolgt unabhängig von T-Zell-Stimulation (Amlot und Hayes 1985). Zwischen sMZ-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen gibt es Überschneidungen bezüglich der Expression von CD27 und dem Mutationsstatus der V-Gene (Steiniger et al. 2005; Tangye et al. 1998). Eine keimzentrumsabhängige Diversifizierung von sMZ-B-Zellen wird ausgeschlossen (Willenbrock et al. 2005). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sMZ- und konventionelle B-2-Zellen dieselben Vorläuferzellen haben. Erst im Stadium der transitionellen B-Zelle teilen sich die Linien in der Milz auf (Tull et al. 2021).

### 1.3.4 Aufbau von Antikörpern und deren Funktion

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind die lösliche Form des B-Zell-Rezeptors und gelten als Effektoreinheit der humoralen Immunität. Durch hohe Spezifität bilden sie ein wichtiges Grundgerüst des adaptiven Immunsystems, sind aber auch Baustein der angeborenen Immunität (Forthal 2014). Im Folgenden wird auf den Aufbau eines Antikörpermoleküls und auf die Funktion bei einer Immunantwort eingegangen.

Die Grundeinheit eines humanen Antikörpers ist wie ein „Y“ aufgebaut. Er besteht, wie auch der B-Zell-Rezeptor, aus vier Ketten: Zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten (Alzari et al. 1988). Abhängig vom Isotyp des Antikörpers werden Immunglobulin M (IgM,  $\mu$ ), Immunglobulin D (IgD,  $\delta$ ), Immunglobulin G (IgG1-IgG4,  $\gamma$ 1-4), Immunglobulin A (IgA1,  $\alpha$ 1 und IgA2,  $\alpha$ 2) sowie Immunglobulin E (IgE,  $\epsilon$ ) unterschieden (Spiegelberg 1989; AGARWAL 1964).

Antikörper werden in den meisten Säugern in zwei verschiedene funktionelle Einheiten unterteilt: Das antigenbindende Fragment (Fab-Fragment, *fragment antigen binding*) und das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) (PORTER 1958). Das Fab-Fragment setzt sich aus den umgelagerten V(D)J-Genen von schwerer und leichter Kette zusammen und ist für die Bindung von Antigenen verantwortlich. Bei leichten Ketten wird die variable Region  $V_L$  (*light*) und bei schweren Ketten  $V_H$  (*heavy*) genannt (Inbar et al. 1972). Das Fc-Fragment ist für die Effektorfunktionen und Interaktion mit anderen

Zellen des Immunsystems zuständig (Forthal 2014; Spiegelberg 1989). Bei leichten Ketten existieren bei der Fc-Region  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Ketten, welche aus einer einzigen Domäne bestehen. Schwere Ketten bestehen aus vier (IgM, IgE) oder drei (IgD, IgG, IgA) Domänen (Schroeder und Cavacini 2010). Bei Antikörpern existieren zwischen den Domänen der  $V_H$  sogenannte *Hinge*-Regionen. Diese fungieren als Gelenk und ermöglichen dem Antikörper eine höhere Flexibilität beim Binden von Antigenen (Smyth und Utsumi 1967; Paul et al. 1971). Darüber hinaus weisen die konstanten Regionen von schweren Ketten verschiedene Glykosylierungsmuster auf (Deisenhofer 1981; Arnold et al. 2007). Antikörper liegen zumeist als Monomer vor. Ausnahmen hiervon bilden IgM, das als Pentamer oder Hexamer vorliegt und IgA, das auch als Dimer vorkommt (Eskeland und Christensen 1975; Keyt et al. 2020; Grey et al. 1971; Sousa-Pereira und Woof 2019).

Aufgrund der V(D)J-Umlagerungen der Fab-Fragmente besitzen Antikörper individuelle dreidimensionale Strukturen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften (Spezifitäten) (Honjo et al. 1981; Schatz und Ji 2011). Fab-Fragmente bestehen aus hypervariablen Regionen (HVs) und *Framework*-Regionen (FRs). Pro Fab-Fragment gibt es vier FRs und drei HVs. FRs bilden das dreidimensionale Grundgerüst des Fab-Fragments (Schroeder und Cavacini 2010). HVs zeichnen sich hingegen durch eine hohe Vielfalt aus. Die drei HVs aus leichter und schwerer Kette bilden zusammen die komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementary determining regions*, CDRs), von denen es pro variabler Region drei gibt (Al-Lazikani et al. 1997). Die CDRs sind der Teil des Antikörpers, der die höchste Variabilität aufweist und der Anteil, der direkt durch seine dreidimensionale Struktur das Antigen bindet. Die Bindung von CDRs und Antigenen entsteht durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Kräfte und Kation- $\pi$ -Wechselwirkung (Braden und Poljak 1995). Die Struktur des Antigens, die von Antikörpern erkannt wird, wird als Epitop bezeichnet (Liang 1998). Ein Antigen kann mehrere Epitope haben, sodass Antikörper mit verschiedenen V(D)J-Umlagerungen dasselbe Antigen erkennen können (Kawashima et al. 1998). Die Bindungsstärke eines Antikörpermoleküls ergibt sich aus seiner Affinität zum Epitop und seiner Avidität. Affinität beschreibt die Stärke einer einzelnen chemischen Bindung eines Antikörpers zu seinem Epitop und Avidität wird als Summe aller Affinitäten bei multimeren Antikörpern beschrieben (BOŽIČ et al. 2007).



Antikörper haben verschiedene Effektorfunktionen. Die erste Effektorfunktion ist die Neutralisierung, d.h. die Bindung von Antikörpern an lösliche Giftstoffe oder einzelne Viruspartikel. Auf diese Weise werden Toxine ungefährlich für den Körper und können beispielsweise von Makrophagen aufgenommen werden. Die Aufnahme hierbei erfolgt über Rezeptoren auf Makrophagen, welche spezifisch für die jeweilige Fc-Region sind und daher als Fc-Rezeptoren bezeichnet werden (Guilliams et al. 2014; Dorrington 1976). Verschiedene Zelltypen prägen Fc-Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten für die jeweiligen Isotypen aus (Powell und Hogarth 2008). Ein weiterer Mechanismus von Antikörpern für die Neutralisierung von Pathogenen ist die Opsonisierung. Dabei werden spezifisch pathogene Strukturen, zum Beispiel auf der Oberfläche von Bakterien, gebunden und dadurch für Zellen des angeborenen Immunsystems, wie neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen, markiert. Über Fc-Rezeptoren werden die markierten Pathogene anschließend internalisiert und abgetötet (Aderem und Underhill 1999). Neben der Opsonisierung für Phagozyten können Antikörper bei der Bindung auf bakterielle Pathogene zusätzlich das Komplementsystem aktivieren. Dies führt im Anschluss entweder zur Lyse des Bakteriums oder zu einer Aufnahme in einen Phagozyten über bestimmte Komplementrezeptoren (Frank und Fries 1991).

### 1.3.5 Aktivierung von B-Zellen

Damit klassische ruhende B-Zellen proliferieren und Antikörper sezernieren, müssen sie aktiviert werden. Nur aktivierte klassische B-Zellen können zu antikörpersezernierenden langlebigen Plasmazellen bzw. kurzlebigen Plasmablasten und zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren (Victoria und Nussenzweig 2012). Es gibt mit T-Zell-abhängigen (*T cell dependent*, TD) und zwei T-Zell-unabhängigen (*T cell independent*, TI) Aktivierungen verschiedene Möglichkeiten B-Zellen zur Differenzierung anzuregen (Mond et al. 1995).

TI-I-Antworten bestehen aus der Interaktion mit Mitogenen wie CpG, die über die Bindung von PRRs eine Aktivierung der B-Zelle bewirken (Zubler 2001). Über TLRs aktivierte B-Zellen sind beispielsweise in der Lage IgM zu sezernieren (Jiang et al. 2007). Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, dass TI-I-Immunantworten zu Keimzentrumsreaktionen und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führen.

TI-II-Antworten entstehen durch die massive Quervernetzung von B-Zell-Rezeptoren. Diese Quervernetzung wird durch die Bindung repetitiver Antigene, wie sie beispielsweise auf der Oberfläche von pathogenen Mikroorganismen vorkommen, hervorgerufen (Zinkernagel und Hengartner 2001). Im Gegensatz zu TI-I-Antworten sind B-Zellen, die auf diese Weise aktiviert wurden, im Stande sich sowohl zu Gedächtnis-B- als auch Plasmazellen zu differenzieren (Bortnick und Allman 2013). Anders als bei der konventionellen durch TD-Antigene hervorgerufene Diversifizierung im Keimzentrum, findet die Phase exponentiellen Wachstums bei TI-II-Immunantworten in extrafollikulären Foci statt (García de Vinuesa et al. 1999).

Bei TD-Aktivierungen werden in einem peripheren lymphatischen Organ freie Antigene oder Antigenfragmente, die von follikulären dendritischen Zellen (FDCs) präsentiert werden, in die B-Zell-Follikel transportiert (Heesters et al. 2014). B-Zellen präsentieren das von ihnen erkannte und internalisierte Proteinantigen als Peptid über ihre MHC-II-Moleküle auf der Zelloberfläche und wandern, ausgelöst durch die Hochregulierung von CCR7, zur T-Zell-B-Zell-Grenze innerhalb des Lymphfollikels (Okada et al. 2005). Tfh-Zellen prägen den Rezeptor CXCR5 aus. CXCL13, der Ligand dieses Rezeptors wird von Stromazellen innerhalb sekundärer Lymphfollikel exprimiert, woraufhin Tfh-Zellen in diesen einwandern (Kim et al. 2001). Tfh-Zellen und B-Zellen bewegen sich innerhalb des Lymphfollikels entlang der B-Zell-T-Zell-Zone. Sobald dort ein von der B-Zelle präsentiertes Antigen von einem TCR einer Tfh-Zelle erkannt wurde, gehen beide Zelltypen eine längere Interaktion miteinander ein (Okada et al. 2005). Danach werden weitere Aktivierungsschritte eingeleitet. Hierzu gehört das von Tfh-Zellen exprimierte Molekül CD40L, das den Rezeptor CD40 auf B-Zellen bindet und diese über einer Signalkaskade zur Proliferation anregt (Noelle et al. 1992; Crotty 2011). Weitere Aktivierungs- und Überlebenssignale sind die Ausschüttung von BAFF, IL-4 und IL21 (Biram und Shulman 2020). Sofern aktivierte B-Zellen diese Voraussetzungen erfüllen, treten sie in die Keimzentrumsreaktion ein. Hier erfolgen weitere Schritte, die zu einer erhöhten Spezifität des B-Zell-Rezeptors für sein Antigen führen (Victora und Nussenzweig 2012).

Der Mechanismus der TD-Aktivierung ist davon abhängig, dass das Antigen ein Protein ist, da T-Zell-Rezeptoren ausschließlich Peptide erkennen können. Antigene,

die beispielsweise als Kohlenhydrat vorliegen, werden über TI-Mechanismen aktiviert (Allman et al. 2019; Fagarasan und Honjo 2000).

### 1.3.6 Keimzentrumsreaktion

Erkennen B-Zellen ein spezifisches Antigen, wandern sie zur T-Zell-B-Zell-Grenze eines Lymphfollikels. Treffen sie dort auf aktivierte T-Zellen und erfahren über MHC-II-Interaktion weitere Stimulierung, migrieren aktivierte T-Zellen und B-Zellen in das Zentrum von B-Zell-Follikeln (Allen und Cyster 2008). Hier werden durch weitere Interaktionen mit folliculären dendritischen Zellen Keimzentrumsreaktionen etabliert (Garside et al. 1998; Cabeza-Cabrero et al. 2021). B-Zellen in Keimzentren werden als Keimzentrums-B-Zellen (*germinal center B cells*, GC-B-Zellen) bezeichnet (Victoria und Nussenzweig 2022). Initiator und Hauptregulator des Keimzentrumsprogramm ist der Transkriptionsfaktor BCL6 (Kitano et al. 2011). GC-B-Zellen teilen sich alle fünf bis sechs Stunden und durchlaufen ihren Zyklus um ein vielfaches schneller als naive B-Zellen oder vergleichbare Zellen im menschlichen Körper (Gitlin et al. 2015). Nach einigen Tagen Proliferation wird innerhalb des Follikels zwischen *light zone* (LZ) und *dark zone* (DZ) unterschieden. LZ und DZ besitzen jeweils eigene funktionelle Eigenschaften und sind aus unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt (Rodda et al. 2015; Victoria et al. 2010). Die DZ besteht hauptsächlich aus dicht gepackten GC-B-Zellen und einigen wenigen FDCs (Rodda et al. 2015), während die LZ loser gepackt und zum größten Teil ebenso aus GC-B-Zellen und FDCs sowie zusätzlich aus Tfh-Zellen aufgebaut ist (Victoria et al. 2010). GC-B-Zellen migrieren, abhängig von ihrem Entwicklungsstatus, zwischen diesen beiden Zonen (*cyclic re-entry*) (Kepler und Perelson 1993).

In der DZ prägen GC-B-Zellen, hier Zentroblasten genannt, den charakteristischen Chemokinrezeptor CXCR4 aus. CXCR4 bewirkt, dass Zentroblasten in der DZ festgehalten werden (Victoria et al. 2012). In der DZ werden in den Zentroblasten durch den Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) Punktmutationen in die variablen Regionen des BCRs eingeführt. Der Schlüssel der SHM ist das Enzym *activation-induced cytidine deaminase* (AID) (Muramatsu et al. 2000). Die Aktivierung von AID führt zu Punktmutationen im Sequenzbereich der V-Gene mit einer Häufigkeit von einer pro 1000 Basen, was der  $1 \times 10^6$ -fachen Mutationsrate verglichen zum restlichen

Genom entspricht (Pavri und Nussenzweig 2011). Aufgrund der Zufälligkeit der Mutationen entstehen in den meisten Fällen unproduktive BCRs oder solche mit einer verminderten Affinität zum ursprünglichen Antigen. Nur wenige Mutationen haben eine erhöhte Affinität zur Folge. Unproduktive Mutationen führen zu Apoptose (Rajewsky 1996). Neben den Ig-Loci können auch an anderer Stelle Mutationen im Genom von GC-B-Zellen auftreten, welche zu Lymphomen führen können (Robbiani et al. 2009). SHM ist neben kombinatorischer und junktionaler Diversität sowie der zufälligen Paarung von schwerer und leichter Kette einer der Mechanismen, die zur Einzigartigkeit von BCRs beitragen. Nach erfolgter SHM migrieren Zentroblasten aus der DZ in die LZ und differenzieren zu Zentrozyten, welche den Marker CD83 ausprägen (Victoria et al. 2012).

In der LZ werden die mutierten BCRs der Zentrozyten auf ihre Affinität zum Antigen geprüft (Liu et al. 1989). Erfahren Zentrozyten in der LZ Überlebenssignale in Form von Interaktionen mit folliculären dendritischen Zellen und Tfh-Zellen, migrieren sie wieder zurück in die DZ und mutieren weiter (Kepler und Perelson 1993). Die genauen Selektionsmechanismen dabei sind noch nicht genau geklärt. Es werden mehrere Erklärungsansätze diskutiert. Bei der *death-limited selection* wird davon ausgegangen, dass Zentrozyten um Überlebenssignale in der LZ konkurrieren. Hohe Affinitäten des BCRs zu seinem Antigen in der LZ führen in diesem Model zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Überlebenssignale zu empfangen. Dies hat einem Wiedereintritt in die DZ mit sich daran anschließender Proliferation, weiteren Mutationen und der Generierung neuer BCRs zur Folge (Amitai et al. 2017). Beim Ausbleiben von Überlebenssignalen begehen die Zellen Apoptose, was circa 70 bis 90% aller Zentrozyten betrifft (Meyer-Hermann et al. 2012). Die *birth-limited selection* besagt, dass nicht zwangsläufig die Affinität eines B-Zell-Klons zum entsprechenden Antigen in der LZ, sondern seine relative Häufigkeit das entscheidende Kriterium für eine positive Selektion ist (Amitai et al. 2017).

Neben der somatischen Hypermutation gibt es mit dem Klassenwechsel einen weiteren Mechanismus, der innerhalb von Keimzentren stattfindet. Dabei verändert eine B-Zelle den Fc-Teil ihres BCRs, wodurch ein anderer Isotyp ausgeprägt wird. Dieser Mechanismus verändert nicht Affinität des BCRs einer GC-B-Zelle zu ihrem

Antigen, sondern hat Einfluss auf die Effektorkapazitäten von B-Zellen (Chi et al. 2020).

Nach einigen Zyklen von Migration zwischen LZ und DZ, bei der GC-B-Zellen mit hochaffinen BCRs entstehen (Affinitätsreifung), entscheidet sich deren finale Differenzierung. GC-B-Zellen entwickeln sich entweder zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen bzw. Plasmazellen oder begeben Apoptose.

### **1.3.7 Antikörpersezernierende Zellen**

Antikörpersezernierende Zellen (*antibody secreting cells*, ASCs) sind die Effektoreinheit der humoralen adaptiven Immunität. Man unterscheidet Plasmablasten und Plasmazellen. Diese unterscheiden sich in Bezug auf Affinität, Lebensdauer, Teilungsverhalten und Aktivierung (Nutt et al. 2015). Der genaue Mechanismus der Differenzierung von B-Zellen zu ASCs ist im Menschen nicht abschließend geklärt und es werde mehrere Erklärungsansätze diskutiert. Beispielsweise werden konkurrierende interne Prozesse innerhalb der Zellen oder externe Stimuli innerhalb des Keimzentrums als mögliche Faktoren für eine Differenzierung diskutiert (Duffy et al. 2012; Nutt et al. 2015). Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass B-Zellen sich innerhalb des Keimzentrums asymmetrisch teilen und wichtige regulatorische Moleküle, wie beispielsweise BCL-6, ungleich auf die Tochterzellen verteilt werden (Barnett et al. 2012).

Plasmablasten besitzen eine Lebensdauer von ca. drei bis fünf Tagen (Khodadadi et al. 2019) und sind proliferationsfähig. Sie schütten niedrigaffine Antikörper aus und entstehen vornehmlich zu Beginn von Infektionen, wenn B-Zellen bereits aktiviert und ihren BCR internalisiert haben, aber noch keine Keimzentrumsreaktion initiiert wurde (extrafollikuläre Antwort) (MacLennan et al. 2003). Charakteristisch für Plasmablasten ist die beginnende Expression von BLIMP-1 (Angelin-Duclos et al. 2000). Eine Ausnahme hiervon bilden B1-Zellen sowie sMZ-B-Zellen. Beispielsweise können diese B-Zell-Linien in der Maus unabhängig von ihrem BCR Antikörper sezernieren und sind daher nicht auf T-Zell-Hilfe angewiesen (Fairfax et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass humane B-Zellen aus Nabelschnurblut wahrscheinlich in der Lage sind, spontan, d.h. ohne vorherige Stimulierung, IgM-Antikörper zu sezernieren (Budeus et al. 2021).

Langlebige Plasmazellen entstehen aus Keimzentrumsreaktionen und stellen den terminalen Differenzierungsschritt von B-Zellen dar. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass Plasmazellen später als Gedächtnis-B-Zellen und affinitätsgetrieben aus dem Keimzentrum austreten. Dafür sprechen u.a. deren hochaffine sezernierte Antikörper, welche mehr *re-entries* zwischen DZ und LZ und somit eine größere Zahl an Runden an SHM benötigen (Weisel et al. 2016; Kräutler et al. 2017). Plasmazellen sind langlebig, teilungsunfähig und die Quelle für Serumantikörper (Nutt et al. 2015). Der Austritt einer GC-B-Zelle aus dem Keimzentrum und die Differenzierung hin zu einer Plasmazelle werden über Transkriptionsfaktoren wie BLIMP-1 (stärker ausgeprägt als in Plasmablasten (Soro et al. 1999)), XBP1 sowie IRF4 gesteuert, welche eine Inhibierung von BCL-6 bewirken (Shapiro-Shelef und Calame 2005). Dabei ist es unklar, ob Plasmablasten grundsätzlich die Vorläufer von Plasmazellen sind. Studien in Mäusen weisen jedoch darauf hin, dass sich zumindest ein Anteil des Plasmablastenpools zu Plasmazellen entwickeln kann (Kabashima et al. 2006). Nach Austritt aus dem Keimzentrum befindet sich ein kleiner Teil der Plasmazellen in lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen. Der Großteil befindet sich im Knochenmark (Benner et al. 1981; Smith et al. 1997). Die Rekrutierung ins Knochenmark erfolgt über die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 (Nakayama et al. 2003; Tangye 2011). Werden Plasmazellen diese Signale entzogen, sterben sie ab (van Chu und Berek 2013). Im Knochenmark konkurrieren Plasmazellen daher um sogenannte Nischen, wo Überlebenssignale (CXCL12, IL-6, APRIL, etc.) empfangen werden. Diese Überlebenssignale werden in der Maus zu einem Großteil von eosinophilen sezerniert (van Chu et al. 2011). In Ihren Nischen können Plasmazellen mehrere Jahrzehnte überleben und Immunglobuline sezernieren (Slifka et al. 1998; Manz et al. 1997; Manz et al. 1998; Hammarlund et al. 2017). Plasmazellen stellen somit den humoralen Teil des immunologischen Gedächtnisses dar (Seifert und Küppers 2016).

### **1.3.8 Gedächtnis-B-Zellen**

Eine der grundlegenden Eigenschaften des adaptiven Immunsystems ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Hierdurch ist es dem Körper möglich, auf zukünftige, bereits bekannte Erreger schneller und effizienter zu reagieren

und auf diese Weise eine erneute Infektion zu verhindern oder abzuschwächen (Defrance et al. 2011; Seifert und Küppers 2016).

Typischerweise entstehen Gedächtnis-B-Zellen durch Keimzentrumsreaktionen. Damit GC-B-Zellen das Keimzentrum verlassen und differenzieren, muss die Expression von BCL-6, dem Regulator der Keimzentrumsreaktion inhibiert werden. Dies geschieht u.a. durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, dessen Ausprägung durch CD40- und BCR-gekoppelte Signalwege angeregt wird (Basso et al. 2004). Zusätzlich begünstigt die Ausschüttung von IL-24 die Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen (Maarof et al. 2010). Viele, aber nicht zwangsläufig alle Gedächtnis-B-Zellen sind durch ihren Aufenthalt im Keimzentrum affinitätsgereift und klassengewechselt (Rajewsky 1996; Klein et al. 1997; Klein et al. 1998). Die Lebensspanne von Gedächtnis-B-Zell-Klonen reicht, ähnlich wie bei Plasmazellen, von mehreren Jahren bis hin zu Jahrzehnten (Crotty et al. 2003; Yu et al. 2008). Im Vergleich zu affinitätsgereiften Plasmazellen verweilen Gedächtnis-B-Zellen wahrscheinlich kürzer im Keimzentrum. Hierfür sprechen deren weit gefächerte Affinitäten, was in Mausexperimenten gezeigt werden konnte (Viant et al. 2020; Wong et al. 2020).

Nach ihrem Austritt aus dem Keimzentrum migrieren Gedächtnis-B-Zellen durch den Körper und siedeln sich u.a. an Orten mit hoher Wahrscheinlichkeit für einen Pathogeneintritt an (Inoue et al. 2018). Hierzu gehören beispielsweise die Tonsillen oder die Lunge (Liu et al. 1995; Onodera et al. 2012). Darüber hinaus besiedeln Gedächtnis-B-Zellen periphere lymphatische Organe, Knochenmark sowie splenische Marginalzonen (Fazilleau et al. 2007; Mamani-Matsuda et al. 2008).

Bei einer erneuten Infektion mit einem bekannten Erreger (Reaktivierung), sind Gedächtnis-B-Zellen schneller in der Lage zu reagieren als naive B-Zellen (Bernasconi et al. 2002; Good et al. 2009). Der Grund hierfür liegt u.a. an der reduzierten Ausprägung von Transkriptionsfaktoren wie KLF4 und KLF9 sowie der erhöhten Expression von stimulierenden Proteinen wie IL21-R und einigen TLRs (Good und Tangye 2007; Avery et al. 2010; Bernasconi et al. 2003). Die Reaktivierung von Gedächtnis-B-Zellen führt zu deren Proliferation mit sich daran anschließender Plasmazelldifferenzierung zwecks Erhöhung des Titers protektiver Antikörper oder

einer weiteren affinitätssteigernden Keimzentrumsreaktion (McHeyzer-Williams et al. 2015; Seifert et al. 2015).

Obwohl die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in den meisten Fällen eng mit Keimzentrumsreaktionen sowie T-Zell-abhängigen Aktivierungen assoziiert ist, sind diese Parameter nicht zwangsläufig nötig für die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen. So existieren Mechanismen der Gedächtnisbildung, die unabhängig von einer T-Zell-Stimulation oder dem Etablieren von Keimzentrumsreaktionen sind (Defrance et al. 2011; Viant et al. 2021). Einige Studien weisen die Existenz eines Gedächtnisses bei sMZ-B-Zellen nach Polysaccharid-Impfungen nach (Weller et al. 2004). Ebenso zeigten weitere Studien, dass ein bestimmter Subtyp von B1-Zellen in Mäusen in der Lage ist, lang anhaltende T-Zell-unabhängige Immunität zu etablieren (Alugupalli et al. 2004). In Mäusen konnte auch gezeigt werden, dass T-Zell-unabhängige Gedächtnis-B-Zellen einen anderen Phänotyp als ihr T-Zell-abhängiger Gegenpart besitzen. Die Lebensspanne dieser Gedächtnis-B-Zellen entspricht den von naiven B-Zellen (Obukhanych und Nussenzweig 2006). Ein Unterschied zwischen beiden Mechanismen der Gedächtnisbildung ist, dass nach zweiter Immunisierung TI-II-aktivierte Gedächtnis-B-Zellen im Gegensatz zu ihrem TD-aktiviertem Gegenstück refraktär werden (Granoff et al. 1998).

Darüber hinaus gibt es Mausstudien, die besagen, dass sich in frühen Phasen von Immunantworten ebenso Gedächtnis-B-Zellen bilden, die sich bereits vor der Etablierung von Keimzentrumsreaktionen entwickeln (Weisel et al. 2016). Diese Form der Gedächtnisbildung wird als Keimzentrums-unabhängig (*germinal center independent*, GC-unabhängig) bezeichnet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese GC-unabhängigen Gedächtnis-B-Zellen sich von GC-abhängigen in Bezug auf weniger Klassenwechsel und ausbleibende SHM unterscheiden (Viant et al. 2021).

### **1.3.9 Unterschiede zwischen frühkindlichen und adulten Immunsystemen**

Die früheste Kindheit ist neben dem hohen Alter die verwundbarste Zeit im Leben. Von den 2.400.000 im Jahr 2021 weltweit gestorbenen Kindern waren fast die Hälfte (47%) unter 28 Tage alt (World Health Organization 2022). Dies betrifft vor allem ressourcenschwache Regionen wie dem sub-Sahararaum und Zentral- bzw.



Südostasien, welche zusammen fast 80% der weltweiten kindlichen Mortalität ausmachen. Eine der Hauptgründe für die frühkindliche Mortalität sind Infektionen, welche vor allem zu Sepsen, Pneumonien oder Durchfallerkrankungen führen (World Health Organization 2022; Black et al. 2010).

Die Immunantworten von Neugeborenen und Erwachsenen unterscheiden sich. So existieren im Neugeborenen z.B. weniger konventionelle dendritische Zellen und verringerte Th1-Zellantworten. Zudem präsentieren Makrophagen Antigene weniger effektiv als ihr adulter Gegenpart (Langrish et al. 2002; Nguyen et al. 2010). Granulozyten besitzen schlechtere Adhäsionseigenschaften, z.B. durch die niedrigere Ausprägung von L-Selektin (CD62L) und zeigen Defizite bei der Erkennung opsonisierter Bakterien durch eine reduzierte Expression des Komplementrezeptors 3 (Nussbaum et al. 2013; Abughali et al. 1994). Bei kindlichen natürlichen Killerzellen zeigt sich eine verminderte Zytotoxizität, hervorgerufen durch verminderte Level an Perforin und Granzym (Guilmot et al. 2011). Ferner ist die Anzahl an ILCs in Neugeborenen erhöht und ihre Aktivität gesteigert (Yu et al. 2018). Darüber hinaus existieren Unterschiede bezüglich des Mikrobioms sowie des Metaboloms (Tsafaras et al. 2020). Das Mikrobiom ist nach der Geburt noch nicht so divers wie im späteren Leben und Neugeborene zeigen höhere Level an Glycin, was direkt Auswirkung auf die Glutathion-Synthese und somit auf den Schutz gegenüber oxidativem Stress hat (Dzidic et al. 2018; Noto et al. 2016). Neonatale T-Zell-Signalwege sind ebenso verändert. Durch eine niedrigere Expression der Tyrosinkinase Lck ergibt sich eine verringerte Expression von T-Zell-Rezeptor-assoziierten Proteinen und die CD4-vermittelte T-Zell-Immunität ist in Neugeborenen weniger effizient (Miscia et al. 1999; Palin et al. 2013).

Neugeborene weisen eine Anreicherung von CD5<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut auf, die mit zunehmendem Alter abnimmt. B-Zellen von Neugeborenen und Erwachsenen unterscheiden sich bezüglich ihrer Entwicklung, ihrem BCR-Repertoire und der Dynamik ihrer Immunantwort (Budeus et al. 2021; Okada et al. 2005; Shapiro-Shelef und Calame 2005; Klein et al. 1998; Palin et al. 2013). Zusätzlich zeigt sich bei Neugeborenen ein verstärkter Klassenwechsel zum IgA-Isotyp (Budeus et al. 2021). Das BCR-Repertoire bei Neugeborenen besteht bis zu 8% aus Klonotypen

(interindividuell homologe BCR-Sequenzen) und ist höher als bei Adulten (Budeus et al. 2021).

## 1.4 Zielsetzung

Das Immunsystem von Neugeborenen gilt als unausgereift. So leiden Neugeborene vermehrt unter Infektionen, die im schlimmsten Fall zur Sepsis führen können. Darüber hinaus entfalten Impfungen in Neugeborenen nicht die gleichen Wirkungen wie bei Erwachsenen. Global gesehen gehören Infektionen bei Kleinkindern und Neugeborenen zu den häufigsten Todesursachen. Daher ist ein grundlegendes Verständnis des Immunsystems bei Neugeborenen und Kleinkindern und dessen Entwicklung mit zunehmendem Alter bis zum Erwachsenen von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit sollte sich im speziellen auf das B-Zell-Immunsystem bei Neugeborenen und dessen Reifung bis hin zu Erwachsenen konzentriert werden. Das Ziel hierbei war es, funktionelle sowie genetische Unterschiede zu ermitteln und diese ggf. experimentell zu validieren. Da *Bulk*-Genexpressionsprofile von Gesamtpopulationen zwar einen hohen Informationsgehalt aufweisen, eine mögliche zelluläre Heterogenität bzw. putative neue Subpopulationen jedoch verschleiern können, sollten Einzelzellanalysen erfolgen. Diese Einzelzellanalysen umfassten mehrere Ebenen. So sollten neben der Genexpression auch die Ausprägung von B-Zell-Rezeptoren, die Oberflächenexpression von Proteinen und epigenetische Muster (Chromatinzugänglichkeit) von peripheren B-Zellen untersucht werden. Die gewonnen Erkenntnisse sollten experimentell validiert werden. Um verlässliche Aussagen über die Transition von einem neonatalen bzw. frühkindlichem Immunsystem zu einem „adulten“ treffen zu können, sollten mehrere Altersstufen von Neugeborenen über Kleinkinder, Kinder, jungen Erwachsene bis zu Erwachsenen in die Analyse mit einbezogen werden.

Darüber hinaus sollte ein Arbeitsablauf zur Synthese humaner rekombinanter Antikörper für die Bestimmung der Spezifitäten bestimmter B-Zell-Rezeptoren, bspw. von Klonotypen, etabliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
3130 Genetic Analyzer	Hitachi (Tokio, Japan)
Biometra UNO-II (PCR-Thermocycler)	Biometra GmbH, Göttingen
C1000 Touch Thermal Cycler	BIO-RAD (Hercules, USA)
Chromium Controller & Next GEM Accessory Kit	10X Genomics, Leiden, Niederlande
Color Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
CytoFLEX S	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK)
FACSAria Fusion	Becton Dickinson (Abk. BD) Biosciences, Heidelberg
Fusion Solo	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller)
Gefrierschrank -80°C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller)
Gel Doc XR+ Molecular Imager	BIO-RAD (Hercules, USA)
Himac CT 15 E	Hitachi (Tokio, Japan)
Inkubator BE 400	Memmert (Büchenbach)
Inkubator C200	Labotect, Rosdorf
Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific (New Jersey, USA)
Kühlschrank	Liebherr AG, Bulle
Laminar Flow Werkbank UVF 6.12	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
MDF-DU700VH-PE Ultra-low Temperature Freezer	Panasonic, Hamburg

Micro Star 17R	VWR, Langenfeld
Mikro 20	Hettich (Kirchlengern)
Mikrowellen Herd GT 8804	General Technic (Howald, Luxemburg)
Mini-Protean® 3 Zelle	BIO-RAD (Hercules, USA)
Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
MXX-5001	Denver Instrument (Göttingen)
Nanodrop ND-1000	Peqlab GmbH, Erlangen
Owl Easy-Cast Electrophoresis System, Model 82	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ProBlot™ Rocker 25 Shaker	Labnet (New Jersey, USA)
Rollenschüttler	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Scanlaf Mars Sterilbank	LaboGene, Lillerød, Dänemark
SpeedVac	Thermo Fisher
T professional Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot® Turbo™	BIO-RAD (Hercules, USA)
Uno II	Biometra (Göttingen)
Vortexmischer	Scientific Industries Inc., Bohemia
Waage AE240 DR	Mettler Toledo GmbH, Gießen

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Gradienten-Polyacrylamid-Gele 4-15% Mini-Protean® TGX	BIO-RAD (Hercules, USA)
Pierce™ Disposable Columns, 10 mL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg); Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg); Sarstedt (Nümbrecht); Axon (Kaiserslautern); Greiner (Kremsmünster, Österreich); Starlab (Hamburg)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Röhre (13 ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Röhre (15 ml; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	BIO-RAD (Hercules, USA)
Vivaspin 6, 50.000 MWCO PES	Sartorius (Göttingen)
Zellkulturflasche (250 ml, 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

### 2.1.3 Nährmedien, Enzyme, Lösungen und Chemikalien

Tabelle 3: Liste der in der Arbeit verwendeten Nährmedien, Enzyme, Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
10X Taq Puffer	Thermo Fischer Scientific
1kb GeneRuler Plus	Thermo Fisher Scientific
2× Rapid Ligation Buffer	Promega (Madison, USA)
Agarose Wide Range	Serva (Heidelberg)
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
anti-HA-tag-Antikörper	R&D Systems Inc.
Blasticidin	Invivogen
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAN Biotech GmbH
Cell Proliferation Dye eFluor™ 670	eBioscience (San Diego, USA)
Digitonin	Thermo Fisher Scientific
DNA Ligation Kit, Mighty Mix	Takara
DNA Ligation Kit, Mighty Mix	Takara Bio (Kusatsu, Japan)
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DPBS 10x	PAN Biotech (Aidenbach)
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
DTT	Sigma-Aldrich
ECL™ Luminol Enhancer Solution	Cytiva (Massachusetts, USA)
ECL™ Peroxide Solution	Cytiva (Massachusetts, USA)
<i>Expand high fidelity</i> Polymerase	Roche (Basel)
Fast Digest BshTI	Thermo Fisher Scientific
Fast Digest NheI	Thermo Fisher Scientific
Fast Digest Pfl23II	Thermo Fisher Scientific
Fast Digest XhoI	Thermo Fisher Scientific
Fast Digest XmaJ	Thermo Fisher Scientific

FastLoad 50 bp DNA Ladder	Serva
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
FreeStyle™ 293 Expression Medium	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, New York, USA)
GelRed® Nucleic Acid Stain	Biotium (Fremont, USA)
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich
LB-Medium	Carl Roth (Karlsruhe)
MACS BSA-Lösung	Miltenyi Biotec
MagicMark XP	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fischer Scientific
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma Aldrich
Nuclei-Puffer (20×)	10X Genomics
Nuklease-freies Wasser	Ambion
Orange DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PageRuler™ Prestained Protein ladder	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Protein A/G Agarose	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rekombinanter humaner CD40-Ligand-HA-tag	R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)
RPMI-1640 Medium	PAN Biotech GmbH
SOC-Medium	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4 DNA Ligase	Promega
TGS-Puffer (10x)	BIO-RAD (Hercules, USA)
Tris-HCL	Sigma-Aldrich
Tween-20	Bio-RAD
UltraPure™ Dithiothreitol	Invitrogen (Waltham, USA)
Zeocin	InvivoGen

## 2.1.4 Puffer

Tabelle 4: Liste der in der Arbeit verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Affinitätsaufreinigung: Bindungspuffer	PBS
Affinitätsaufreinigung: Elutionspuffer	0,1 M Glycin (pH: 2,8)
Affinitätsaufreinigung: Neutralisationspuffer	1 M TRIS (pH: 9)
PBS/T	500 ml PBS (1x), 2,5 ml Tween 20 (20% Stock-Lösung)
PBS/T 1%BSA	500 ml PBS (1x), 2,5 ml Tween 20 (20% Stock-Lösung), 5 g BSA
PBS/T 10% BSA	500 ml PBS (1x), 2,5 ml Tween 20 (20% Stock-Lösung), 50 g BSA
Puffer Isolierung Nuklei: Lyse	Tris-HCL (10 mM), NaCL (10 mM), MgCl <sub>2</sub> (3 mM), BSA (1%), Tween-20 (0,1%), IGEPAL CA-630 (0,1%), Digitonin (0,01%), DTT (1mM), RNase-Inhibitor (1 U/μl), nukleasefreies Wasser
Puffer Isolierung Nuklei: Verdünnung	Nuklei-Buffer (1×), DTT (1 mM), RNase-Inhibitor (1 U/μl), nukleasefreies Wasser
Puffer Isolierung Nuklei: Waschen	Tris-HCL (10 mM), NaCl (10 mM), MgCl <sub>2</sub> (3 mM), BSA (1%), Tween-20 (0,1%), DTT (1 mM), RNase-Inhibitor (1 U/μl), nukleasefreies Wasser
TAE-Puffer (50×)	242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml Eisessig, 1 l H <sub>2</sub> O



## 2.1.5 Kits

Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
5' Feature Barcode Kit	10x Genomics (Pleasanton, USA)
Biolegend TotalSeq™-C	Biolegend
Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v1.1 + v2	10x Genomics
Chromium Single Cell Human BCR Amplification Kit	10x Genomics
Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Kit	10X Genomics
FreeStyle™ MAX 293 Expression System	Thermo Fisher Scientific
mi-Plasmid Miniprep Kit	Metabion (Planegg)
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

## 2.1.6 Primer

Tabelle 6: Liste der in der Arbeit verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz
FW-Primer DNA-Amplifizierung	5´-CCCCGTCACCTTTGGCTTATC-3´
RV-Primer DNA-Amplifizierung	5´-CGGTCTTAGCGTCCAGATGTC-3´
M13-Primer (Sequenzierung)	5´-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3´
pFUSE-Primer (Sequenzierung)	5´-TGCTTGCTCAACTCTACGTC-3´

## 2.1.7 Antikörper Durchflusszytometrie und FACS

Tabelle 7: Liste der in der Arbeit verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie und FACS

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Hersteller
anti-CD1c	F10/21A3	PE	Biolegend
anti-CD20	2H7	BV421, APC-A750	BD Biosciences, Biolegend
anti-CD23	M-L233	PE	BD Biosciences
anti-CD24	ML5	PE	BD Biosciences
anti-CD27	M-T271	PE-Cy7	Biolegend
anti-CD32	FLI8.26	PE	BD Biosciences
anti-CD35	E11	PE	BD Biosciences, Biolegend
anti-CD38	HIT2	AP- A700, FITC, APC	BD Biosciences, Biolegend
anti-CD45	2D1	PE	Biolegend
anti-CD5	L17F12	BV510, BV421, FITC	BD Biosciences, Biolegend
anti-CD73	AD2	PE, ECD, FITC	BD Biosciences, Biolegend
anti-CD79b	CB3-1	FITC	Dako
anti-CD82	ASL-24	PE, PE-Cy7	Biolegend
anti-IgD	IA6-2	APC	Biolegend
anti-IgK	TB28-2	PE-Cy7	Biolegend
anti-IgM	MHM-88	PE, BV650	BD Biosciences

## 2.1.8 Total-seq-Antikörper

Tabelle 8: Liste der in der Arbeit verwendeten Antikörper für *scCITE-seq*

Bezeichnung	Klon	Barcode
anti-human CD101 (BB27)	BB27	CTACTTCCCTGTCAA
anti-human CD103 (Integrin $\alpha$ E)	Ber-ACT8	GACCTCATTGTGAAT
anti-human CD105	43A3	ATCGTCGAGAGCTAG
anti-human CD107a (LAMP-1)	H4A3	CAGCCCCTGCAATA
anti-human CD112 (Nectin-2)	TX31	AACCTTCCGTCTAAG
anti-human CD119 (IFN- $\gamma$ R $\alpha$ chain)	GIR-208	TGTGTATTCCCTTGT
anti-human CD11a	TS2/4	TATATCCTTGTGAGC
anti-human CD11b	ICRF44	GACAAGTGATCTGCA
anti-human CD11c	S-HCL-3	TACGCCTATAACTTG
anti-human CD122 (IL-2R $\beta$ )	TU27	TCATTTCCCTCCGATT
anti-human CD123	6H6	CTTCACTCTGTCAGG
anti-human CD124 (IL-4R $\alpha$ )	G077F6	CCGTCCTGATAGATG
anti-human CD127 (IL-7R $\alpha$ )	A019D5	GTGTGTTGTCTATG
anti-human CD13	WM15	TTTCAACGCCCTTTC
anti-human CD134 (OX40)	Ber-ACT35 (ACT35)	AACCCACCGTTGTTA
anti-human CD137 (4-1BB)	4B4-1	CAGTAAGTTCGGGAC
anti-human CD14	M5E2	TCTCAGACCTCCGTA
anti-human CD141 (Thrombomodulin)	M80	GGATAACCGCGCTTT
anti-human CD146	P1H12	CCTTGGATAACATCA
anti-human CD152 (CTLA-4)	BNI3	ATGGTTCACGTAATC
anti-human CD154	24-31	GCTAGATAGATGCAA
anti-human CD155 (PVR)	SKII.4	ATCACATCGTTGCCA
anti-human CD158 (KIR2DL1/S1/S3/S5)	HP-MA4	TATCAACCAACGCTT
anti-human CD158b (KIR2DL2/L3, NKAT2)	DX27	GACCCGTAGTTTGAT
anti-human CD158e1 (KIR3DL1, NKB1)	DX9	GGACGTTTTCTTGA
anti-human CD16	3G8	AAGTTCACTCTTTGC
anti-human CD161	HP-3G10	GTACGCAGTCCTTCT
anti-human CD163	GHI/61	GCTTCTCCTTCTTA
anti-human CD169 (Sialoadhesin, Siglec-1)	7-239	TACTCAGCGTGTGTTG
anti-human CD18	TS1/18	TATTGGGACACTTCT
anti-human CD183 (CXCR3)	G025H7	GCGATGGTAGATTAT
anti-human CD185 (CXCR5)	J252D4	AATTCAACCGTCGCC
anti-human CD19	HIB19	CTGGGCAATTACTCG

## Material und Methoden

anti-human CD194 (CCR4)	L291H4	AGCTTACCTGCACGA
anti-human CD195 (CCR5)	J418F1	CCAAAGTAAGAGCCA
anti-human CD196 (CCR6)	G034E3	GATCCCTTTGTCACT
anti-human CD1c	L161	GAGCTACTTCACTCG
anti-human CD1d	51,1	TCGAGTCGCTTATCA
anti-human CD2	TS1/8	TACGATTTGTCAAGG
anti-human CD20	2H7	TTCTGGGTCCCTAGA
anti-human CD21	Bu32	AACCTAGTAGTTCGG
anti-human CD22	S-HCL-1	GGGTGTGTCTTTG
anti-human CD223 (LAG-3)	11C3C65	CATTTGTCTGCCGGT
anti-human CD224	KF29	CTGATGAGATGTCAG
anti-human CD226 (DNAM-1)	11A8	TCTCAGTGTTTGTGG
anti-human CD23	EBVCS-5	TCTGTATAACCGTCT
anti-human CD24	ML5	AGATTCCTTCGTGTT
anti-human CD244 (2B4)	C1.7	TCGCTTGATGGTAG
anti-human CD25	BC96	TTTGTCTGTACGCC
anti-human CD26	BA5b	GGTGGCTAGATAATG
anti-human CD267 (TACI)	1A1	AGTGATGGAGCGAAC
anti-human CD268 (BAFF-R)	11C1	CGAAGTCGATCCGTA
anti-human CD27	O323	GCACTCCTGCATGTA
anti-human CD270 (HVEM, TR2)	122	TGATAGAAACAGACC
anti-human CD272 (BTLA)	MIH26	GTTATTGGACTAAGG
anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1)	29E.2A3	GTTGTCCGACAATAC
anti-human CD279 (PD-1)	EH12.2H7	ACAGCGCCGTATTTA
anti-human CD28	CD28.2	TGAGAACGACCCTAA
anti-human CD29	TS2/16	GTATTCCTCAGTCA
anti-human CD3	UCHT1	CTCATTTGTAACCTCT
anti-human CD303 (BDCA-2)	201A	GAGATGTCCGAATTT
anti-human CD31	WM59	ACCTTTATGCCACGG
anti-human CD314 (NKG2D)	1D11	CGTGTTTGTTCCTCA
anti-human CD319 (CRACC)	162,1	AGTATGCCATGTCTT
anti-human CD32	FUN-2	GCTTCCGAATTACCG
anti-human CD328 (Siglec-7)	6-434	CTTAGCATTTCACTG
anti-human CD33	P67.6	TAACCTCAGGGCCTAT
anti-human CD335 (NKp46)	9E2	ACAATTTGAACAGCG
anti-human CD35	E11	ACTTCCGTGCATCTT
anti-human CD352 (NTB-A)	NT-7	AGTTTCCACTCAGGC

## Material und Methoden

anti-human CD36	5-271	TTCTTTGCCTTGCCA
anti-human CD38	HIT2	TGTACCCGCTTGTGA
anti-human CD39	A1	TTACCTGGTATCCGT
anti-human CD4	RPA-T4	TGTTCCCGCTCAACT
anti-human CD40	5C3	CTCAGATGGAGTATG
anti-human CD41	HIP8	ACGTTGTGGCCTTGT
anti-human CD42b	HIP1	TCCTAGTACCGAAGT
anti-human CD45	HI30	TGCAATTACCCGGAT
anti-human CD45RA	HI100	TCAATCCTTCCGCTT
anti-human CD45RO	UCHL1	CTCCGAATCATGTTG
anti-human CD47	CC2C6	GCATTCTGTACCTA
anti-human CD48	BJ40	CTACGACGTAGAAGA
anti-human CD49a	TS2/7	ACTGATGGACTCAGA
anti-human CD49b	P1E6-C5	GCTTTCCTCAGTATG
anti-human CD49d	9F10	CCATTCAACTTCCGG
anti-human CD5	UCHT2	CATTAACGGGATGCC
anti-human CD52	HI186	CTTTGTACGAGCAAA
anti-human CD54	HA58	CTGATAGACTTGAGT
anti-human CD56	5.1H11	TCCTTTCCTGATAGG
anti-human CD57 Recombinant	QA17A04	AACTCCCTATGGAGG
anti-human CD58 (LFA-3)	TS2/9	GTTCCCTATGGACGAC
anti-human CD62L	DREG-56	GTCCCTGCAACTTGA
anti-human CD62P (P-Selectin)	AK4	CCTTCCGTATCCCTT
anti-human CD64	10,1	AAGTATGCCCTACGA
anti-human CD69	FN50	GTCTCTTGGCTTAAA
anti-human CD7	CD7-6B7	TGGATTCCCGGACTT
anti-human CD71	CY1G4	CCGTGTTCCCTCATTA
anti-human CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	AD2	CAGTTCCTCAGTTCG
anti-human CD79b (Igβ)	CB3-1	ATTCTTCAACCGAAG
anti-human CD8	SK1	GCGCAACTTGATGAT
anti-human CD81 (TAPA-1)	5A6	GTATCCTTCCTTGGC
anti-human CD82	ASL-24	TCCCACTTCCGCTTT
anti-human CD83	HB15e	CCACTCATTTCCGGT
anti-human CD85j (ILT2)	GHI/75	CCTTGTGAGGCTATG
anti-human CD86	IT2.2	GTCTTTGTGAGTGCA
anti-human CD88 (C5aR)	S5/1	GCCGCATGAGAAACA
anti-human CD94	DX22	CTTTCGGTCTTACA

## Material und Methoden

anti-human CD95 (Fas)	DX2	CCAGCTCATTAGAGC
anti-human CD99	3B2/TA8	ACCCGTCCTAAGAA
anti-human CLEC12A	50C1	CATTAGAGTCTGCCA
anti-human CX3CR1	K0124E1	AGTATCGTCTCTGGG
anti-human FcεRIα	AER-37 (CRA-1)	CTCGTTTCCGTATCG
anti-human GPR56	CG4	GCCTAGTTTCCGTTT
anti-human HLA-A,B,C	W6/32	TATGCGAGGCTTATC
anti-human HLA-DR	L243	AATAGCGAGCAAGTA
anti-human HLA-E	3D12	GAGTCGAGAAATCAT
anti-human Ig light chain κ	MHK-49	AGCTCAGCCAGTATG
anti-human Ig light chain λ	MHL-38	CAGCCAGTAAGTCAC
anti-human IgD	IA6-2	CAGTCTCCGTAGAGT
anti-human IgM	MHM-88	TAGCGAGCCCGTATA
anti-human KLRG1 (MAFA)	SA231A2	CTTATTTCTGCCCT
anti-human LOX-1	15C4	ACCCTTTACCGAATA
anti-human TCR Vα7.2	3C10	TACGAGCAGTATTCA
anti-human TCR Vδ2	B6	TCAGTCAGATGGTAT
anti-human TCR α/β	IP26	CGTAACGTAGAGCGA
anti-human TIGIT (VSTM3)	A15153G	TTGCTTACCGCCAGA
anti-human/mouse CD49f	GoH3	TTCCGAGGATGATCT
anti-human/mouse integrin β7	FIB504	TCCTTGGATGTACCG
anti-human/mouse/rat CD278 (ICOS)	C398.4A	CGCGCACCCATTAAA
anti-mouse/human CD44	IM7	TGGCTTCAGGTCCTA
Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl	HTK888	CCTGTCATTAAGACT
Mouse IgG1, κ isotype Ctrl	MOPC-21	GCCGGACGACATTAA
Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl	MOPC-173	CTCCTACCTAAACTG
Mouse IgG2b, κ isotype Ctrl	MPC-11	ATATGTATCACGCGA
Rat IgG1, κ isotype Ctrl	RTK2071	ATCAGATGCCCTCAT
Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl	RTK2758	AAGTCAGGTTCCGTTT
Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	RTK4530	GATTCTTGACGACCT

## 2.1.9 Zelllinien

Tabelle 9: Liste der in der Arbeit verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
FreeStyle™ 293-F Cells	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> (JM109)	Promega

## 2.1.10 Software und Erweiterungen

Tabelle 10: Liste der in der Arbeit verwendeten Software bzw. deren Erweiterung

Bezeichnung	Entwickler
R	R Core Team, John M. Chambers
R Studio	RStudio, PBC, Boston, USA
R-Erweiterung: <i>Seurat</i>	(Stuart et al. 2019)
R-Erweiterung: <i>Slingshot</i>	(Street et al. 2018)
R-Erweiterung: <i>ggplot2</i>	(Hadley 2016)
R-Erweiterung: <i>escape</i>	(Borcherding et al. 2021)
R-Erweiterung: <i>SingleR</i>	(Aran et al. 2019)
R-Erweiterung: <i>Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)</i>	(McInnes et al. 2018)
R-Erweiterung: <i>Viridis</i>	(Simon Garnier et al. 2021)
R-Erweiterung: <i>Genefilter</i>	(R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, F. Hahne 2017)
R-Erweiterung: <i>dplyr</i>	(Wickham 2016)
Cytextpert	Beckman Coulter
FACSaria	BD Biosciences
Office	Microsoft

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probenmaterial

Neonatale B-Zellen wurden aus peripherem Blut der *Arteriae umbilicales* (*umbilical cord blood*, UCB) der Plazenta mit Einverständnis der Eltern direkt nach der Geburt gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte in Kooperation mit der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Essen sowie der Klinik für Geburtshilfe an der Augusta Klinik in Bochum.

Frühkindliches peripheres Blut (PB) (bis drei Jahre) wurde als überschüssiges Probenmaterial aus HLA-Typisierungen am Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Essen gewonnen. Die Probenakquise wurde durch die lokale Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Essen als ethisch und rechtlich unbedenklich eingestuft.

Kindliches PB (sieben Jahre bis 18 Jahre) wurden nach Einverständnis der Spender und Eltern am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universitätsmedizin Essen unter ärztlicher Aufsicht durch Venenpunktion entnommen.

Adultes Probenmaterial wurde aus peripherem Blut als *buffy coat* von gesunden Spendern nach deren Einverständnis vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Essen nach der Deklaration von Helsinki, bzw. als Vollblutspende von freiwilligen Spendern unter ärztlicher Aufsicht durch Venenpunktion entnommen.

### 2.2.2 Isolierung humaner B-Zellen

Die Isolierung humaner B-Zellen aus Probenmaterial erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde PB bzw. UCB mit PBS (0,5% BSA, Pan Biotech GmbH) vermischt und auf 15 ml Pancoll (Dichte: 1,077 g/ml, Pan-Biotech GmbH) in einem Reaktionsgefäß (50 ml) überschichtet. Anschließend erfolgte eine Sedimentierung bei 18°C für 35 min bei 400×g mit abgeschwächter Bremsleistung. Die resultierende Schicht aus mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß (50 ml) überführt und das Gefäß mit PBS (0,5% BSA) aufgefüllt. Die PBMCs wurden bei 4°C und 400×g für 5 min sedimentiert.



Der Überstand wurde verworfen und das PBMC-Zellpellet resuspendiert. Zu den PBMCs wurde das laut Herstellerangaben empfohlene Volumen an anti-CD19-Microbeads (Miltenyi Biotech) zugegeben, vermischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß mit PBS (0,5% BSA) aufgefüllt und bei 400×g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und CD19<sup>+</sup> Zellen nach Herstellerangaben durch Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) angereichert. Die Elution erfolgte in 4 ml PBS (0,5% BSA).

### **2.2.3 Durchflusszytometrie und Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen**

B-Zellen wurden aus PB bzw. UCB angereichert und durchflusszytometrisch charakterisiert bzw. durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) in verschiedene Zellpopulationen aufgeteilt.

CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus UCB und PB wurden nach Elution sedimentiert (4°C, 400×g, 5 min), der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet im Restvolumen resuspendiert. Anschließend wurden Zellsuspensionen mit Antikörpern nach Herstellerangaben in einem Reaktionsgefäß (5 ml) vermischt, für 15 min bei 4°C inkubiert und danach mit PBS (0,5% BSA) bei 400× g für 5 min bei 4°C gewaschen. Durchflusszytometrische Analysen wurden an einem Beckman Coulter Cytotflex S unter Verwendung der Software *Cytextpert* durchgeführt. Zellsortierungen wurden unter Anwendung eines FACSAria Fusions mit zugehöriger Software durchgeführt. Detaillierte durchflusszytometrische Analysen sowie Sortierstrategien werden im Ergebnisteil beschrieben.

### **2.2.4 Kultivierung und *in-vitro*-Aktivierung von humanen B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten wurden in RPMI1640-Medium (250.000 Zellen/ml, 20% FCS (Pan Biotech GmbH), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und für funktionelle Analysen aktiviert.

TD-Aktivierungen (*T cell dependent* Aktivierung) von kultivierten B-Lymphozyten wurden durch 0,03 µg/µl anti-Ig (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket,

UK), 1 µg/ml CD40-Ligand-HA mit 5 ng/ml anti-HA-Antikörper und ggf. in Kombination mit IL-4 und IL-21 (jeweils 100 IU) simuliert. TI-I-Aktivierungen (*T cell independent type I* / Aktivierung) erfolgten durch Gabe von CpG OND Typ B oder R848 (InvivoGen, San Diego, CA) nach Herstellerangaben. TI-II-Aktivierungen (*T cell independent type II* / Aktivierung) erfolgten durch Gabe von 0,03 µg/µl anti-Ig. Darüber hinaus wurden B-Zellen durch Ko-Inkubation mit T-Zellen aktiviert. Hierfür wurden sortierte autologe T-Zellen (CD20<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) durch Gabe von anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 Beads, nach Herstellerangaben (Treg Suppression Inspector; Miltenyi Biotec) aktiviert und mit der gleichen Zahl B-Zellen Ko-kultiviert.

### **2.2.5 Proliferationsmessung**

Für die Beurteilung des Teilungsverhaltens wurden pro Bedingung mindestens 50.000 B-Zellen aus UCB und aus adultem PB und ggf. die gleiche Zahl an T-Zellen sortiert (Sortierstrategie ist dem Ergebnisteil zu entnehmen). B-Zellen wurden gemäß Herstellerangaben mit dem Farbstoff eFluor670 (eBioscience) gefärbt, dreimal mit dem zehnfachen Volumen RPMI1640 (20% FCS, Pan Biotech GmbH) gewaschen und jeweils für 5 min bei 4°C und 400×g sedimentiert. Danach wurden die gefärbten B-Zellen durch TD, TI-I, TI-II und ggf. durch die Ko-Kultivierung mit autologen T-Zellen aktiviert und für 48 h, 72 h bzw. 96 h bei 37°C inkubiert. Die Bewertung des Proliferationsverhaltens erfolgte durchflusszytometrisch (Cytofelx S, Beckman Coulter) über die sukzessive Halbierung der Farbstoffintensität mit jeder Zellteilung im Vergleich zur Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte B-Zellen an Tag null.

### **2.2.6 Messung von Zelltod und Apoptose**

Für die Messung von Zelltod bzw. Apoptose und deren Relation zum Teilungsverhalten wurden pro Bedingung jeweils mindestens 50.000 B-Zellen aus UCB und aus adultem PB sortiert (Sortierstrategie ist dem Ergebnisteil zu entnehmen). Diese wurden anschließend mit eFluor670 gefärbt. Zusätzlich wurden bei den sortierten Populationen Färbungen nach Herstellerangaben mit Annexin V sowie DAPI durchgeführt. Gefärbte Zellen sind TI-I- und TD-aktiviert worden und inkubierten für 96 h bei 37°C. Die Bewertung von Zelltod und Apoptose in Relation zur Zellteilung erfolgte durchflusszytometrisch (Cytofelx S, Beckman Coulter) über die sukzessive Halbierung

der Farbstoffintensitäten mit jeder Zellteilung im Vergleich zu nicht proliferierten Zellen derselben Probe.

### **2.2.7 Messung der ASC-Differenzierung**

Für die Beurteilung der Differenzierungskapazität zu ASCs wurden pro Bedingung mindestens 50.000 B-Zellen aus UCB und aus adultem PB sortiert (Sortierstrategie dem Ergebnisteil zu entnehmen). Zellen wurden TD- und TI-I-stimuliert und für null bis vier Tage bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Differenzierung erfolgte täglich durchflusszytometrisch über eine zeitliche Größenzunahme im *Side Scatter*.

### **2.2.8 Einzelzellanalyse (10X Genomics)**

Für die Einzelzellanalyse der Genexpression, V(D)J-Umlagerungen sowie der Oberflächenproteine bei gesunden adulten, kindlichen, frühkindlichen und neonatalen B-Zellen wurden diese mittels Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) angereichert und sortiert (Sortierstrategie ist dem Ergebnisteil zu entnehmen). Zusätzlich wurden bei zwei UCB-Proben nach MACS und vor Sortierung Färbungen mit dem *TotalSeq™-C Human Universal Cocktail* (Biolegend) für die Analyse von Oberflächenmolekülen durchgeführt. Die Färbungen erfolgten nach Herstellerangaben. Durch einen *10X Genomics* Chromium Controller und zugehörigen Kits wurden nach Herstellerangaben Genexpressionsbibliotheken (GEX), Bibliotheken von V(D)J-Umlagerungen (V(D)J) sowie Oberflächenproteinbibliotheken (FB) generiert. Die Qualitätskontrolle der Bibliotheken (Fragmentlängenanalyse) erfolgte über DNA-Chips des Agilent 2100 Bioanalyzer Systems nach Herstellerangaben. Die Sequenzierungen für die FB- und V(D)J-Bibliotheken erfolgten auf einem MiSeq-Sequenzierer (Illumina) mit einer Leselänge von 26 + 90 bp und einer Sequenziertiefe von ca. 60.000 *Reads* pro Zelle an der *Genomics Transcriptomics Facility* (GTF) des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung). Die Sequenzierungen für die GEX-Bibliotheken wurden auf einem NextSeq-Sequenzierer (Illumina) am Institut für Humangenetik an der Universitätsmedizin Essen durchgeführt. Die Leselänge hierbei betrug ebenfalls 26 + 90 bp und die Lesetiefe lag ebenfalls bei 60.000 *Reads* pro Zelle.

Für epigenetische Analysen mittels Einzelzell-ATAC-Sequenzierung wurden von zwei gesunden Neugeborenen und zwei gesunden Erwachsenen Nuklei von B-Zellen

isoliert. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  durch MACS angereicherte B-Zellen in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und für 5 min bei  $300 \times g$  und  $4^\circ C$  sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurden in 100  $\mu l$  gekühltem Lysepuffer gelöst und für 4 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal nacheinander 1 ml gekühlter Waschpuffer zugegeben und das Gemisch bei  $4^\circ C$  und  $500 \times g$  für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Ausgehend von einer Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen und bei einer Annahme von 50% Zellverlust während der Lyse wurde die Konzentration von Nuklei für eine Gewinnung von 5.000 ebendieser eingestellt. Hierfür wurden spenderabhängig 100 bis 120  $\mu l$  verdünnter und gekühlter Nuklei-Puffer in das Reaktionsgefäß gegeben. Eine Beurteilung der Lyse erfolgte durch Trypanblau-Färbungen der Nuklei. Durch den *10X Genomics Chromium Controller* und dem zugehörigen *Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Assay* wurden den Herstellerangaben entsprechend Kern-RNA-Bibliotheken sowie ATAC-Bibliotheken generiert. Die Qualitätskontrolle der Bibliotheken (Fragmentlängenanalyse) erfolgte nach Herstellerangaben über DNA-Chips des Agilent 2100 Bioanalyzer Systems. Die Sequenzierungen erfolgten auf einem NextSeq-Sequenzierer (Illumina). Die Sequenzierlängen beider Bibliotheken waren den Herstellerangaben entsprechend und die jeweilige Sequenziertiefe aller Bibliotheken erreichte 60.000 *Reads* pro Zelle.

Die Generierung kohärenter Datensätze erfolgte über die vom Hersteller (*10X Genomics*) bereitgestellte Software *Cell Ranger*. Alle bioinformatischen Analysen (UMAP, PCA, *Trajectory-Analysen*, *Sequence-Alignment*, GSEA, usw.) wurden mit R und den im Materialteil aufgezählten Erweiterungen in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) durchgeführt.

### **2.2.9 Infinity Flow Analyse**

Für die *Infinity Flow* Anwendung wurden durch MACS angereicherte CD19<sup>+</sup> B-Zellen verwendet. Nach *Panel*-Färbung (das *Panel* ist dem Ergebnisteil zu entnehmen) wurde ein Teil der angereicherten B-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei wurde der PE-Kanal, als FMO mit aufgenommen. Über die *Panel*-Färbung wird im späteren Verlauf die UMAP, in welcher die Ko-Expression von Proteinen analysiert werden kann, generiert. Anschließend wurden die einzelnen Marker zusammen mit dem *Panel*

aufgenommen. Für jeden Marker wurde eine Messung durchgeführt. Alle Marker befanden sich im PE-Kanal. Die Auswertung erfolgte über die R-Erweiterung *Infinity Flow* (Becht et al. 2021).

## 2.2.10 Antikörperproduktion

### Herstellung von Fab-kodierenden DNA-Sequenzen

Die für Fab-Fragmente codierenden DNA-Sequenzen für die Produktion humaner rekombinanter Antikörper wurden über die *eBlocks™ Gene Fragments* Anwendung zur Oligonukleotidsynthese vom Anbieter IDT (Integrated DNA Technologies) hergestellt.

Beim Design der codierenden Sequenzen wurden am 5'- sowie am 3'-Ende des Moleküls DNA-Sequenzen eingefügt, die eine Amplifizierung des Ausgangsmaterials mittels PCR erlauben. Am 5'-Ende wurde die Sequenz 5'-CCCCGTCACCTTTGGCTTATCAGTCTCGAGGCCGCC...-3' und am 3'-Ende die Sequenz 5'-...AGTGACATCTGGACGCTAAGACCG-3' eingefügt. Darüber hinaus wurden am 5' und am 3'-Ende Restriktionsschnittstellen für spätere Klonierungen eingefügt. Für die schwere Kette wurde eine Schnittstelle für *XhoI* (5'-...C↓TCGAG...-3') am 5'-Ende und am 3'-Ende eine Schnittstelle für *NheI* (5'-...G↓CTAGC...-3') eingefügt. Für die leichten Ketten wurde im Fall der κ-Kette am 5'-Ende eine Schnittstelle für *BshTI* (5'-...A↓CCGGT...-3') und am 3'-Ende eine Schnittstelle für *XmaI* (5'-...C↓CTAGG...-3') eingefügt. Am 5'-Ende der λ-Kette wurde ebenfalls eine Schnittstelle für *XmaI* (5'-...C↓CTAGG...-3') eingesetzt und am 3'-Ende eine Schnittstelle für *Pfl23II* (5'-...C↓GTACG...-3'). Um eine effektive spätere Translation der Sequenz zu gewährleisten, wurde unterhalb der 5'-Restriktionssequenz eine Kozak-Sequenz um das Start-Codon herum eingebaut (5'-...GGCCGCCATGG...-3').

Die *eBlocks™ Gene Fragments* werden in einer Konzentration von 10 ng/μl in nukleasefreiem Wasser bei -20°C gelagert.

### Amplifikation von Fab-kodierenden DNA-Sequenzen

Die für das Fab-Fragment codierende Sequenz wurde durch PCR (*polymerase chain reaction*) vervielfältigt.

Im nachfolgendem aufgezeigt sind die Zusammensetzung des Mastermix und das zugehörige PCR-Programm:

Tabelle 11: Mastermix der PCR

PCR-Reagenzien	Volumen
dNTPs (2 µM)	5 µl
10 × PCR-Puffer	5 µl
Forward-Primer (2,5 µM)	2,5 µl
Reverse-Primer (2,5 µM)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Template-DNA (10 ng/µl)	2 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	28,7 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 12: Programm PCR

Temperatur	Zeit	
95°C	50 sec	<b>30 ×</b>
60°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	
15°C	Pause	

### Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Für eine Qualitätskontrolle und Exklusion unspezifischer Banden wurden die amplifizierten DNA-Moleküle auf ein Agarosegel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt.

Agarosegele (1% - 2%) wurden mit TAE-Puffer (150 ml) und 10 µl *GelRed*<sup>®</sup> gegossen und bei RT für 60 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das DNA-Molekül mit 6× Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels geladen. Je nach Größe des geladenen DNA-Moleküls wurden 5 µl unterschiedlicher Längenstandards (100 bp bis 10.000 bp) zur Größenidentifizierung genutzt. Auf das Gel wurde für 60 min Spannung (100 V/15 cm) angelegt.

### **Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Zur Aufreinigung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen, wurden das *Monarch® DNA Gel Extraction Kit* (New England Biolabs) gemäß Herstellerangaben verwendet.

### **DNA-Quantifizierung**

DNA-Quantifizierungen erfolgten über den Nanodrop ND-1000 sowie über das *Qubit 1X dsDNA HS Assay-Kit* (Thermo Fisher) gemäß Herstellerangaben.

### **Ligation von DNA-Molekülen in Vektoren**

Für die Ligation in pGEM®-T Vektoren wurden 30 ng der amplifizierten und aufgereinigten Fab-kodierenden DNA-Fragmente, 5 µl 2 × Ligationspuffer, 1 µl pGEM®-T Vektor, 1 µl T4-Ligase (alle Promega) in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt, durchmischt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Für die Ligation von Fab-Fragmenten in Expressionsvektoren, deren *Backbone* Sequenzen enthält, die für schwere bzw. leichte Kette kodieren, wurden 25 fmol verdauter Vektor sowie 75 – 150 fmol verdautes Insert in ein Reaktionsgefäß (0,5 ml) gegeben, mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl *Mighty Mix* Ligase (Takara) vermischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16°C inkubiert.

### **Transformation**

Die Transformation von *E.coli* mit Klonierungs- und Expressionsvektoren erfolgte mittels *Heat shock*. Hierfür wurden 25 µl kompetente Zellen (*E.coli*-Stamm JM109, Promega) mit 2,5 µl Ligationsansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Der *Heat shock* erfolgte für 45 sec bei 42°C. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis inkubiert und zusammen mit 200 µl SOC-Medium in ein Reaktionsröhrchen (13 ml) überführt und für 50 min bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Im Fall der Transformation durch pGEM®-T Vektoren wurden 40 µl *Blue-White-Select* auf ampicillinhaltige Agarplatten (100 µg/ml) gegeben und ausgestrichen. Für die Transformation mit Expressionsvektoren wurden für die schwere Kette zeocinhaltige Agarplatten (25 µg/ml, InvivoGen) und bei Expressionsvektoren für leichte Ketten wurden blasticidinhaltige Agarplatten (100 µg/ml, InvivoGen) verwendet.

Pro Agarplatte wurden 75 µl der Transformationsansätze ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten für 3 h bei 4°C inkubiert. Während der Inkubation wurden in Reaktionsröhrchen (13 ml) 2 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml, pGEM®-T Vektor), zeocinhaltenes (25 µg/ml, Expressionsvektor schwere Kette) oder blasticidinhaltenes (100 µg/ml, Expressionsvektor leichte Ketten) LB-Medium vorgelegt.

Nach Inkubation wurden im Falle der Transformation mit dem pGEM®-T Vektoren „weiße“ Kolonien gepickt, in das vorbereitete Medium überführt und für 16-18 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Bei Transformationen mit Expressionsvektoren erfolgte keine blau-weiß-Selektion.

### **Mini-Präparation**

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das *mi-Plasmid Miniprep Kit* von Metabion verwendet.

Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden für 2 min bei 10.000×g sedimentiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden in 200 µl MX1-Puffer gelöst. Anschließend wurden 250 µl MX2-Puffer zugegeben und der Ansatz mehrere Male invertiert und für 5 min inkubiert. Danach wurden 350 µl MX-Puffer zum Ansatz gegeben. Dieser wurde daraufhin bei 10.000×g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in eine Auffangsäule transferiert. Hierauf folgte eine Zentrifugation bei 7.000×g. Die Säule wurde mit 500 µl WN-Puffer und 700 µl WS-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 7.000×g. Anschließend wurde die Säule bei 10.000×g für 3 min zentrifugiert und in ein Auffanggefäß (1.5 ml) platziert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer mit 3 min Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 10.000×g für 3 min. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Nanodrop ND-1000.

### **Sanger-Sequenzierungen**

Zur Sequenzvalidierung von Konstrukten wurden Sanger-Sequenzierungen durchgeführt.



Hierfür wurden 300 bis 500 ng Template-DNA mit 1 µl *Big Dye* (Thermo Fisher), 3,75 µl 5 × Sequenzierpuffer, 0,75 µl Primer zur Sequenzierung vermischt und mit H<sub>2</sub>O auf 18 µl aufgefüllt. Für die Sequenzierung wurden M-13 Primer (pGEMT-Vektor) oder pFUSE Sequenzierprimer (Expressionsvektor) verwendet.

Tabelle 13: Programm Sequenzreaktion

Temperatur	Zeit	
96 °C	5 min	
95 °C	15 sec	<b>24 ×</b>
50 °C	10 sec	
60 °C	4 min	
15 °C	Pause	

Zur Fällung der Sequenzierungsgemische wurde zu den Proben 40 µl H<sub>2</sub>O, 150 µl Ethanol (100%) und 6 µl 1,5M Natriumacetat/Dextranblau gegeben, vermischt und für 30 min bei 13000×g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl Ethanol (70%) zu den Proben gegeben. Es folgte eine Sedimentation für 10 min bei 13000×g. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet.

### Restriktionsverdau

Zur Ligation von Insert in den Expressionsvektor wurden sowohl die für die Fab-Fragmente kodierenden DNA-Moleküle als auch die Expressionsvektoren für schwere bzw. leichte Kette durch Restriktionsenzyme wie folgt verdaut:

Tabelle 14: Schema Restriktionsverdau

Reagenz	IGH (Vektor + Insert)		IGL (Vektor + Insert)		IGK (Vektor + Insert)	
10 × Green Buffer	2 µl		2 µl		2 µl	
DNA (Vektor + Insert)	Jeweils 1 µg		Jeweils 1 µg		Jeweils 1 µg	
Fast Digest Enzyme	1 µl NheI	1 µl XhoI	1 µl BshTI	1 µl XmaJI	1 µl BshTI	1 µl Pfl23II
H <sub>2</sub> O	Auf 20 µl auffüllen		Auf 20 µl auffüllen		Auf 20 µl auffüllen	

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 15 min.

## **Transfektion**

Zur transienten Expression von Antikörpern wurden die korrespondierenden Plasmide für schwere und leichte Kette in nicht-adhärenente HEK293-F-Zellen eingebracht. Hierfür wurden an Tag 0 HEK293-F-Zellen mit einer Dichte von  $0,6 \times 10^6 - 0,7 \times 10^6$  Zellen/ml in *FreeStyle™ 293 Expression Medium* (ThermoFisher) ausgesät und für 24 h bei 37°C 8% CO<sub>2</sub> und 135 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. An Tag 1 wurden die Zellen auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 30 ml davon in einem Erlenmeyerkolben (125 ml) transferiert. Anschließend wurden 20 µg des Plasmids für die leichte Kette (1 µg/µl) sowie 20 µg des Plasmids für die schwere Kette (1 µg/µl) vermischt und mit OptiPRO™ SFM™ (Thermo Fisher) auf 600 µl aufgefüllt. Parallel dazu wurden 40 µl FreeStyle™ MAX Reagent (Thermo Fisher) mit OptiPRO™ SFM™ (Thermo Fisher) auf 600 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Beide Ansätze wurden zusammengeführt, vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Unter leichtem Schütteln des Kolbens erfolgte eine tröpfchenweise Zugabe des Gemischs zur Suspension. Es folgte eine Inkubation für 4 Tage bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub> und 135 rpm auf einem Orbitalschüttler. Danach wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsröhrchen (50 ml) überführt, für 10 min bei 3700×g sedimentiert und der Überstand zwecks Affinitätsaufreinigung in ein neues Röhrchen (50 ml) überführt.

## **Affinitätsaufreinigungen von Antikörpern**

Für Affinitätsaufreinigungen kamen Polypropylensäulen (10 ml) sowie Protein A/G Agarose (beide Thermo Fisher) zur Anwendung.

Die Polypropylensäulen wurden zu Beginn mit Protein A/G Agarose gepackt. Hierfür wurde H<sub>2</sub>O in die Säule gegeben. In die Säule wurde eine poröse Polyethylen disk (30 µm Porengröße) gegeben und bis kurz vor das Reservoir gedrückt. Danach wurde in die Säule 2 ml homogenisierte Protein A/G Agarose gegeben. Nach 30 Minuten wurde eine zweite poröse Polyethylen disk in der Säule platziert. Zwischen dem Gelbett der Agarose und der Disk wurde ca. 2 mm Platz gelassen.

Die gepackten Säulen wurden mit 5 ml Bindungspuffer äquibriert und der Überstand anschließend 1:1 mit Bindungspuffer verdünnt. Die verdünnte Probe wurde in Schritten von 2 ml auf die Säule gegeben. Bei jedem Schritt lief die Probe komplett in das Gelbett ein. Nachdem die Probe komplett geladen wurde, wurden gebundene Proteine mit 5

ml Elutionspuffer in Fraktionen von je 1 ml eluiert und durch Neutralisationspuffer auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 gebracht. Die Säule wurde durch Gabe von 12 ml Elutionspuffer rekonstituiert.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Eluate mittels NanoDrop ermittelt. Eluate mit hoher Proteinkonzentration wurden zusammengeführt und für weitere Aufreinigungen verwendet.

### **Größenaufreinigung, Aufkonzentrierung, Pufferaustausch von Antikörpern**

Für Größenaufreinigungen und Aufkonzentrierung von Eluaten aus der Affinitätsaufreinigung wurden Sartorius Vivaspin 6 Zentrifugalkonzentratoren (50.000 MWCO PES) verwendet.

Der Konzentrator wurde mit der gepoolten Probe beladen und bei 4000×g sedimentiert bis das Totvolumen erreicht war. Anschließend wurde der Konzentrator für den Pufferaustausch mit PBS beladen und erneut bis zum Erreichen des Totvolumens sedimentiert. Daraufhin wird die aufgereinigte, aufkonzentrierte und umgepufferte Probe aus dem Reservoir entnommen und die darin befindliche Menge an Protein quantifiziert.

### **SDS-PAGE von synthetisierten Antikörpern**

Zur Qualitätskontrolle der Antikörpersynthese wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese des aufgereinigten Zellkulturüberstandes durchgeführt. Zur Auftrennung wurden Gradientengele (4-15% Mini-Protean® TGX, Bio-Rad) verwendet. Eine 1:5-Verdünnung von Laemmli-Puffer/0,1 M DTT wurde mit dem aufgereinigten Zellkulturüberstand für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden in die Taschen des Gels überführt. Darüber hinaus wurde jeweils eine Tasche mit 2 µl des Proteinstandard MagicMark™ (Invitrogen) und 2 µl der Proteinleiter PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific) beladen. Auf das Gel wurde für 45 min eine Spannung von 120 V/12 cm angelegt.

### **Coomassie-Färbung**

Zur Detektion des Gesamtproteins des durch die SDS-PAGE aufgetrennten Zellkulturüberstandes wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dazu wurde das

Gel für 1 h Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in einer Coomassie-Lösung inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel in ein Gefäß überführt und über Nacht bei Raumtemperatur in VE-Wasser inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit einem Gel Doc XR+ Molecular Imager (Thermo Fisher Scientific).

### **Western Blot**

Für den qualitativen Nachweis von rekombinanten humanen Antikörpern (IgG) wurden Western Blots durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden gemäß den Herstellerangaben mittels Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) und des Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Hierbei wurde eine elektrische Spannung von 25 V, eine Stromstärke von 1,3 A und eine Zeit von 7 min verwendet. Anschließend wurde die geblottete Membran in ein Reaktionsröhrchen (50 ml) mit 5 ml PBS/T + BSA (10%) überführt und für 1h RT auf einem Kipp-/Rollenmischer inkubiert, um sie zu blockieren. PBS/T + BSA (10%) wurde entfernt und die Membran wurde 3 × mit PBS/T gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper (anti-IgG, rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) 1:1000 in 5 ml PBS/T + BSA (1%) verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem verdünnten Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 × mit PBS/T gewaschen. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper (Peroxidase AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch) 1:4000 in 5 ml PBS/T + BSA (1 %) verdünnt, auf die Membran gegeben und für 2 h bei RT auf einem Kipp-/Rollenmischer inkubiert. Nach Inkubation wurde die Membran 3 × mit PBS/T gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Membran mit einem 1:1-Gemisch von ECL™ Prime Luminol Enhancer Solution ECL™ (Cytiva) und Prime Peroxide Solution (Cytiva) benetzt und mit einem Fusion Solo (Vilber Lourmat) ausgewertet.

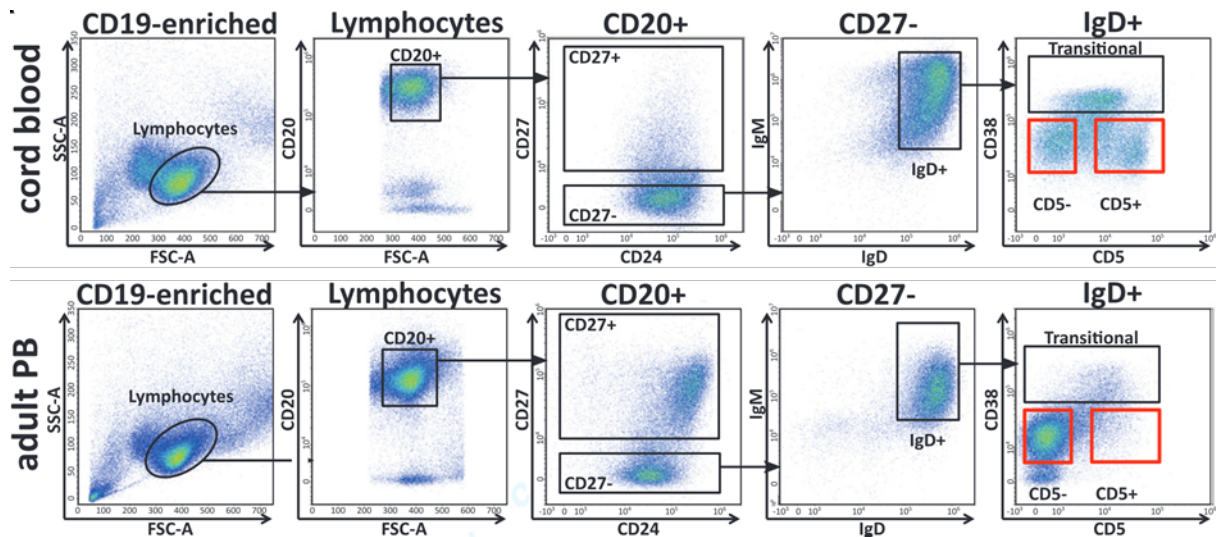
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktionelle Untersuchungen von neonatalen und adulten B-Zellen

Das Immunsystem von Neugeborenen wird als unreif und dysfunktional eingeschätzt (Siegrist und Aspinall 2009; Adkins et al. 2004). Um dies zu untersuchen, wurden bei B-Zellen aus Nabelschnurblut sowie B-Zellen aus peripherem Blut von Erwachsenen durchflusszytometrische Analysen und funktionelle Studien durchgeführt. Letztere beinhalteten Experimente zum Proliferationsverhalten, zum Apoptoseverhalten sowie zu Differenzierungseigenschaften.

Durchflusszytometrie von durch MACS angereicherten UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen zeigte, dass UCB-B-Zell-Pools im Vergleich zu ihrem adulten Gegenpart kaum CD27 ausdrückten und somit keine klassischen Gedächtnis-B-Zellen enthielten. Darüber hinaus war die Expression von CD38 in UCB-B-Zellen gegenüber adulten PB-B-Zellen auf Grund eines höheren Anteiles an transitionellen B-Zellen erhöht. Der Anteil von reifen CD5<sup>+</sup> B-Zellen war in Neugeborenen ebenfalls höher als in Erwachsenen (Abbildung 1).

Für sich anschließende funktionelle Untersuchungen wurden reife, naive B-Zellen (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) anhand ihrer Expression von CD5 aufgetrennt. Es wurden sowohl Untersuchungen mit CD5<sup>+</sup> als auch mit CD5<sup>-</sup> reifen naiven B-Zellen durchgeführt (Abbildung 1). CD5 wurde als Marker ausgewählt, da vorherige Publikationen vermuten ließen, dass dieser womöglich B1a- und B1b-Zellen im Menschen auftrennt (Baumgarth 2011; Montecino-Rodriguez und Dorshkind 2006). CD5<sup>-</sup> reife B-Zellen werden im Zuge der funktionellen Studien in Erwachsenen als „naive“ bezeichnet.



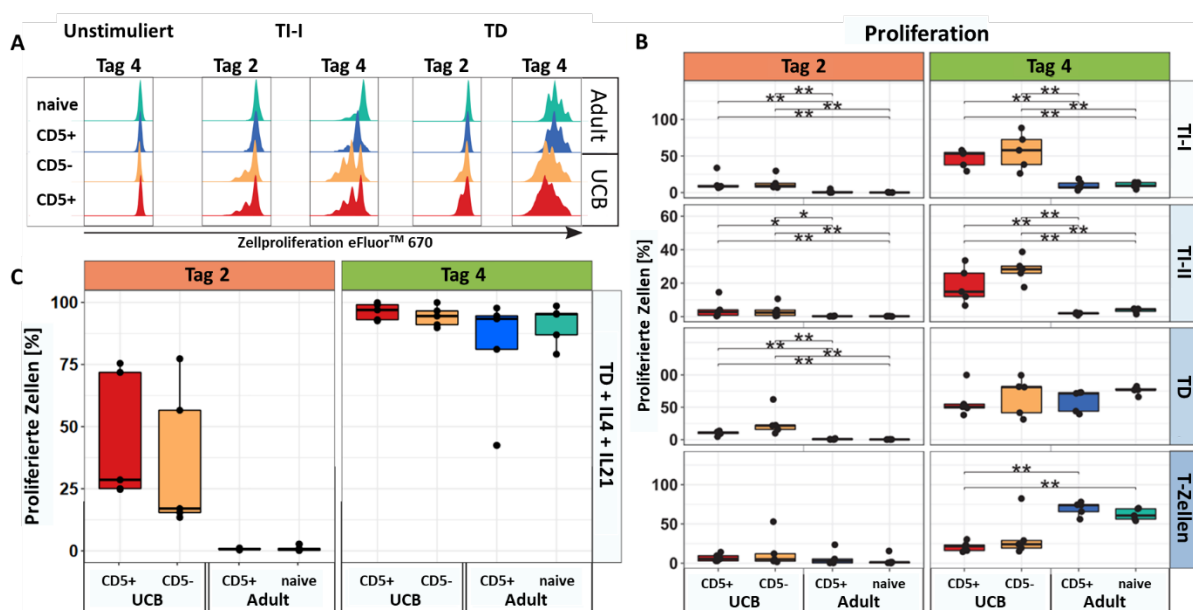
**Abbildung 1: Sortierstrategie für funktionelle Untersuchungen an humanen UCB-B-Zellen sowie adulten PB-B-Zellen**

Durch MACS angereicherte  $CD19^+$  B-Zellen wurden mit fluorochromkonjugierten anti- $CD20^-$ , anti- $CD24^-$ , anti- $CD27^-$ , anti-IgM- anti-IgD-, anti- $CD38^-$  und anti- $CD5^-$ -Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden reife  $CD5^+$  B-Zellen ( $CD20^+$ ,  $CD27^-$ ,  $IgD^+$ ,  $CD38^{low}$ ,  $CD5^+$ ) und  $CD5^-$  B-Zellen ( $CD20^+$ ,  $CD27^-$ ,  $IgD^+$ ,  $CD38^{low}$ ,  $CD5^-$ ) sortiert. Die dargestellten Daten sind exemplarisch für >65 Experimente. Die Erhebung der Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Artur Kibler vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung). Originalpublikation: Budeus, B., Bronischewski, K. et al. (2021). *Journal of immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100113>.

Funktionelle *in vitro* Analysen des Teilungsverhaltens bei sortierten Zellen zeigten, dass UCB-B-Zellen und adulte PB-B-Zellen unterschiedliche Proliferationseigenschaften besitzen. So sind unter TI- und TD-Aktivierung bei UCB-B-Zellen nach zwei Tagen Zellteilungen zu erkennen, während adulte PB-B-Zellen kaum proliferierten. Nach vier Tagen waren bei TI-Stimulierung ein Großteil aller UCB-B-Zellen und kaum adulte PB-B-Zellen proliferiert. Unter TD-Stimulierung war an Tag vier sowohl bei UCB-B-Zellen als auch beim adulten Gegenpart bei einem Großteil der Zellen Proliferation nachweisbar (Abbildung 2A). Dieses Verhalten konnte unter verschiedenen Stimulierungsbedingungen bei über 50 Spendern bestätigt werden. So proliferierten unter allen getesteten Stimulierungsbedingungen nach zwei Tagen 10 – 15% der UCB-B-Zellen, während beim adulten Gegenpart kaum Proliferation zu beobachten war. Nach vier Tagen hatten sich unter TI-I-Stimulierung und TI-II-Stimulierung bis zu 75% aller UCB-B-Zellen geteilt, während adulte PB-B-Zellen signifikant weniger proliferierten. Erst unter TD-Stimulierung waren ähnliche Fraktionen von UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen (50 – 75%) proliferiert. Bei Ko-Inkubation mit aktivierten autologen T-Zellen proliferierten nach vier Tagen signifikant

weniger UCB-B-Zellen (ca. 25%) als adulte PB-B-Zellen (ca. 75%) (Abbildung 2B). Damit ein Einfluss der Stimulierungsintensität auf das unterschiedliche Verhalten bewertet werden konnte, wurde eine TD-Aktivierung mit Ko-Stimulierung mit IL-21 und IL-4, zwei sehr potenten Zytokinen für B-Zell-Aktivierung, durchgeführt. Auch unter dieser „Überstimulation“ reagierten adulte PB-B-Zellen verzögert (Abbildung 2C).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich UCB-B-Zellen von adulten PB-B-Zellen signifikant in ihrer Proliferationsdynamik voneinander unterscheiden, und dass dieses Verhalten von TI- und TD-Stimulierungsbedingungen abhängig ist.



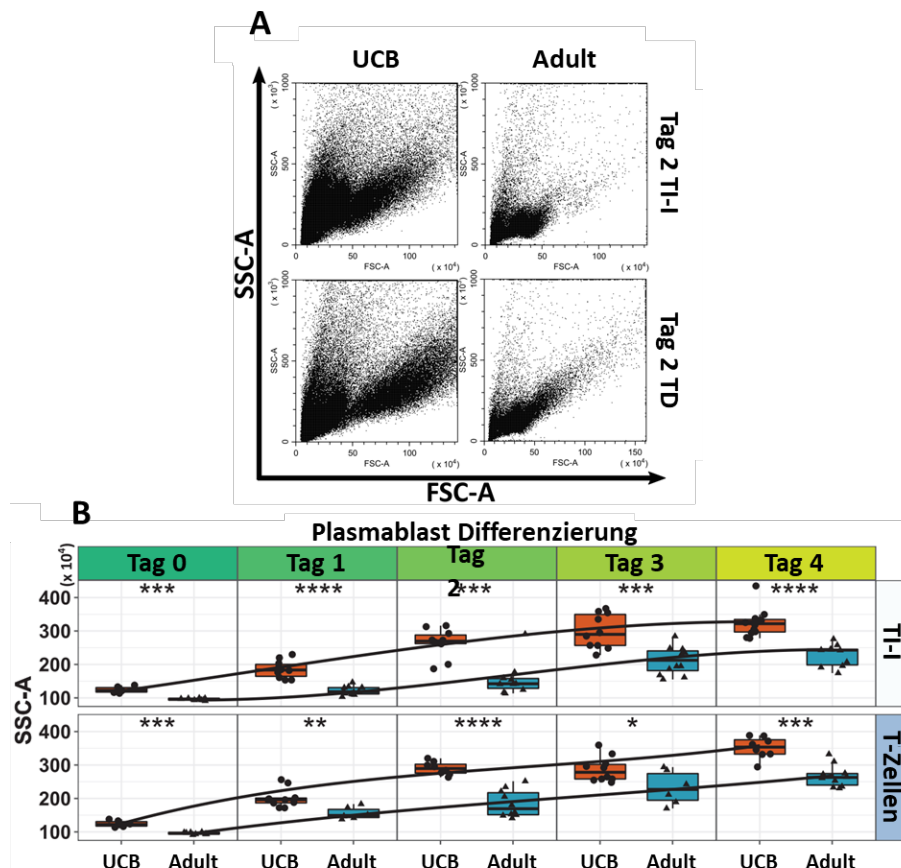
**Abbildung 2: Untersuchung des Proliferationsverhaltens von stimulierten UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen**

Darstellung der Analyse der Proliferationskapazität von sortierten, aktivierten (TI-I und TD) CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> UCB-B-Zellen sowie adulten CD5<sup>+</sup> und naiven adulten PB-B-Zellen mit Hilfe des Zellproliferationsfarbstoffs eFluor670 nach zwei und vier Tagen. Der Verlust der Signalintensität korreliert direkt mit der Zahl der Teilungen. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle (A). Prozentualer Anteil von proliferierten UCB-B-Zellen sowie adulten PB-B-Zellen an der jeweiligen Gesamtpopulation unter Stimulierung (TI-I, TI-II, TD und Ko-Kultur mit T-Zellen) nach zwei und nach vier Tagen (B). Prozentualer Anteil von proliferierten UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen an der jeweiligen Gesamtpopulation unter Stimulation (TD + IL-4 + IL-21) nach zwei und nach vier Tagen (C). Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Die Generierung der Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Ekaterina Homp vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung). Gezeigt werden über 80 unabhängige Experimente. Abbildung modifiziert nach Originalpublikation: Budeus, B., Bronischewski, K. et al. (2021). *Journal of immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100113>. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 durch Wilcoxon-Ranksummentest.

Als weiterer funktioneller Parameter wurde die Plasmablastdifferenzierung von UCB-B-Zellen sowie adulten PB-B-Zellen untersucht. Der Grad an Granularität in

durchflusszytometrischen Versuchen wurde zur Beurteilung der Differenzierung herangezogen. Ein erhöhter Grad an Granularität, also einer Erhöhung des *Side Scatters*, steht in direktem Zusammenhang mit einer Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmablasten (Pinder et al. 2017; Budeus et al. 2021). Initial durchgeführte Experimente suggerierten unterschiedliche Differenzierungskapazitäten bei UCB-B-Zellen und B-Zellen aus adultem peripherem Blut, unabhängig von der jeweiligen Stimulationsbedingung (TI-I und TD) (Abbildung 3A). Auch bei tiefergehenden Analysen von über 20 verschiedenen Spendern waren UCB-B-Zellen von Tag null an signifikant granulärer als ihr adulter Gegenpart. Dies galt sowohl für TI-I Stimulierung als auch für die Ko-Inkubation mit aktivierten autologen T-Zellen. Der Trend signifikant erhöhter Granularität bei UCB-Zellen, verglichen zu deren adultem Gegenpart setzte sich bis einschließlich Tag vier für beide Stimulierungsbedingungen fort. UCB-B-Zellen waren wesentlich geneigter zu einer Differenzierung in kurzlebige antikörpersezernierende Plasmablasten als ihr adulter Gegenpart (Abbildung 3B).



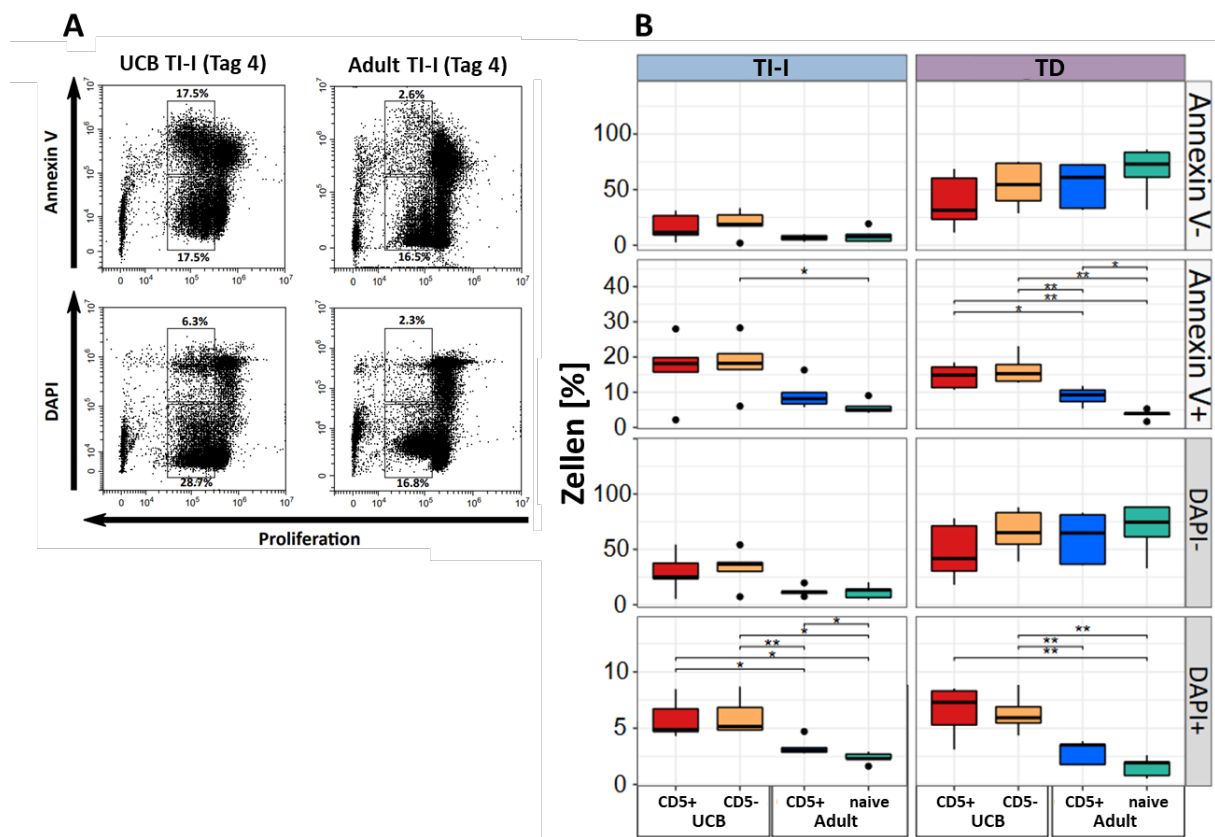


**Abbildung 3: Analyse der Differenzierung von UCB-B-Zellen bzw. adulten PB-B-Zellen zu antikörpersezierenden Zellen**

Darstellung der Analyse der Differenzierung von UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen zu ASCs nach zwei Tagen unter TI-I- und TD-Stimulation. Ein erhöhter Differenzierungsgrad ist durchflusszytometrisch durch eine Erhöhung des SSC gekennzeichnet (A). Analyse der Plasmablastdifferenzierung von sortierten UCB-B-Zellen und sortierten adulten PB-B-Zellen von Tag null bis Tag vier nach TI-Stimulierung bzw. Ko-Inkubation mit aktivierten autologen T-Zellen (B). Eingesetzt wurden mindestens 50.000 Zellen. Die Generierung der Daten fand in Kooperation mit Dr. Ekaterina Homp vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) statt. Modifiziert nach Originalpublikation: Budeus, B., Bronischewski, K. et al. (2021). *Journal of immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100113>. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  durch Wilcoxon-Ranksummentest.

Zusätzlich zur Beurteilung von Proliferation und ASC-Differenzierung wurde die Messung des Anteiles apoptotischer oder toter Zellen nach Aktivierung bei UCB-B-Zellen sowie adulten PB-B-Zellen untersucht. Hierfür wurden zuvor aktivierte B-Zellen (TI-I- und TD-Stimulierung) mit den Farbstoffen Annexin-V (spezifisch für apoptotische Zellen) und DAPI (spezifisch für tote Zellen) angefärbt und nach vier Tagen durchflusszytometrisch ausgewertet. Hierbei zeigten sich Unterschiede zwischen UCB-B-Zellen und adulte PB-B-Zellen. So war der Anteil apoptotischer und toter Zellen bei UCB-B-Zellen höher als bei deren adulten Gegenpart (Abbildung 4A). Auch bei der

tieferegehenden Analyse von mehr als 20 Spendern waren signifikante Unterschiede zwischen UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen nach vier Tagen zu beobachten. So lag der Anteil von zuvor proliferierten apoptotischen Zellen unter beiden Stimulierungsbedingungen (TI-I + TD) bei UCB-B-Zellen bei ca. 20%, während im gleichen Zeitraum bei adulten PB-B-Zellen lediglich 5 – 10% apoptotisch waren. Unabhängig von der jeweiligen Stimulationsbedingung war der relative Anteil von UCB-B-Zellen, die nach ihrer Proliferation starben, (5 – 7%) signifikant gegenüber ihrem adulten Gegenpart (2 – 2,5%) erhöht (Abbildung 4B).



**Abbildung 4: Analyse von Apoptose und Zelltod bei proliferierten UCB-B- und adulten PB-B-Zellen.**

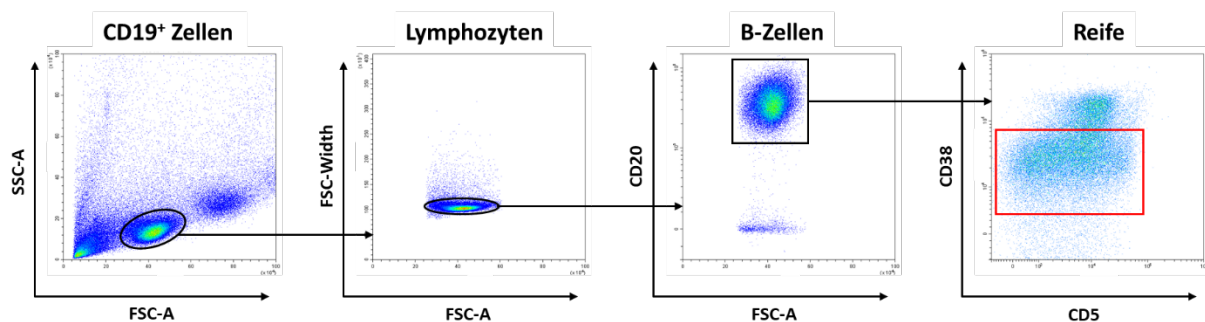
Repräsentative Auswertung von apoptotischen und toten UCB- und adulten PB-B-Zellen nach vier Tagen TI-I-Stimulation. Die Beurteilung von Apoptose (Annexin V<sup>+</sup>) und Zelltod (DAPI<sup>+</sup>) erfolgte durchflusszytometrisch in Kombination mit dem Zellproliferationsfarbstoff eFluor670 (A). Zusammenfassung der Analyse von apoptotischen und toten CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> UCB-B- und adulten CD5<sup>+</sup> und naiven PB-B-Zellen nach vier Tagen TI-I und TD-Stimulation bei über 20 unabhängigen Experimenten. Modifiziert nach Originalpublikation: Budeus, B., Bronischewski, K. et al. (2021). *Journal of immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100113>. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 durch Wilcoxon-Ranksummentest.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass UCB-B-Zellen nicht, wie in der Literatur beschrieben, dysfunktional sind, sondern im Gegenteil, kurzfristig eine erhöhte Proliferations- und Differenzierungsdynamik verglichen zum jeweiligen adulten Gegenpart zeigen, die jedoch mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Apoptose und Zelltod einhergeht.

## 3.2 Einzelzellanalyse der Genexpression humaner B-Zellen im Altersverlauf

Die funktionellen und morphologischen Untersuchungen bei UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen deuteten darauf hin, dass UCB-B-Zellen zwar funktional, aber auf dynamischer Ebene unterschiedlich gegenüber ihrem adulten Gegenpart sind. Für eine genauere Bestimmung dieser Unterschiede sowie für die Klärung der Transition zwischen neugeborenem und adultem B-Zell-Immunsystem wurden Einzelzellanalysen von Spendern unterschiedlicher Altersstufen (zweimal null Jahre und jeweils einmal zwei Jahre, drei Jahre, sieben Jahre, zehn Jahre, 20 Jahre und 30 Jahre) durchgeführt. Für die Generierung der Einzelzell-RNA-Profile wurde das *Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit* der *10X Genomics* Plattform verwendet.

Zur Herstellung der Einzelzellbibliotheken wurden durch MACS  $CD19^+$  B-Zellen angereichert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit fluorchromkonjugierten anti- $CD20^-$ , anti- $CD5^-$  und anti- $CD38^-$  Antikörpern. Im Kit wurden sortierte, reife B-Zellen ( $CD20^+CD38^{int}$ ) verwendet. Transitionelle B-Zellen wurden ausgeschlossen (Abbildung 5).

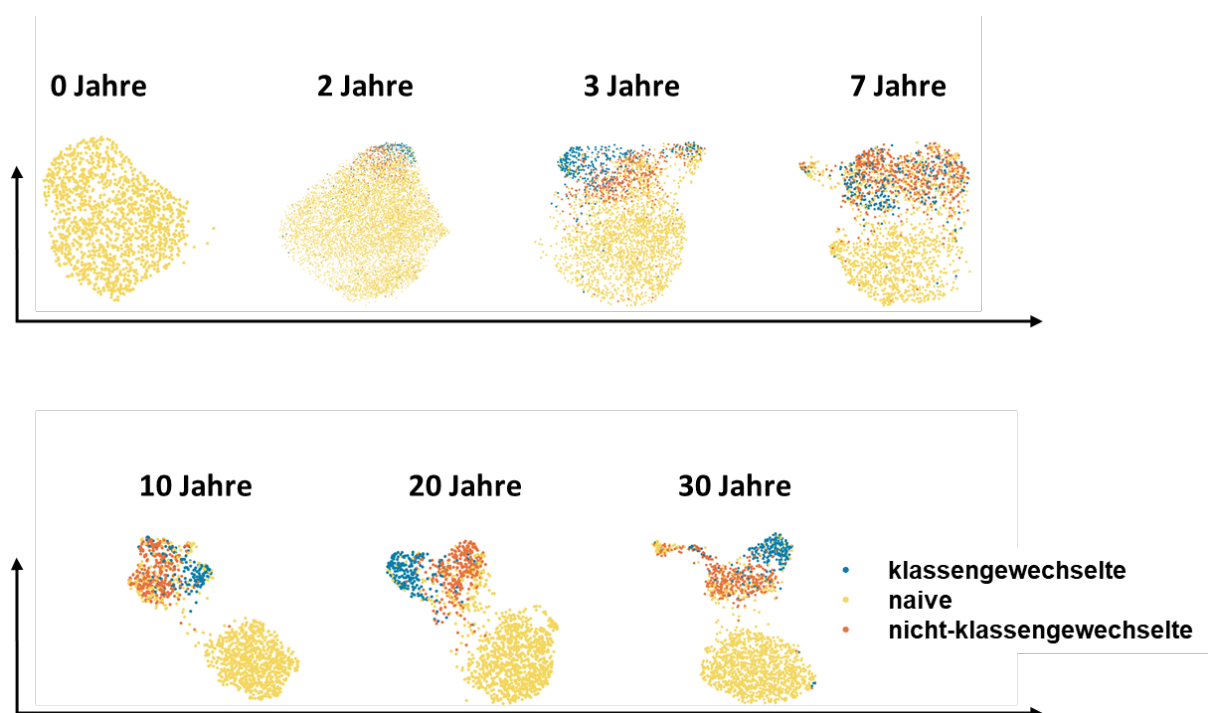


**Abbildung 5: Darstellung der Sortierstrategie für Einzelzellanalysen**

Für die Generierung von Einzelzellbibliotheken wurden  $CD19^+$  angereicherte Zellen mit fluorochromkonjugierten anti- $CD20^-$ , anti- $CD38^-$  sowie anti- $CD5^-$  Antikörpern gefärbt. Sortiert wurden mindestens 50.000  $CD20^+CD38^{int}$  B-Zellen. Nicht reife, transitionelle B-Zellen wurden ausgeschlossen. In den Assay wurden ca. 20.000 Zellen geladen. Die Zahl der gewonnenen Zelläquivalente in den Einzelzellanalysen schwankte zwischen 2.000 und 10.000.

Bei der Einzelzellanalyse der Genexpression von humanen, reifen B-Zellen waren altersabhängige Unterschiede zu beobachten. So zeigte eine UMAP-Darstellung von Einzelzellen der jeweiligen Spender bei Neugeborenen eine große Homogenität

innerhalb des B-Zell-Pools. Alle diesem Cluster zugehörigen Zellen wurden entsprechend eines bereits publizierten Referenzdatensatzes (Budeus et al. 2021) als naive B-Zellen annotiert. Bei dem zweijährigen Spender war bei der UMAP eine erste Polarisierung innerhalb des B-Zell-Pools zu beobachten. Ein kleiner Anteil der B-Zellen wurden als klassengewechselte oder nicht klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen klassifiziert. Im weiteren Altersverlauf stieg der Anteil der Gedächtnis-B-Zellen erheblich. Darüber hinaus war mit steigendem Alter zu beobachten, dass sich naive und Gedächtnis-B-Zellen zunehmend voneinander absetzten und schließlich distinkte Cluster bildeten. Das Aufsplitten in zwei Cluster begann im dreijährigen Spender und schien im zehnjährigen Spender abgeschlossen zu sein. Ab dieser Altersstufe war kein weiterer Unterschied zu dem 20-jährigen und 30-jährigen Spender zu beobachten (Abbildung 6).



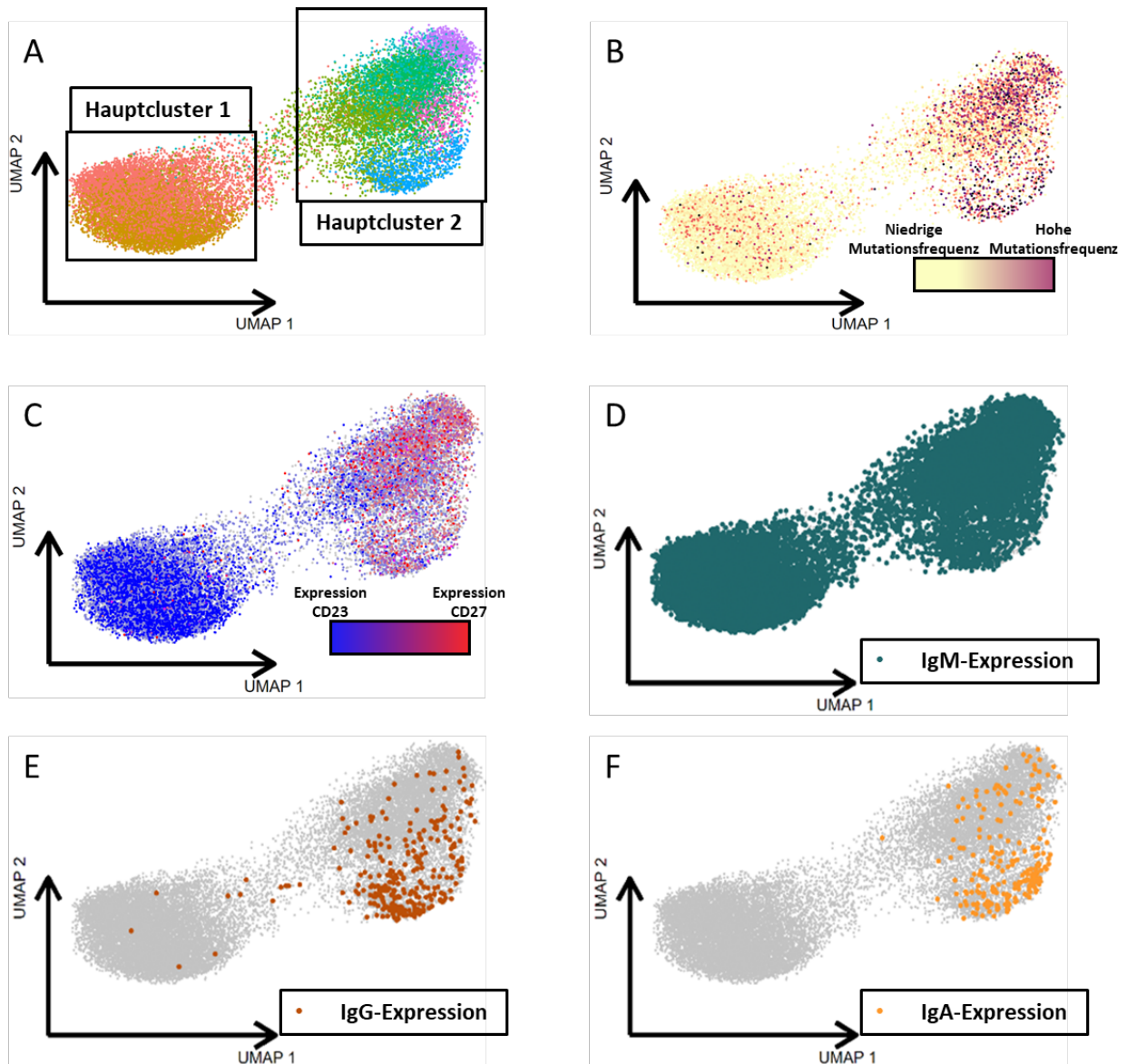
**Abbildung 6: Einzelzellanalyse der Genexpression von sieben verschiedenen Spenden im Alter von null bis 30 Jahren**

UMAP-Darstellung der Einzelzellanalyse der Genexpression von sortierten humanen B-Zellen im Alter von null, zwei, drei, sieben, zehn, 20 und 30 Jahren aus UCB bzw. peripherem Blut. Generiert wurden die Datensätze über die *10x Genomics* Plattform. Die Analyse der Daten erfolgte bioinformatisch in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus. Für die Analyse wurde R mit der Erweiterung *Seurat* verwendet. Pro Donor sind mind. 2.500 Zellen dargestellt. Pro Zelle wurden mind. 1.500 Gene analysiert. Das Clustering erfolgte *unsupervised*. Annotiert wurden die Daten mit Referenzdatensätzen und *SingleR*. Gelb = naive B-Zellen; Orange = nicht-klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen; Blau = klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen.

Diese erste UMAP-Analyse war *unsupervised*, und erfolgte separat für jeden Spender. Daher war es nicht möglich, potenzielle sich überlappende Signaturen zwischen den einzelnen Spendern zu analysieren. Aus diesem Grund wurden für eine interindividuelle, vergleichende Analyse einzelner Zellen und Zellpopulationen die Genexpressionsprofile der Einzelzell Datensätze über alle Altersstufen hinweg integriert. Für diese Integration sollten gezielt (*supervised*) solche Gene verwendet werden, die die typischen Signaturen von naiven und Gedächtnis-B-Zellen aus erwachsenen Spendern umfassen.

### 3.3 Integrierte Einzelzellanalyse der Genexpression humaner B-Lymphozyten im Altersverlauf

Die *supervised* Analyse der integrierten Einzelzelldaten mit den Top 2.000 differentiell exprimierten Genen zwischen adulten naiven und Gedächtnis-B-Zellen ergab einen Datensatz von über 15.000 Einzelzellen. In der UMAP-Darstellung zeigten sich zwei dominante Cluster, die jeweils in mehrere weitere Subcluster unterteilt werden konnten (Abbildung 7A). Im weiteren Verlauf wird das übergeordnete Cluster unten links als Hauptcluster 1 und das übergeordnete Cluster oben rechts als Hauptcluster 2 bezeichnet. Für eine genauere Charakterisierung beider Hauptcluster wurde die Mutationsfrequenz der V-Gene der zu den Hauptclustern zugeteilten Zellen bestimmt. Hierbei ergab sich, dass die Mutationsfrequenz in Hauptcluster 2 weitaus höher war als in Hauptcluster 1 (Abbildung 7B). Anschließend wurde die Ausprägung typischer B-Zell-Marker innerhalb beider Hauptcluster untersucht. Die Expression des Gedächtnis-B-Zellmarkers CD27 konzentrierte sich überwiegend auf Zellen mit stärker mutierten V-Genen (Hauptcluster 2) und CD23, ein Marker für naive B-Zellen, war überwiegend in Zellen aus Hauptcluster 1 ausgeprägt (Abbildung 7C). Zusätzlich zu Mutationsfrequenz und Ausprägung charakteristischer Marker wurde in einem weiteren Schritt die Verteilung der Isotypen der einzelnen Zellen innerhalb des integrierten Datensatzes untersucht. Hierbei war zu beobachten, dass sich IgM-ausprägende Zellen homogen über beide Hauptcluster hinweg verteilten (Abbildung 7D). Klassengewechselte Zellen, welche IgG bzw. IgA exprimierten, waren vornehmlich in Hauptcluster 2 lokalisiert. (Abbildung 7E und F).



**Abbildung 7: Integrierte Analyse von acht Einzelzell-RNA-Profilen von Spendern im Alter von null bis 30 Jahren.**

Darstellung der Genexpressionsanalyse des integrierten Datensatzes. (A) Acht integrierte Einzelzell-RNA-Profile als UMAP mit über 15.000 Einzelzellen. Für die Integration wurden Datensätze von zwei Neugeborenen und jeweils einem zweijährigen, dreijährigen, siebenjährigem, zehnjährigem, 20-jährigen und einem 30-jährigen Spender verwendet. Die Datensätze wurden über die *10x Genomics* Plattform generiert. Analysiert wurden die Daten mit R mit der Erweiterung Seurat. Die Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus. Die Integration der Daten erfolgte anhand der Top 2.000 differentiell exprimierten Gene zwischen Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen. Hauptcluster 1 enthielt zwei Subcluster. Hauptcluster 2 enthielt sechs Subcluster. (B) Mutationsfrequenz der V-Gene von B-Zellen innerhalb der integrierten Cluster. (C) Expressionsmuster vom naiven B-Zellmarker CD23 (blau) und vom Gedächtnis-B-Zellmarker CD27 (rot) innerhalb des integrierten Datensatzes. (D) Muster der IgM-Expression innerhalb des integrierten Datensatzes. (E) Muster der IgG-Expression innerhalb des integrierten Datensatzes. (F) Muster der IgA-Expression innerhalb des integrierten Datensatzes.



Anhand der oben aufgeführten Charakteristika wurde geschlussfolgert, dass Zellen in Hauptcluster 1 eine naive B-Zell-Signatur und Zellen in Hauptcluster 2 eine Gedächtnis-B-Zellsignatur aufwiesen. Im weiteren Verlauf wurden die beiden Hauptcluster als „naive“ und „Gedächtnis-B-Zellen“ bezeichnet. Darüber hinaus war zu beobachten, dass sich das naive Hauptcluster in zwei Subcluster und das Gedächtnis-Hauptcluster in insgesamt sechs einzelne Subcluster unterteilte.

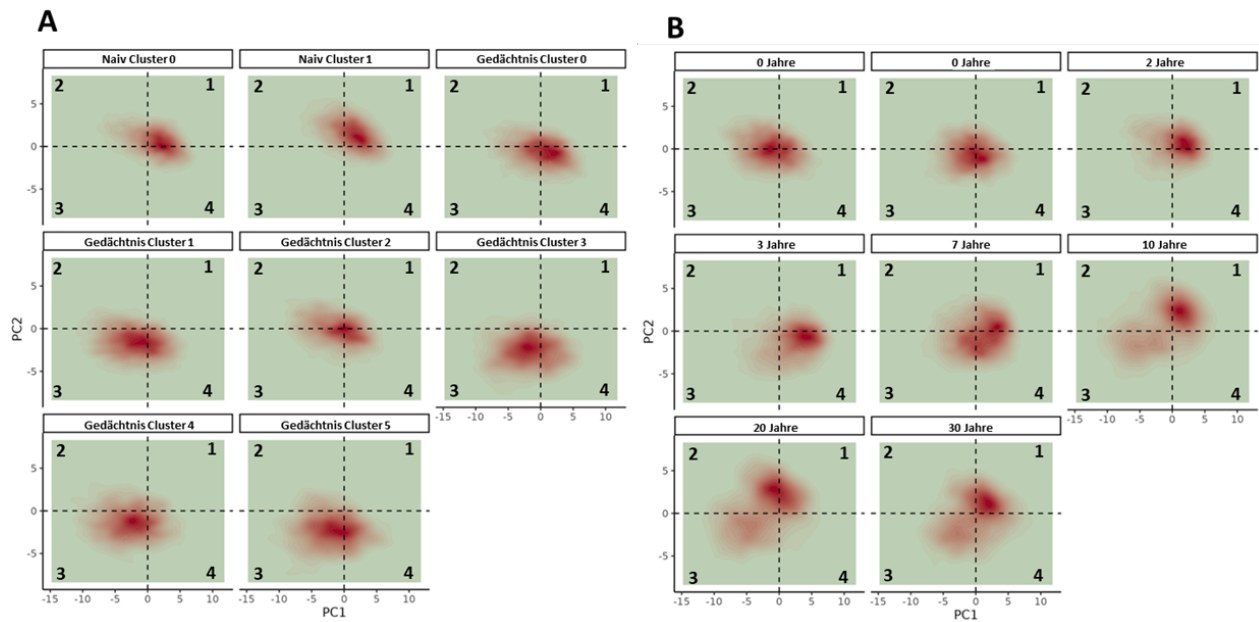
Für erste Charakterisierungen der Altersstufen und Subcluster und zur Validierung der durch die integrierte Analyse (Abbildung 7) gewonnen Erkenntnisse wurde eine *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA) mit ausgewählten *Genesets*, die zwischen naiven B-Zellen, klassengewechselten und nicht-klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmablasten und Plasmazellen unterscheiden sollten, durchgeführt. Mit den ausgesuchten *Genesets* wurden *Principal Component Analysen* (PCAs) durchgeführt. Dadurch sollte aufgezeigt werden, wie sehr sich Zellen einzelner Subcluster bzw. Altersstufen anhand charakteristischer Genmuster (In diesem Fall: Naive B-Zellen gegen Gedächtnis-B-Zellen) unterscheiden lassen.

Diese Analyse ergab, dass Zellen aus den zwei naiven Subclustern (0 und 1) ähnliche Verteilungen in der PCA zeigten und sich im 1. Quadranten konzentrierten (Abbildung 8A). Bei den sechs Gedächtnis-Subclustern (0 bis 5) zeigte sich ein heterogeneres Bild: Subcluster 0 und 2 zeigten keine gewichtete Verteilung. Subcluster 1, 3, 4 und 5 wurden überwiegend dem 3. Quadranten zugewiesen (Abbildung 8A). Insofern schienen sich im 1. Quadranten naive und im 3. Gedächtnis-B-Zellen zu konzentrieren.

Die PCA der einzelnen Altersstufen zeigte bei Neugeborenen ein uneindeutiges Bild. Zellen aus dieser Altersgruppe konnten keinem Quadranten eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 8B). Insofern war es nicht möglich, naive neonatale B-Zellen durch adulte *Genesets* abzubilden. Im zweijährigen und dreijährigen Spender zeigten sich Polarisierungen auf einzelne Quadranten. Mit zunehmendem Alter teilte sich die Gesamtpopulation in zwei Teilpopulationen auf (Abbildung 8B).

Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor durchgeführten Analysen. Es konnte validiert werden, dass naive und Gedächtnis-Cluster auch durch GSEAs und PCAs als solche erkannt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass UCB-B-Zellen eine

Signatur unabhängig von konventionellen naiven oder Gedächtnis-B-Zellen aufweisen und mit zunehmendem Alter ausdifferenzieren.



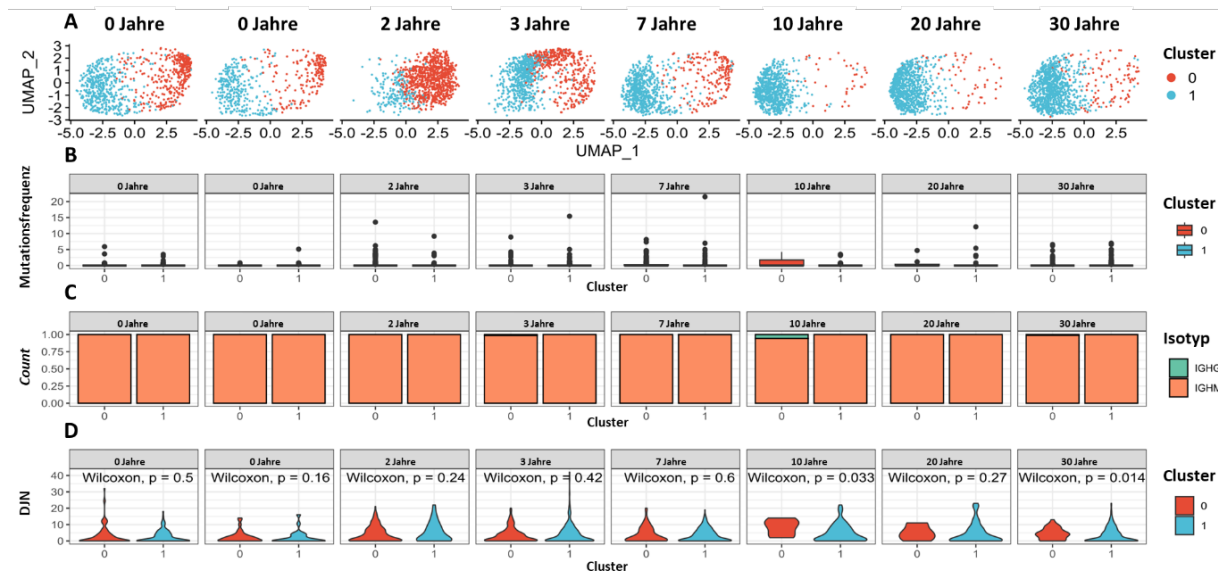
**Abbildung 8: Einzelzell-GSEA von acht integrierten Einzelzellprofilen**

Dargestellt ist die PCA der GSEA aller Spender aufgeteilt nach Clustern (A) und Alter (B). Jeder Punkt innerhalb der PCA stellt einen *Enrichmentscore* der ausgewählten *Genesets* dar. Die ausgewählten *Genesets* (Anhang) sollten zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmablasten und Plasmazellen und einigen anderen Parametern unterscheiden. Die Analyse erfolgte mit der R-Erweiterung *escape* und in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Für die weitere Analyse wurden alle Zellen der naiven und Gedächtnis-Hauptcluster ihren ursprünglichen Spendern zugewiesen. So war es möglich, eine altersabhängige Dynamik beider Hauptcluster zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die den Hauptclustern zugehörigen Subcluster weiter untersucht werden.

### 3.3.1 Analyse von naiven B-Zellen im Altersverlauf

Für die Analyse naiver B-Zellen über alle Altersstufen hinweg wurde die Genexpression, die Mutationsfrequenz der V-Gene, der Isotyp sowie die Anzahl der N-Nukleotide der einzelnen Subcluster bzw. Zellpopulationen untersucht. B-Zellen aus dem naiven Hauptcluster teilten sich in zwei transkriptionell distinkte Subpopulationen. Bei der Untersuchung der relativen Häufigkeit dieser Populationen zeigten sich im Altersverlauf große Unterschiede. Neugeborene und Kleinkinder bis zur Altersstufe von drei Jahren zeigten bei einer UMAP zwei dominante Populationen bzw. Cluster. Der relative Anteil einer dieser zwei Populationen (Cluster 0) nahm im siebenjährigen Spender ab. Diese Abnahme verstärkt sich im weiteren Altersverlauf, sodass ab der Altersstufe von zehn Jahren kaum noch Zellen existieren, die Cluster 0 zugeordnet werden konnten. Bei den 20- und 30-jährigen Spendern sind zu Cluster 0 zugehörige Zellen ebenfalls kaum existent. Die Größe der Zellpopulation aus Cluster 1 bleibt über Altersstufen hinweg stabil (Abbildung 9A). Die Mutationsfrequenzen der V-Gene lagen bei allen naiven Subclustern bzw. den zugehörigen B-Zellen über alle Altersstufen hinweg nahezu bei null (Abbildung 9B). Nur vereinzelte Zellen aus Zellpopulationen waren klassengewechselt (Abbildung 9C). Bei der Analyse der N-Nukleotide zeigten sich nur marginale Unterschiede zwischen den beiden naiven Subclustern aller Altersstufen (Abbildung 9D).



**Abbildung 9: Integrierte Analyse der als naiv annotierten B-Zellen vom Neugeborenen bis zum adulten Spender**

Für die Analyse der in der integrierten Analyse als naive annotierte B-Zellen wurden für eine quantitative Vergleichbarkeit der einzelnen Altersstufen pro Spender zufällig 1.000 Zellen ausgewählt. Analysiert wurden Einzelzell-RNA-Profile verschiedener Altersstufen in UMAP-Darstellungen (A), die Mutationsfrequenzen der Zellen in ihren jeweiligen Clustern (B), der relative Anteil der Isotypen der Zellen in den jeweiligen Clustern (C) sowie die Anzahl der N-Nukleotide zwischen dem D- und J-Genfragment (D). Cluster 0 = rot; Cluster 1 = blau; IGHM = orange; IGHG = grün. Die Analyse erfolgte mit der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

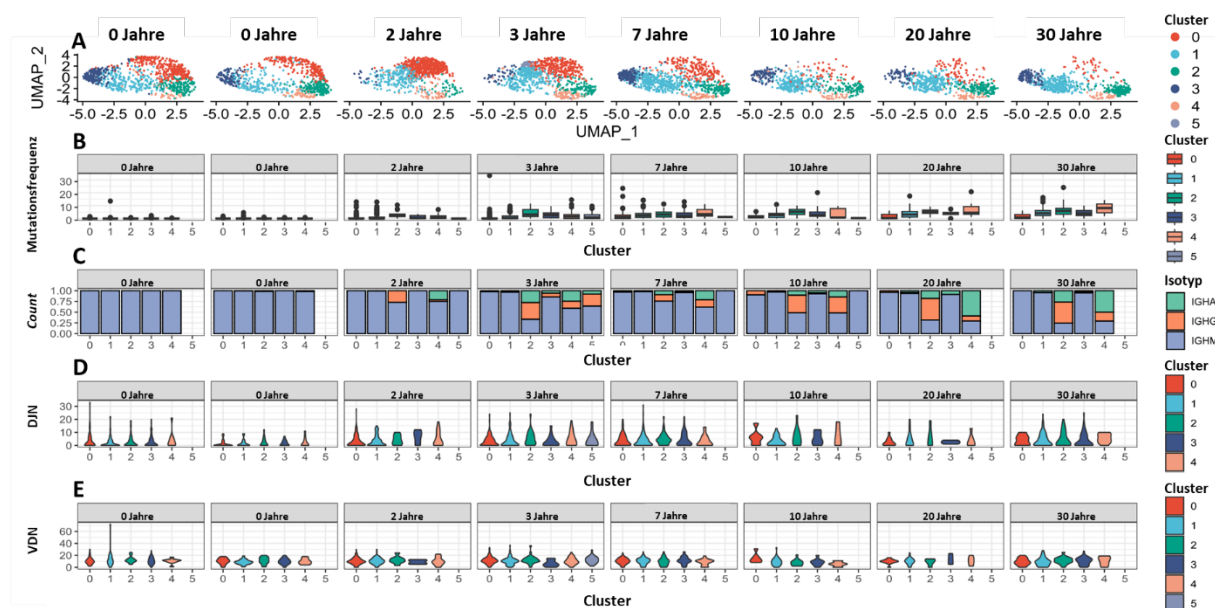
Zusammenfassend zeigte sich, dass UCB-B-Zellen und adulte PB-B-Zellen unterschiedliche Zusammensetzungen an naiven Zellpopulationen hatten. So besaßen jüngere Spender eine Zellpopulation (Cluster 0), die in adulten kaum mehr vorhanden war.

Neben den als naiv annotierten B-Zellen sollten zusätzlich die als Gedächtnis-B-Zellen annotierten Zellen untersucht werden.

### 3.3.2 Analyse von Gedächtnis-B-Zellen im Altersverlauf

Für die Analyse von Gedächtnis-B-Zellen wurden Genexpression, Mutationsfrequenz der V-Gene, Isotyp sowie die Anzahl der N-Nukleotide der einzelnen Subcluster bzw. Zellpopulationen über alle Altersstufen hinweg untersucht. Auf Ebene der Genexpression konnten sechs unterschiedliche Zellpopulationen unterschieden werden. Entgegen früheren Publikationen zeigte sich, dass bereits in Neugeborenen und Kleinkindern Zellen in hoher Zahl vorhanden sind, deren Ausprägung von Genen eine stärkere Gedächtnis- als naive B-Zell-Signatur aufweisen. Einzelne UMAPs über die verschiedenen Altersstufen hinweg zeigten, dass die relative Häufigkeit einzelner Cluster eine unterschiedliche Zusammensetzung abhängig vom Alter aufwies. So war bei den Neugeborenen sowie den zwei- und dreijährigen Spendern die zu Cluster 0 (rot) zugehörige Zellpopulation besonders stark vertreten. Im siebenjährigen Spender schien sich die Zusammensetzung der Cluster zu verändern. Ab dieser Altersstufe war eine beginnende Abnahme von Cluster 0 zu beobachten. Der Trend der Abnahme verstärkt sich in den nachfolgenden Altersstufen. Ab einem Alter von zehn Jahren veränderte sich die Zusammensetzung der Cluster nicht mehr. Cluster 0 war hier kaum vorhanden (Abbildung 10A). Cluster 5 war in neonatalen Spendern sowie im 20- und 30-jährigen Spendern nicht detektierbar (Abbildung 10A). Bei der Analyse der Mutationsfrequenz der V-Gene von B-Zellen zeigten beide neonatale Spender sehr niedrige Mutationsfrequenzen. Die V-Gene des zweijährigen Spenders zeigten eine leicht erhöhte Mutationsfrequenz. Diese erhöhte sich weiter im drei- und siebenjährigen Spender. Vermehrte Mutationen waren hier bei Cluster 2 und 4 beobachtbar. Auch bei der Analyse von Gedächtnis-B-Zell-Populationen stellte die Altersstufe von zehn Jahren die Transition zu einem „adulten“ B-Zell-Immunsystem dar. So waren die Mutationsfrequenzen der V-Gene beim zehnjährigen Spender ähnlich zu den 20- und 30-jährigen Spendern. Die höchsten Mutationsfrequenzen zeigten sich hier in Cluster 2 und Cluster 4. (Abbildung 10B). Alle Zellen der neonatalen Spendern exprimierten erwartungsgemäß ausschließlich IgM. Im zweijährigen Spender waren die zu den Clustern 0, 1, 3 und 5 gehörenden Zellen nicht klassengewechselt. In Cluster 2 und Cluster 4 zeigten einige Zellen Klassenwechsel. Beim dreijährigen Spender erhöhte sich der Anteil von klassengewechselten Zellen weiter. Nur Cluster 0, 1 und 3 zeigten durchgehend keinen oder kaum Klassenwechsel. Bei den Altersstufen von sieben, zehn, 20 und 30 Jahren zeigten sich erneut

hauptsächlich in Cluster 2 und 4 klassengewechselte Zellen. Der Anteil klassengewechselter Zellen lag hier teilweise bei über 70% (Abbildung 10C). Das mit dem Alter abnehmende Cluster 0 wies bei allen Altersstufen eine durchgehend niedrige Mutationsrate auf (Abbildungen 10B). Bei der Anzahl der N-Nukleotide zeigte sich, dass sich deren Anzahl mit dem Alter sukzessive erhöhte. Hierbei waren zwischen V- und D-Gensegmenten mehr N-Nukleotide vorhanden als bei D- und J-Gensegmenten (Abbildungen 10D und E).

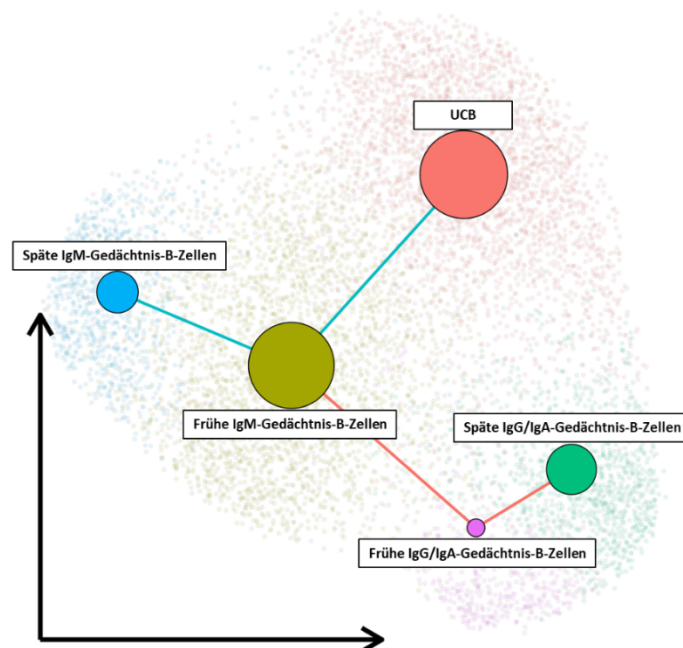


**Abbildung 10: Analyse der als Gedächtnis-B-Zellen annotierten integrierten B-Zellen vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen**

Für die Analyse der in der integrierten Analyse als Gedächtnis-B-Zellen annotierten Zellen wurden für eine quantitative Vergleichbarkeit der einzelnen Altersstufen pro Donor zufällig 1.000 Zellen ausgewählt. Dargestellt sind Einzelzell-RNA-Profile verschiedener Altersstufen in UMAP-Darstellungen (A), die Mutationsfrequenzen der V-Gene der Zellen in ihren jeweiligen Clustern (B), die Isotypen der Zellen in den jeweiligen Clustern (C) sowie die Anzahl der N-Nukleotide zwischen dem D- und J-Genfragment (D) und dem V- und D-Genfragment (E). Cluster 0 = rot; Cluster 1 = hellblau; Cluster 2 = grün; Cluster 3 = dunkelblau; Cluster 4 = rosa; Cluster 5 = violett; IGHM = orange; IGHG = grün. Die Analyse erfolgte mit der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Es wurde eine *Trajectory*-Analyse mit der R-Erweiterung *Slingshot* zwischen den einzelnen Gedächtnis-Clustern durchgeführt. Durch solche Untersuchungen ist es möglich, *Pseudotime*-Analysen zwischen verschiedenen Clustern zu erstellen (Street et al. 2018), d.h. eine putative Entwicklung oder Differenzierung zwischen einzelnen B-Zell-Populationen bzw. Clustern aufzuzeigen.

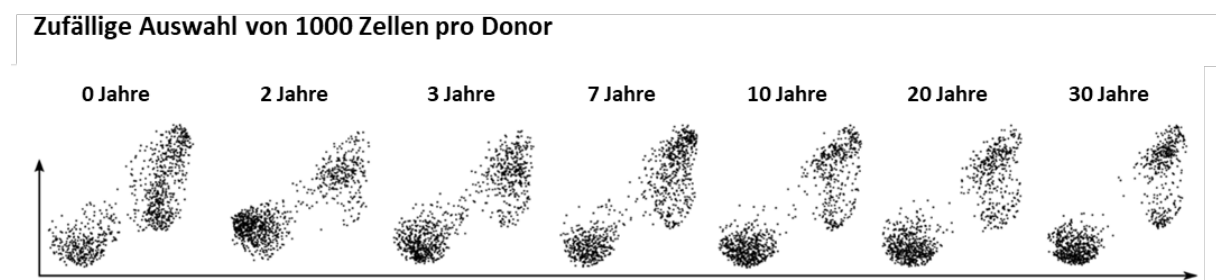
Das bei UCB-B-Zellen und den B-Zellen im zwei- und dreijährigen Spender dominante und bei allen Altersstufen nicht mutierte Cluster 0 wurde als Startpunkt gewählt. Die Analyse zeigte, dass Zellen aus Cluster 0 zuerst zu Cluster 1 differenzierten, welche als frühe IgM-Gedächtnis-B-Zellen annotiert wurden (Abbildung 11). Anschließend zweigte sich die Zellpopulation aus Cluster 1 in Cluster 3 und Cluster 4 auf. Zellen aus Cluster 3 zeigten keinen Klassenwechsel aber eine erhöhte Ig-Mutationsfrequenz und wurden als affinitätsgereifte („späte“) IgM-Gedächtnis-B-Zellen annotiert (Abbildung 11). Zellen aus Cluster 4 zeigten sowohl Klassenwechsel als auch hohe Mutationsfrequenzen und wurden als „frühe“ klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen identifiziert (Abbildung 11). Von dieser Differenzierungsstufe entwickelten sich Zellen zur Population aus Cluster 2. Dieses beinhaltete ebenfalls stark mutierte und klassengewechselte Zellen, welche als später klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen annotiert wurden (Abbildung 11). Demzufolge ließ sich mit Cluster 0 als Startpunkt eine sinnvolle und kohärente Differenzierungslinie darstellen.



**Abbildung 11: Trajectory-Analyse der als Gedächtnis-B-Zellen annotierten B-Zellen**

Für die *Trajectory*-Analyse wurde die R-Erweiterung *Slingshot* verwendet. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung). Das in Neugeborenen dominante Cluster 0 wurde als Startpunkt gewählt. Jedes Cluster stellt einen weiteren Differenzierungsschritt dar. Cluster 0 = UCB; Cluster 1 = IgM „früh“; Cluster 3 = IgM „spät“; Cluster 4 = IgG/IgA „früh“, Cluster 2 = IgG/IgA „spät“.

Für die Bestimmung des Anteils von Gedächtnis-B-Zell-Populationen am Gesamt-B-Zell-Pool wurden pro Spender zufällig 1000 Zellen ausgewählt. Anschließend wurde nachverfolgt, zu welchem der beiden Hauptcluster die ausgewählten Zellen zugehörig waren. Hierbei zeigte sich, dass bereits in Neugeborenen ca. die Hälfte aller B-Zellen als Gedächtnis-B-Zellen annotierte wurden. In den Altersstufen von null bis sieben Jahren ist außerdem zu beobachten, dass beide Hauptcluster nicht strikt voneinander getrennt sind. Erst ab dem zehnjährigen Spender wird eine deutlichere Trennung sichtbar (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Anteil von Gedächtnis-B-Zellen am Gesamt-B-Zell-Pool**

Verteilung von 1000 zufällig ausgewählten Zellen pro Spender im integrierten Datensatz. Das untere linke Cluster besteht aus naiven B-Zellen und das Cluster oben rechts aus Gedächtnis-B-Zellen.

Zusammenfassend waren Zellen aus dem Gedächtnis-Hauptcluster altersabhängigen Dynamiken unterworfen. Überraschenderweise zeigten sich in Neugeborenen Spendern ebenfalls Zellen, die anhand ihrer Gensignaturen Gedächtnis-B-Zell-Clustern zugeordnet werden konnten. Durch *Trajectory*-Analysen konnten sinnvolle Differenzierungslinien nachvollzogen werden. Der Anteil von Gedächtnis-B-Zellen lag auch bei Neugeborenen bei ca. 50%. In nachfolgenden Analysen werden die als naive und Gedächtnis-B-Zellen annotierten B-Zellen in Neugeborenen als putative naive und Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet.

Für detailliertere Charakterisierungen der einzelnen Populationen erfolgten epigenetische Untersuchungen auf Einzelzellebene.



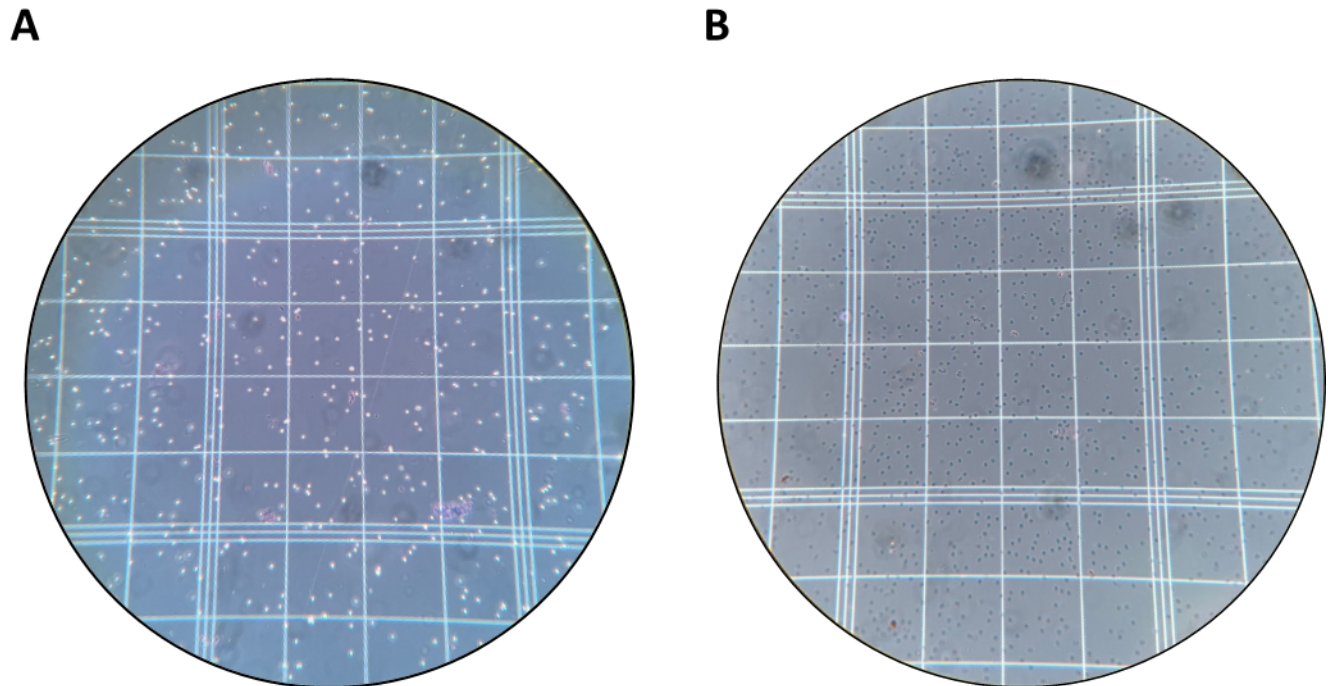
## 3.4 Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten PB-B-Zellen und UCB-B-Zellen

Für eine unabhängige molekulare Validierung der identifizierten naiven und Gedächtnis-B-Zell-Cluster, bzw. für eine Beurteilung zu welchem Grad einzelne Cluster epigenetisch verwandt sind, wurden epigenetische Analysen auf Einzelzellebene mittels Einzelzell-ATAC-Sequenzierung (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin*) durchgeführt. Epigenetische Profile sind stabiler als Genexpressionsanalysen und erlauben daher eine Beurteilung, ob bestimmte Expressionsprofile z.B. durch temporäre Stimulierung oder durch eine langfristige (irreversible) Reprogrammierung in vergangenen Immunantworten hervorgerufen wurden.

Für die Analysen wurde das *Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression* Kit von *10x Genomics* verwendet. Dabei werden Informationen zur Genexpression im Zellkern mit epigenetischen Informationen (DNA-Zugänglichkeit im Chromatin) einer Einzelzelle kombiniert. Hierfür musste die Zellmembran aufgeschlossen und die Zellkerne isoliert werden. Nachfolgend dargestellt ist eine repräsentative Kernisolierung samt Qualitätskontrolle sowie erste Analysen der sequenzierten Bibliotheken in Form von UMAPs. Für die Analyse wurden B-Zellen aus insgesamt vier Spendern verwendet, zweimal Nabelschnurblut sowie zweimal B-Zellen aus peripherem Blut von einem 30-jährigem und einem 33-jährigem Spender.

### 3.4.1 Etablierung von Nuklei-Isolierungen

Vor Durchführung des Protokolls wurden CD19<sup>+</sup> B-Zellen durch MACS angereichert. Ein Anteil der Zellen wurde ohne Lyse mit Trypanblau gefärbt und fungierte als Negativkontrolle (Abbildung 13A). Im Beispiel für eine lysierte Probe (Abbildung 13b) sind kaum ungefärbte Zellkerne zu beobachten. Der Anteil lysierter Zellen lag hier bei nahezu 100%.



**Abbildung 13: Lichtmikroskopische Beurteilung der Zell-Lyse-Effizienz**

Repräsentative Trypanblaufärbung von CD19<sup>+</sup> Zellen. Zustand vor der Lyse (Negativkontrolle) mit intakter Zellmembran und ungefärbtem Zytoplasma (A). Trypanblaufärbung nach der Lyse mit perforierter Zellmembran (B).

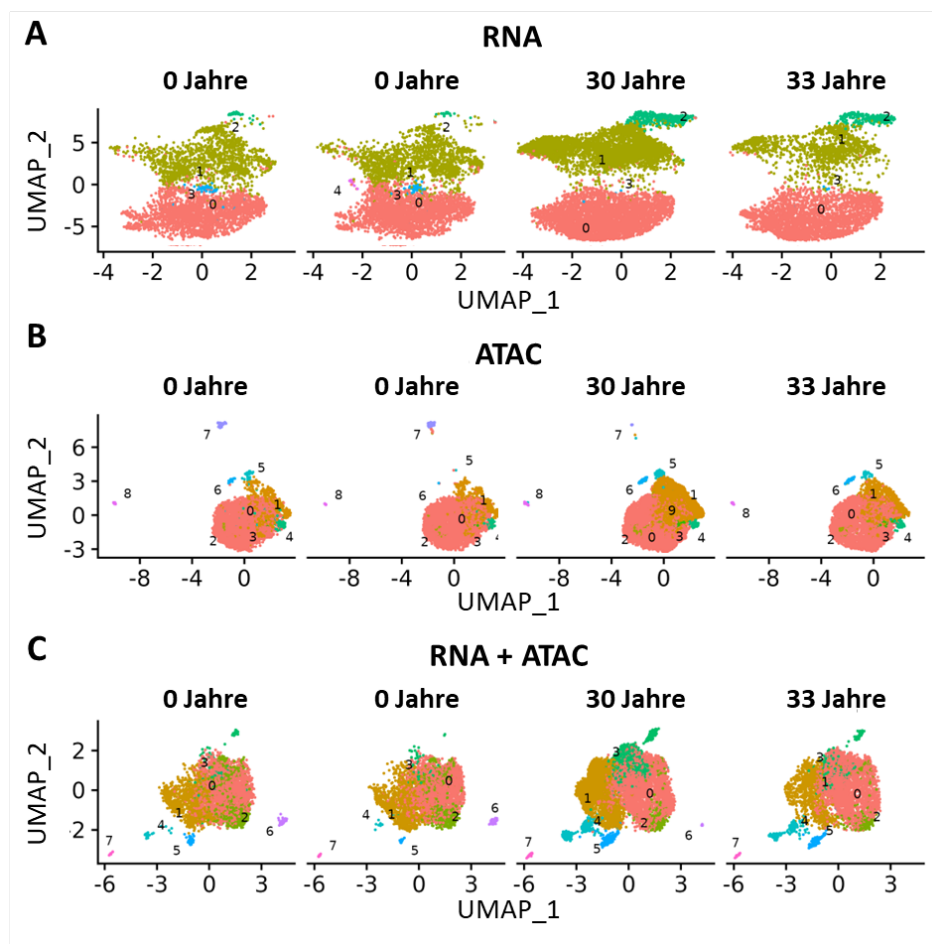
Es wurden nur solche Proben aus UCB- und adultem PB für die Generierung der Bibliotheken verwendet, bei denen der Anteil lysierter Zellen bei mindestens 70% lag.

### 3.4.2 Epigenetische Einzelzellanalysen

Für epigenetische Einzelzellanalysen wurden die zu den verschiedenen Spendern zugehörigen Datensätze erneut integriert. Hierbei zeigte sich, dass auch das Genexpressionsprofil im Zellkern zu zwei distinkten Subclustern führte. Cluster 0 (rot) konnte als naives und Cluster 1 (gelb) als Gedächtnis-Cluster identifiziert werden. Zwischen den verschiedenen Altersstufen war Cluster 2 (grün) in Erwachsenen stärker ausgeprägt und Cluster 3 (blau) in Neugeborenen (Abbildung 14A). Bei der Analyse der Chromatinzugänglichkeit (ATAC) zeigte sich ein homogenes Bild mit zwei dominanten Hauptclustern (0 und 1). Zusätzlich zeigten sich hier mehrere kleinere Subcluster, die in der UMAP-Darstellung teilweise weit entfernt von den dominierenden Clustern waren. Starke altersabhängige Unterschiede waren nicht beobachtbar (Abbildung 14B). Bei der Kombination der Information von Kern-RNA und Chromatinzugänglichkeit zeigten sich leichte altersabhängige Unterschiede. Es

konnten erneut zwei dominierende Hauptcluster in allen Altersstufen unterschieden werden. Jedoch waren bei adulten Spendern mehrere zusätzliche Cluster (3, 4 und 5) beobachtbar, die in Neugeborenen weniger stark ausgeprägt waren (Abbildung 14C).

Für eine tiefergehende Analyse wurden die putativen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Cluster getrennt voneinander untersucht. Erneut wurden hier Chromatinzugänglichkeit und die Kombination von Chromatinzugänglichkeit mit der Expression von Kern-RNA untersucht.

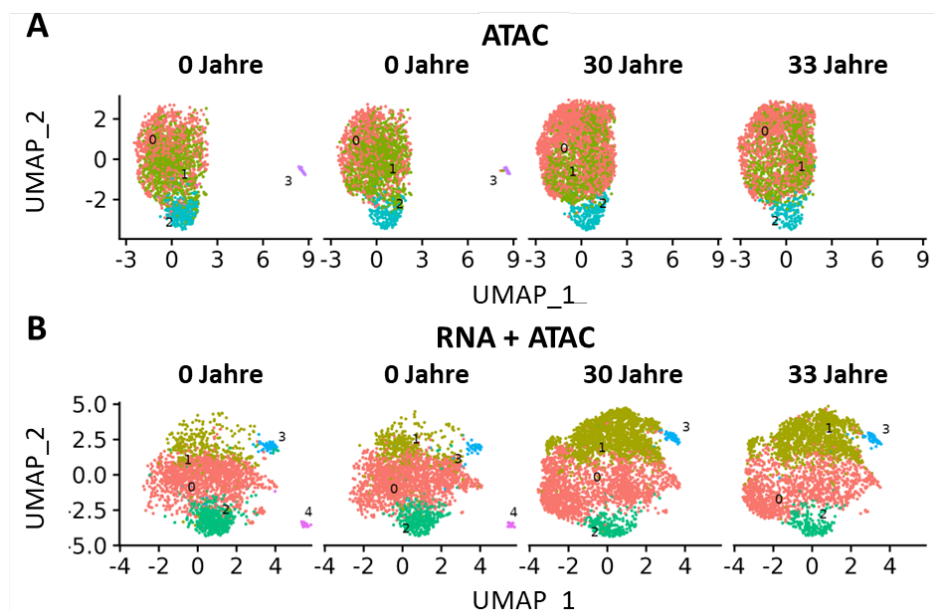


**Abbildung 14: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen B-Zellen**

Dargestellt sind jeweils drei UMAPs von vier Spendern (null Jahre, null Jahre, 30 Jahre, 33 Jahre) nach Integration. Analysiert wurden die Expression der Kern-RNA bei putativen naiven B-Zellen (Cluster 0) und putativen Gedächtnis B-Zellen (Cluster 1) (A), die Chromatinzugänglichkeit (ATAC) (B) sowie eine Kombination aus beidem (C). Als Ausgangsmaterial dienten Nuklei aus durch Magnet-aktivierte Zellsortierung angereicherten CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Die Analyse erfolgte mittels der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Putative naive B-Zellen teilten sich bei der Analyse der Chromatinzugänglichkeit in der UMAP-Darstellung in drei dominante Cluster auf. Cluster 0 (rot), Cluster 1 (gelb) und Cluster 2 (blau) bzw. die dazugehörigen B-Zell-Populationen zeigten in allen Spendern ein ähnliches Muster (Abbildung 15A). Bei der kombinierten Analyse von Chromatinzugänglichkeit und Expression von Kern-RNA konnten ebenfalls drei dominante Cluster unterschieden werden. Cluster 0 und 2 waren in allen Spendern gleich häufig. Cluster 1 war in Erwachsenen dominanter (Abbildung 15B).

Als nächster Schritt wurden putative Gedächtnis-B-Zellen aller Spender in Bezug auf ihre Chromatinzugänglichkeit sowie die Kombination dieser mit der Kern-RNA-Expression miteinander verglichen.

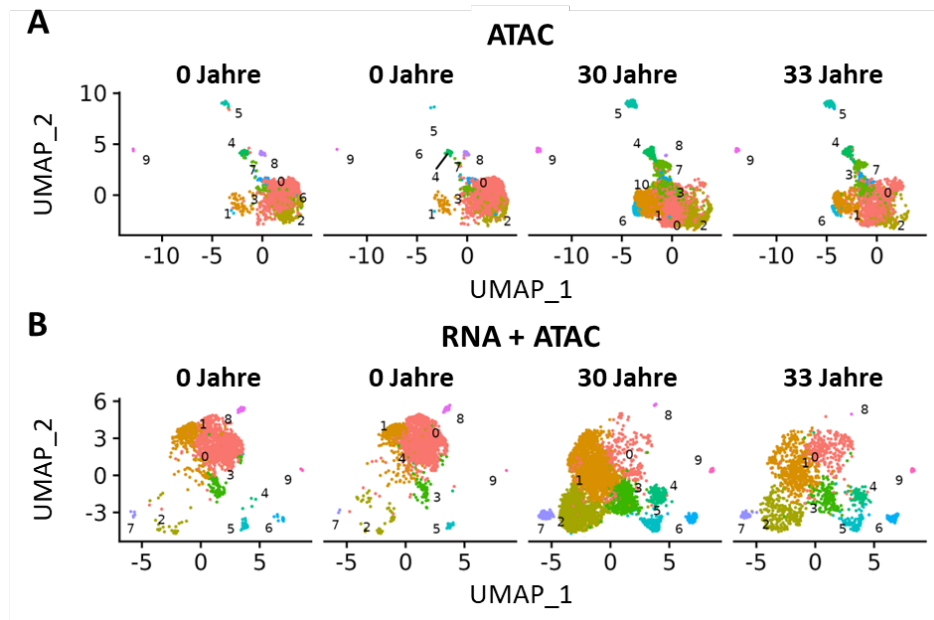


**Abbildung 15: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen putativen naiven B-Zellen**

Dargestellt sind jeweils zwei UMAPs von putativen naiven B-Zellen bei vier Spendern (null Jahre, null Jahre, 30 Jahre, 33 Jahre). Analysiert wurden die Chromatinzugänglichkeit (ATAC) (A) sowie eine Kombination aus Kern-RNA-Expression und Chromatinzugänglichkeit (B). Die Analyse erfolgte mittels der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Gedächtnis-B-Zell-Populationen zeigten über alle Altersstufen hinweg ein dominantes Cluster (0). In Erwachsenen Spendern war ein komplexes Muster an weiteren Clustern zu beobachten. Dieses Muster war in Ansätzen auch schon bei Neugeborenen Spendern vorhanden (Abbildung 16A). Bei der kombinierten Analyse zeigten sich starke altersabhängige Unterschiede. So lag bei Neugeborenen ein dominantes

Cluster vor und ein Muster an zusätzlichen Clustern war in Ansätzen zu beobachten. In den Erwachsenen zeigte sich hingegen ein komplexes und ausgeprägtes Muster mit vielen dominanten Clustern (Abbildung 16B).



**Abbildung 16: Epigenetische Einzelzellanalysen von adulten und neonatalen Gedächtnis-B-Zellen**

Dargestellt sind jeweils zwei UMAPs von vier Spendern (null Jahre, null Jahre, 30 Jahre, 33 Jahre). Analysiert wurden die Chromatinzugänglichkeit (ATAC) (A) sowie eine Kombination aus Kern-RNA-Expression und Chromatinzugänglichkeit (B) bei Gedächtnis-B-Zellen. Die Analyse erfolgte mittels der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich UCB-B-Zellen und adulte PB-B-Zellen auch auf epigenetischer Ebene unterscheiden. So zeigten sich Abweichungen im relativen Anteil von Clustern bei naiven Zellen. Große Unterschiede waren bei der kombinierten Analyse von Kern-RNA und Chromatinzugänglichkeit bei putativen Gedächtnis-B-Zellen zu beobachten.

Nach Charakterisierung putativer naiver und Gedächtnis-Populationen sollten funktionelle Versuche erfolgen. Dazu wurden die Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen beider Hauptcluster (naiv und Gedächtnis) ermittelt, so dass eine gezielte Anreicherung mittels FACS erfolgen konnte, um mögliche funktionelle Unterschiede *in vitro* bestimmen zu können. Hierbei wurde der Fokus auf putative naive und Gedächtnis-B-Zellen aus Neugeborenen gelegt.

## 3.5 Isolierung und funktionelle Studien einzelner B-Zell-Populationen

### 3.5.1 Isolierung von Clustern

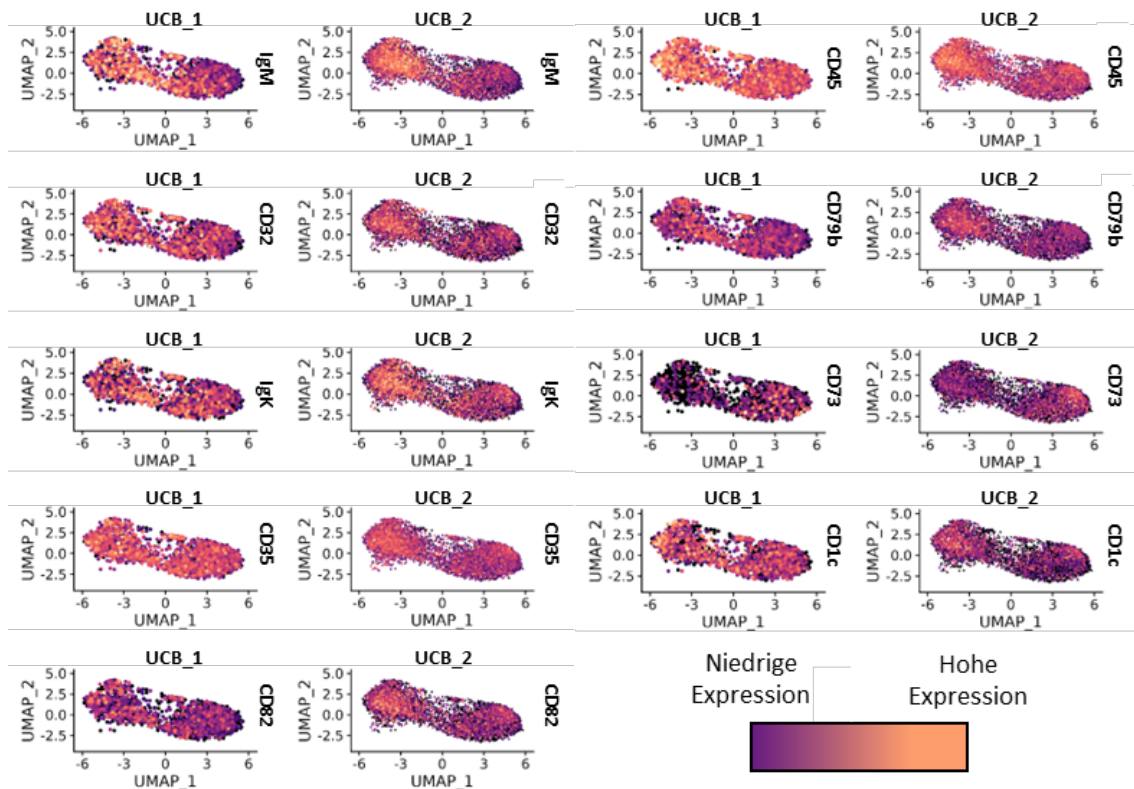
Aus Vorarbeiten war bekannt, dass B-Zellen aus Neugeborenen nicht die klassischen Oberflächenproteine ausprägen, die in adulten Menschen eine Unterscheidung von naiven und Gedächtnis-B-Zellen (z.B. CD23 und CD27) in der Durchflusszytometrie ermöglichen. Daher war es notwendig eine Isolierungsstrategie für putative neonatale naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen zu etablieren.

Für die Isolierung von putativen naiven oder Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen wurde das *Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit* zusammen mit dem *Chromium 5' Feature Barcode Kit* der *10x Genomics* Plattform verwendet und mit dem *TotalSeq™-C Human Universal Cocktail* von *Biolegend* kombiniert. Der *TotalSeq™-C Human Universal Cocktail* beinhaltet ein Gemisch aus Antikörpern, bei dem jede Spezifität mit definierten Nukleotidsequenzen konjugiert ist. So ist es möglich, die Information zur RNA-Expression einer Einzelzelle mit ihrem Profil von Oberflächenproteinen zu koppeln (CITE-seq). Nach Inkubation einer Probe mit dem Antikörpercocktail und der Generierung von Einzelzellbibliotheken ist es möglich, dass Muster der gebundenen Antikörper über deren definierte Nukleotidsequenz zu rekonstruieren. Auf diese Weise können individuelle Kombinationen an Oberflächenproteinen bestimmt werden, die eine Isolierung von bestimmten Zellpopulationen in einer Gesamtpopulation ermöglichen (Stoeckius et al. 2017). Über die Analyse von RNA-Profilen allein gestaltet sich die Isolierung von Populationen schwieriger, da Genexpressionsdaten nicht zwangsläufig mit der Ausprägung von Oberflächenproteinen korrelieren.

Für die Analyse der Muster von Oberflächenproteinen wurden sortierte reife B-Zellen (CD20<sup>+</sup>CD38<sup>int</sup>) zweier zusätzlicher UCB-Proben prozessiert und sequenziert. Anschließend wurden in einem ersten Schritt die Gesamtpopulation in putative naive und Gedächtnis-Cluster aufgetrennt. Anschließend wurden beide Cluster auf unterschiedliche Expression von Oberflächenproteinen hin untersucht.

In der Analyse zeigte sich, dass neonatale putative Gedächtnis-B-Zellen (Cluster oben links) in der UMAP gegenüber putativen naiven B-Zellen signifikant mehr IgM, IgK,

CD1c, CD32, CD35, CD45, CD79b und CD82 auf ihrer Oberfläche ausprägten. Putative naive B-Zellen (Cluster unten rechts) exprimierten signifikant mehr CD73 (Abbildung 17). Diese bioinformatische Analyse sollte experimentell durchflusszytometrisch validiert werden.



**Abbildung 17: Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen, die zwischen putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei UCB-B-Zellen unterscheiden.**

Dargestellt sind UMAPs der Einzelzell-RNA-Profile von reifen neonatalen B-Zellen aus jeweils zwei unterschiedlichen Nabelschnurblutspenden (UCB\_1 und UCB\_2) kombiniert mit der Expression von Oberflächenmolekülen, die zwischen putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen unterscheiden. Das Gedächtnis-Cluster war in der UMAP oben links und das naive Cluster unten rechts lokalisiert. Niedrige Expression = dunkel; Hohe Expression = hell. Die Analyse der Daten erfolgte mit der R-Erweiterung Seurat in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

Für die Validierung der in den Einzelzellexperimenten ermittelten Mustern an Oberflächenproteinen wurden durch MACS angereicherte CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus UCB und adultem PB durchflusszytometrisch ausgewertet. Adulte PB-B-Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Zur Validierung wurde die *Infinity Flow* Anwendung verwendet. Hierbei lässt sich durch überlappende durchflusszytometrische *Panels* und *Machine Learning* das Muster von Ko-Expressionen einer Vielzahl von Marker innerhalb eines

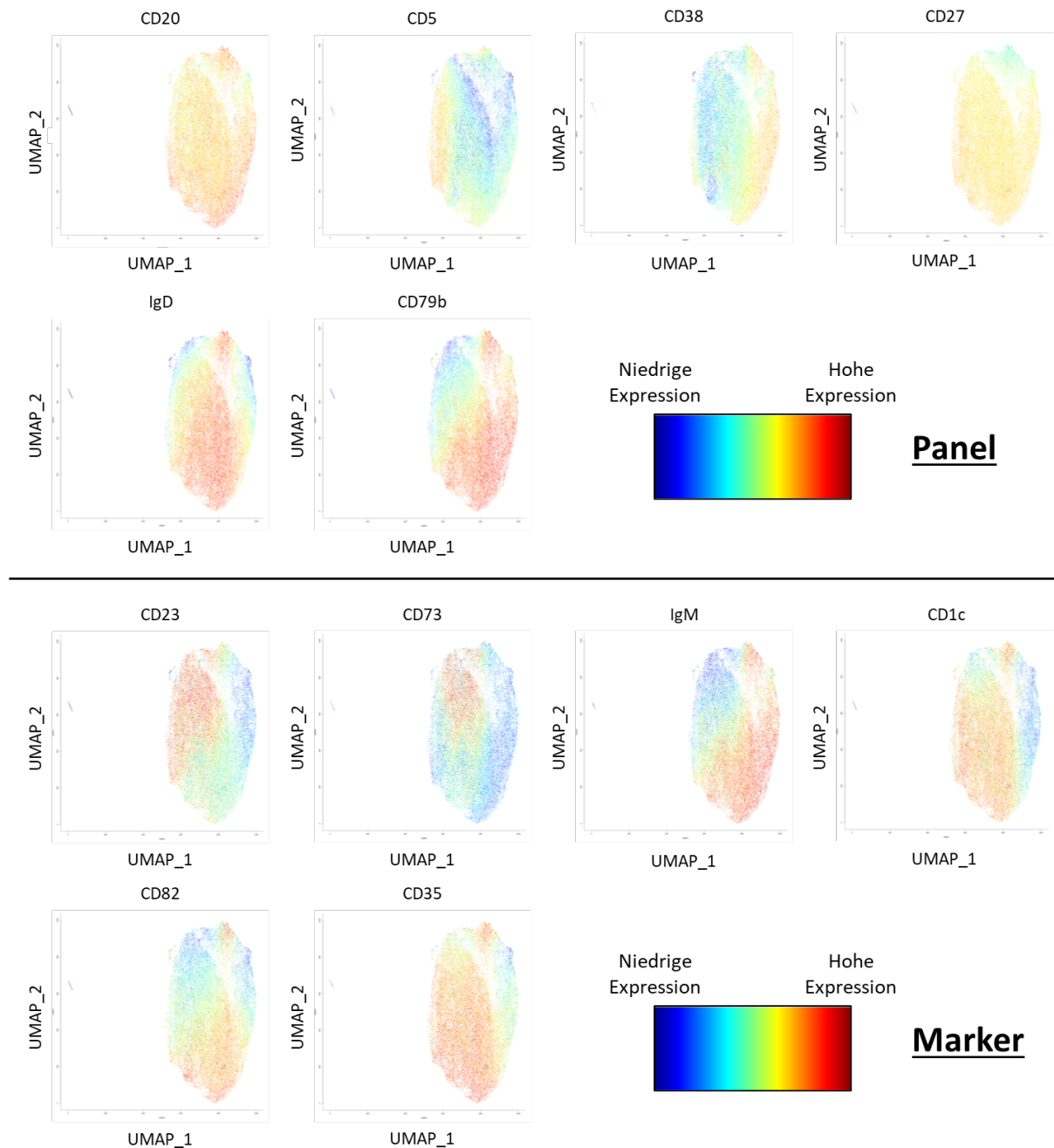
*Panels* ermitteln (Becht et al. 2021). Das *Panel* bestand aus Färbungen gegen CD20, CD5, CD38, CD27, IgD und CD79b. Innerhalb des *Panels* wurde die Ko-Expression der Marker CD23, CD73, IgM, CD1c, CD82 und CD35 bestimmt. *Panel* bzw. Marker setzten sich aus Oberflächenproteinen zusammen, die eine möglichst vielschichtige Auftrennung der Gesamtpopulation ermöglichen sollte (CD5, CD20, CD23, CD27, CD38 und IgD) und alle differentiell exprimierten Moleküle enthielt (CD1c, CD35, CD73, CD79b, CD82 und IgM). CD32, IgK und CD45 wurden aufgrund ihres in Testfärbungen indifferenten Expressionsmuster nicht weiter berücksichtigt (Daten nicht gezeigt). Für vergleichende Analysen wurden sowohl UCB-B-Zellen als auch adulte PB-B-Zellen gefärbt.

Durch die Anwendung von *Infinity Flow* wurden mit dem *Backbone Panel* UMAPs generiert. Die UMAPs der *Panel*-Färbungen bei neonatalen B-Zellen zeigten eine gleichmäßige Expression des pan-B-Zell-markers CD20. Zellen, die stark CD5 exprimierten, prägten kein oder nur wenig CD38 aus. CD27 war schwach über die gesamte Population hinweg ausgeprägt. Viele Zellen zeigten eine Ko-Expression von IgD und CD79b (Abbildung 18). Bei den eingesetzten Markern zeigte sich eine Ko-Expression des beschriebenen Naiven-Markers CD23 und des putativen Naiven-Markers CD73. Bei den putativen Gedächtnis-Markern zeigte sich eine Ko-Expression von CD79b, IgM und CD82. CD35 und CD1c neigten zur Ko-Expression mit IgD (Abbildung 18).

Es wurde gezeigt, dass die identifizierten Marker im Fall der putativen Gedächtnis-B-Zell-Population kohärent auf denselben Zellen Ko-exprimiert waren. Bei CD73, dem Marker für putative naive B-Zellen war eine Ko-Expression mit CD23, einem beschriebenen Marker für naive B-Zellen zu beobachten.



## Ergebnisse



**Abbildung 18: Infinity Flow Analyse von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellmarkern bei UCB-B-Zellen**

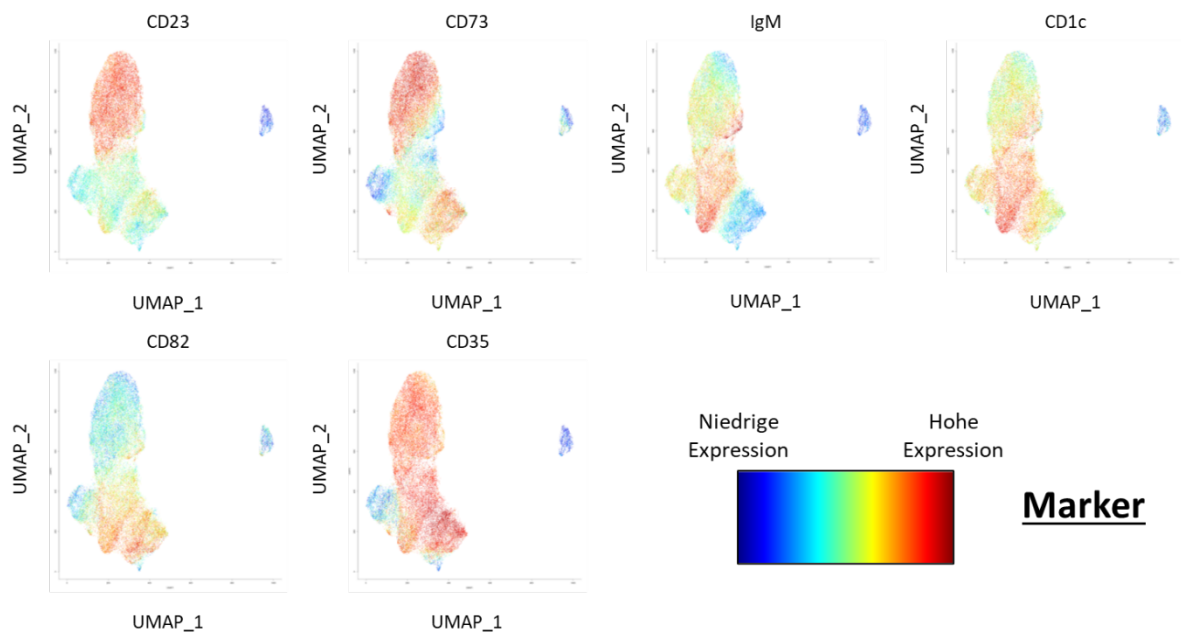
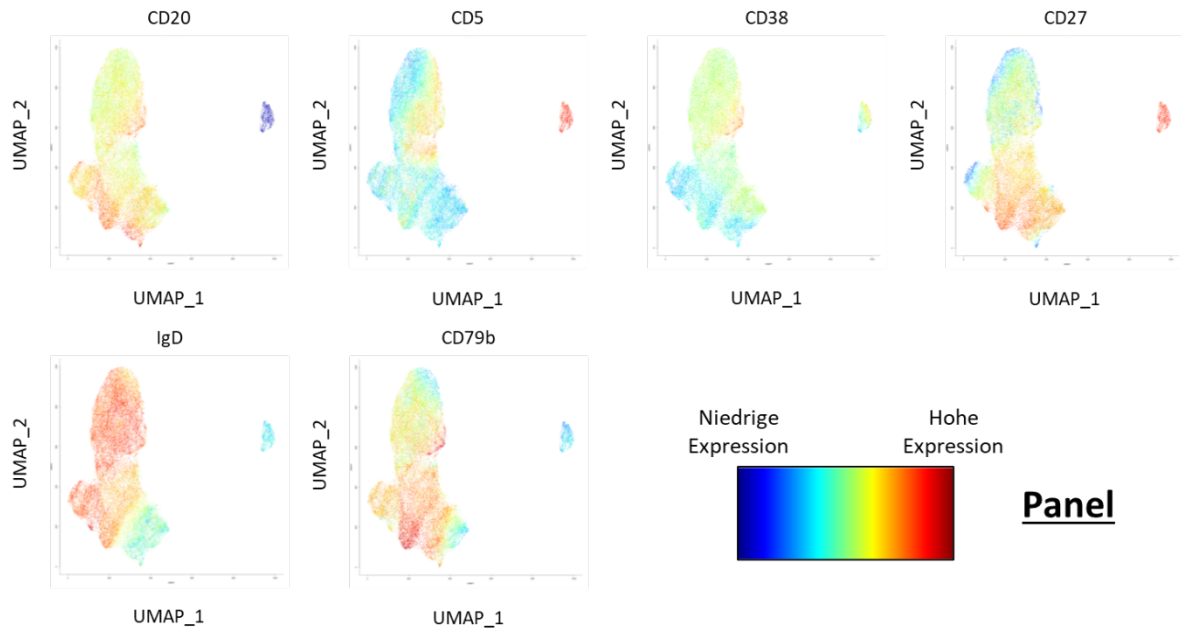
Dargestellt sind UMAPs mit der jeweiligen relativen Expressionsstärke der gezeigten Oberflächenproteine bei UCB-B-Zellen Bei *Infinity Flow* Analyse. Das *Panel* (oben) setzte sich aus Antikörpern gegen CD20, CD5, CD38, CD27, IgD und CD79b zusammen. Die untersuchten Marker (unten) setzten sich aus Antikörpern gegen CD23, CD73, IgM, CD1c, CD82 und CD35 zusammen. Aufgenommen wurden mindestens 50.000 Zellen. Niedrige Expression = blau; Hohe Expression = rot.

Bei adulten B-zellen aus peripherem Blut zeigte sich ein komplexeres Bild als bei neonatalen B-Zellen. So war die Expression von CD20 nicht gleichmäßig, sondern

schwankte innerhalb der Gesamtpopulation. Es konnten eindeutig CD27<sup>+</sup> von IgD<sup>+</sup> Zellen unterschieden werden. Im Gegensatz zu B-Zellen in Neugeborenen war eine Ko-Expression von CD38 und CD5 zu beobachten (Abbildung 19). Bei den untersuchten naiven Markern zeigte sich eine teilweise Ko-Expression von CD23 und CD73. Es existierten jedoch auch Zellen, die kein CD23 aber CD73 ausprägten. Unter putativen neonatalen Gedächtnis-B-Zellen war im Erwachsenen eine Ko-Expression von IgM, CD1c, CD82 und CD79b zu beobachten. CD35 wurde von nahezu allen Zellen ausgeprägt. IgM, CD1c, CD82 und CD79b wurden darüber hinaus mit dem bekannten Gedächtnis-Marker CD27 Ko-exprimiert (Abbildung 19).

Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Marker kohärent auf Zellen Ko-exprimiert wurden. Darüber hinaus konnte eine Ko-Expression von putativen neonatalen Gedächtnis-B-Zell-Markern mit dem bekannten Gedächtnis-B-Zell-Marker CD27 nachgewiesen werden. Jedoch waren auch Unterschiede zwischen neonatalen und adulten B-Zellen bei der Expression von Oberflächenproteinen zu beobachten.

## Ergebnisse



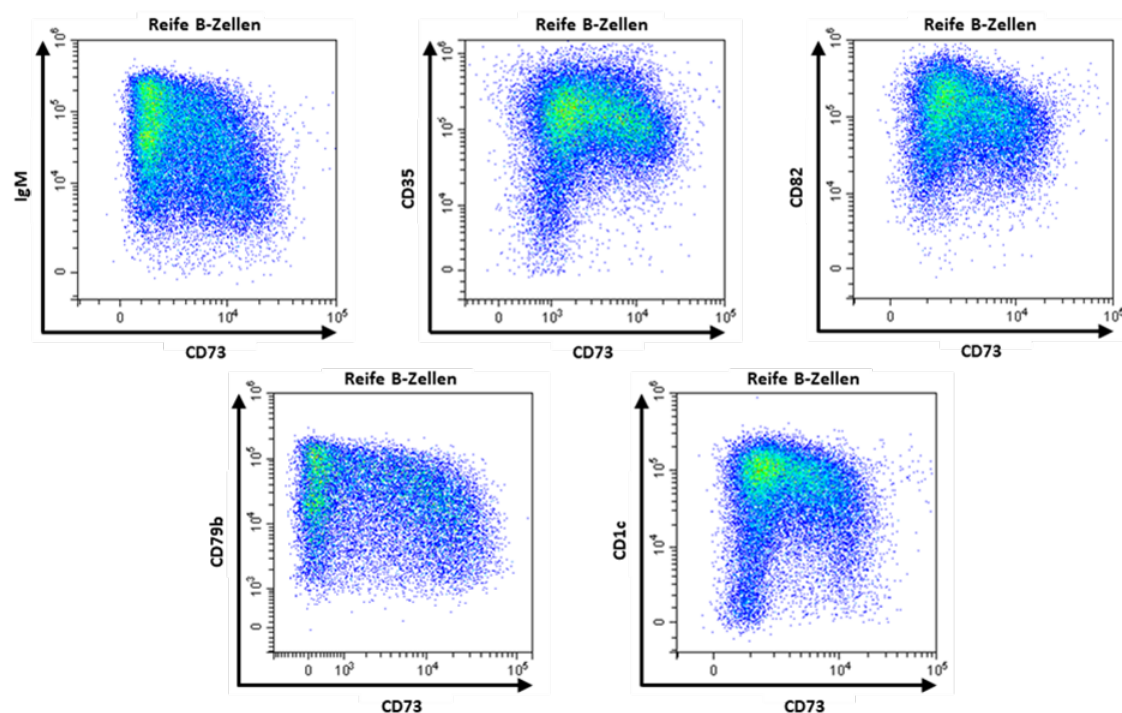
**Abbildung 19 *Infinity Flow* Analyse von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellmarkern bei adulten PB B-Zellen**

Dargestellt sind UMAPs mit der jeweiligen relativen Expressionsstärke der gezeigten Oberflächenproteine bei B-Zellen aus einer Spende von adultem peripherem Blut bei *Infinity Flow* Analyse. Das *Panel* (oben) setzte sich aus Antikörpern gegen CD20, CD5, CD38, CD27, IgD und CD79b zusammen. Die untersuchten Marker (unten) setzten sich aus Antikörpern gegen CD23, CD73, IgM, CD1c, CD82 und CD35 zusammen. Aufgenommen wurden mindestens 50.000 Zellen. Niedrige Expression = blau; Hohe Expression = rot.

Die bioinformatische Analyse zur Ermittlung von charakteristischen Oberflächenproteinen für putative naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen konnte

experimentell validiert werden. Hiernach sollte eine *Gating*-Strategie entwickelt werden, die eine möglichst distinkte Trennung von putativen neonatalen naiven und Gedächtnis-B-Zellen mittels FACS ermöglicht. Hierfür wurde CD73, der putative Marker für neonatale naive B-Zellen mit jeweils einem putativen neonatalen Gedächtnis-B-Zell-Marker kombiniert (Abbildung 20).

Es zeigte sich, dass CD73 in der B-Zell-Gesamtpopulation differentiell ausgeprägt wurde. Von den identifizierten Gedächtnis-Markern zeigten IgM und CD79b differentielle Expressionslevel innerhalb der Gesamtpopulation (Abbildung 20).

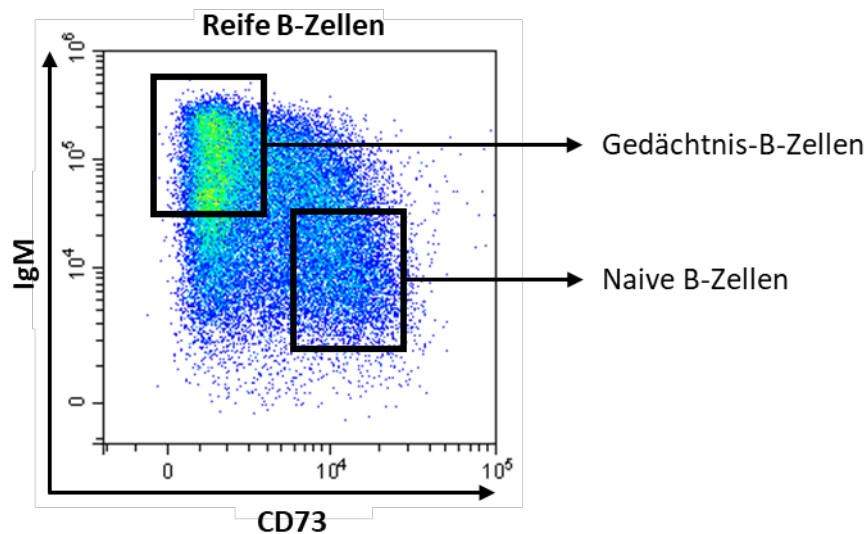


**Abbildung 20: Repräsentative Durchflusszytometrische Analysen von naiven und Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen**

Repräsentative *Dotplots* von Färbungen gegen putative Gedächtnis-B-Zell-Marker (IgM, CD35, CD82, CD79b, CD1c) in Kombination mit dem putativen naiven Marker CD73, welcher bei der Analyse der Expression von Oberflächenproteinen identifiziert wurde. Gefärbt wurden durch MACS angereicherte CD19<sup>+</sup> reife B-Zellen (CD20<sup>+</sup>CD38<sup>int</sup>) aus Nabelschnurblut.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Marker konsistent putative Gedächtnis-B-Zellen von naiven B-Zellen in Neugeborenen unterschieden und bei adulten Proben mit bekannten Markern für naive und Gedächtnis-B-Zellen korrelierten. Für Zellsortierung mit sich anschließenden funktionellen Studien wurde die Kombination CD73 und IgM verwendet, die durchflusszytometrisch eine

Auftrennung in zwei distinkte Populationen (putative naive und putative Gedächtnis-B-Zellen) ermöglichte (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Sortierstrategie von putativen Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen aus Nabelschnurblut**

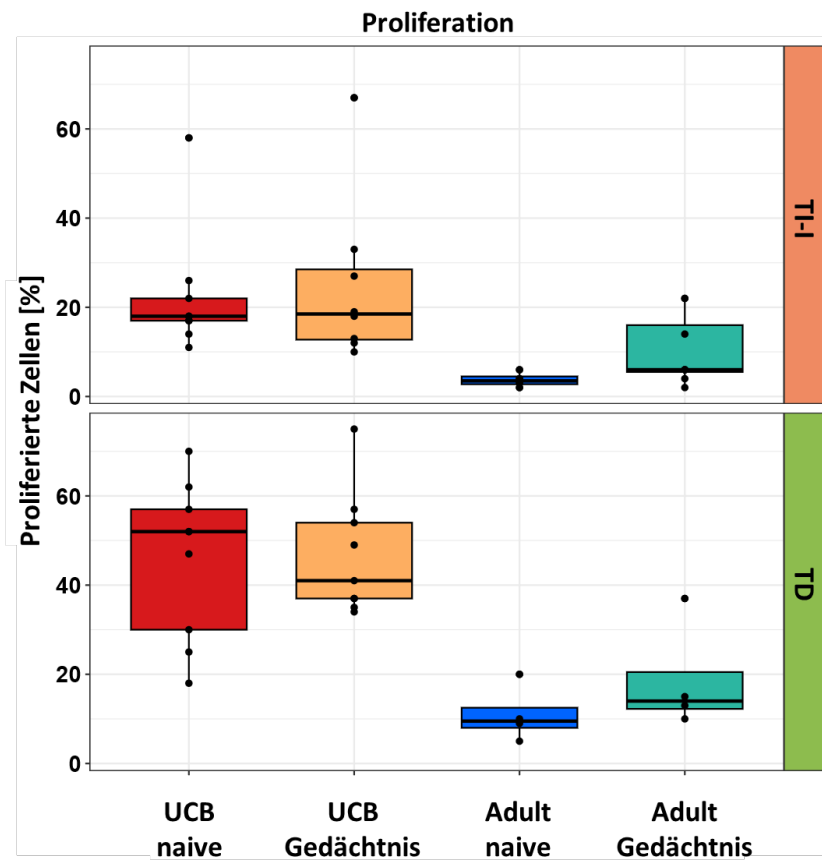
Dargestellt ist die Sortierstrategie von putativen neonatalen Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen für sich anschließende funktionelle Studien. Reife B-Zellen: CD20<sup>+</sup>CD38<sup>int</sup>. Putative Gedächtnis B-Zellen: IgM<sup>high</sup>CD73<sup>low</sup>; Putative naive B-Zellen: IgM<sup>low</sup>CD73<sup>high</sup>.

### 3.5.2 Funktionelle Studien zu putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei UCB-B-Zellen und adulten PB-B-Zellen

Nachdem eine Isolierung putativer naiver und Gedächtnis-B-Zell-Populationen im Neugeborenen erfolgreich war, sollten funktionelle Studien mit diesen Populationen durchgeführt werden. Hierfür wurde das Proliferationsverhalten nach TD- und TI-Stimulierung bei UCB-B-Zellen analysiert und verglichen. Zur Kontrolle wurden die gleichen Populationen PB-B-Zellen bei Erwachsenen isoliert und stimuliert.

Unter TI-I-Stimulierung zeigten sich zwischen neonatalen putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen nach drei Tagen keine signifikanten Unterschiede. Dies traf ebenso auf den adulten Gegenpart zu (Abbildung 22). Ein ähnliches Gesamtbild war auch unter TD-Stimulierung zu beobachten. Putative naive und Gedächtnis-B-Zellen in UCB und adulten peripherem Blut unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (Abbildung 22). Im Einklang mit früheren funktionellen Studien zeigte sich

auch in diesem Fall, dass neonatale B-Zellen insgesamt wesentlich schneller begannen zu proliferieren als PB-B-Zellen aus Erwachsenen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Proliferationsverhalten von putativen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Populationen im Neugeborenen und Erwachsenen**

Dargestellt ist der proliferierte Anteil von aktivierten Zellen (TD- und TI-Stimulation) in Form von Boxplots. Pro Stimulation wurden mindestens 50.000 sortierte Zellen ausgesät. Der Anteil proliferierter Zellen wurde durchflusszytometrisch über den Fluoreszenzfarbstoff eFluor670 ermittelt. Ausgewertet wurden über 20 unabhängige Experimente. Gemessen wurde drei Tage nach Stimulierung. Sortierstrategie für putative naive B-Zellen:  $CD20^+CD38^{int}CD73^+IgM^{low}$ . Sortierstrategie für putative Gedächtnis-B-Zellen:  $CD20^+CD38^{int}CD73^{low}IgM^{low}$ .

### 3.6 Synthese von humanen rekombinanten Antikörpern

Tiefensequenzierungen von B-Zellen bei Neugeborenen zeigten, dass diese ein diverses Repertoire an B-Zell-Rezeptoren besitzen. Anders als im Erwachsenen gibt es in Neugeborenen jedoch einen erheblichen Anteil (bis zu 15%) von interindividuell homologen B-Zell-Rezeptoren, sogenannten Klonotypen. Diese Klonotypen werden durch eine Homologie von mehr als 90% in der Aminosäuresequenz der CDR-III der schweren Kette definiert (Budeus et al. 2021). Die Spezifität dieser klonotypischen B-Zell-Rezeptoren ist unbekannt und für das Verständnis der zugehörigen B-Zellen mit „konservierter“ Reaktivität von Bedeutung.

Bei *Bulk*-Tiefensequenzierungen von B-Zellen können schwere Ketten und deren gepaarte leichte Ketten nicht zurückverfolgt werden. Eine Rekonstruktion des ursprünglichen Aufbaus des B-Zell-Rezeptors ist somit nicht möglich. Durch die Generierung von Einzelzell-RNA-Bibliotheken in Kombination mit Einzelzell-BCR-Bibliotheken kann jedoch die ursprüngliche Kombination von schwerer und leichter Kette eines BCRs ermittelt werden. Für die Generierung dieser Bibliotheken wurden das *Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit* und das *Chromium Single Cell Human BCR Amplification Kit* von *10X Genomics* verwendet. Insgesamt wurden drei UCB für die Versuche prozessiert.

Klonotypen wurden durch den Vergleich der Schwerketteninformation dieser Einzelzell-BCR-Profile mit einem bereits publizierten Datensatz einer *Bulk*-Tiefensequenzierung von schweren Ketten bei sechs Neugeborenen (Budeus et al. 2021) ermittelt.

Bei dem Vergleich der Schwerketteninformation aus der *Bulk*- und Einzelzellsequenzierung wurden insgesamt 15 funktionelle klonotypische BCR ermittelt, welche kloniert und rekombinant exprimiert werden sollten (Tabelle 15). Im Folgenden ist die exemplarische Synthese eines klonotypischen Antikörpermoleküls (Antikörper 1) dargestellt.

Tabelle 15: Klonotypen von Neugeborenen beim Vergleich der schweren Ketten von Einzelzell-BCR-Sequenzierungen und Tiefensequenzierungen von BCRs

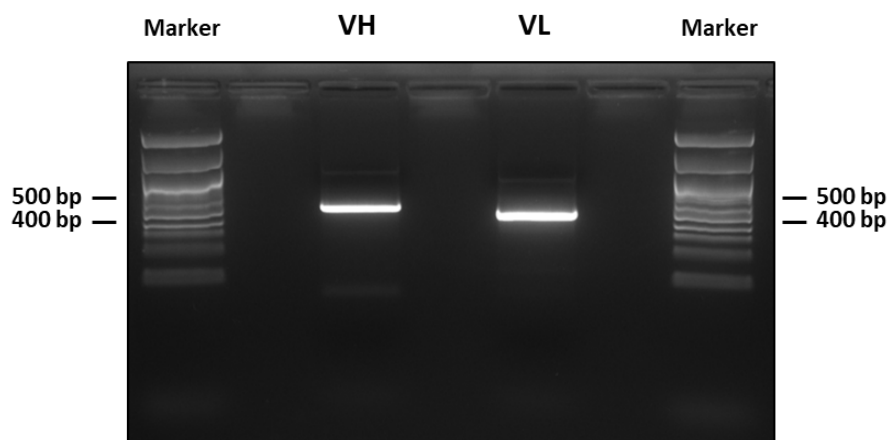
Antikörper	Kette	V-Gen	D-Gen	J-Gen	C-Gen	CDR3-Sequenz (AA)
1	IGH	IGHV3-7	IGHD3-10	IGHJ3	IGHM	CARVYGSYDAFDIW
	IGL	IGLV1-51	-	IGLJ2	IGLC2	CGTWDSSLSAVVF
2	IGH	IGHV1-2	IGHD2-2	IGHJ4	IGHM	CARVNCSTSCYFDYW
	IGL	IGLV1-51	-	IGLJ2	IGLC2	CGTWDSSLSAVVF
3	IGH	IGHV3-15	IGHD3-3	IGHJ4	IGHM	CTTEPRLEWLLFDYW
	IGL	IGLV1-40	-	IGLJ2	IGLC2	CQSYDSSLSGSVF
4	IGH	IGHV1-69D	IGHD2-15	IGHJ4	IGHM	CAREGTSGSYSDYW
	IGK	IGKV4-1	-	IGKJ1	IGKC	CQQYYSTPRTF
5	IGH	IGHV4-59	IGHD3-22	IGHJ4	IGHM	CARHGPDSSGFDYW
	IGK	IGKV4-1	-	IGKJ3	IGKC	CQQYYSTPFTF
6	IGH	IGHV1-18	IGHD3-3	IGHJ3	IGHM	CARGRSGYDAFDIW
	IGL	IGLV1-47	-	IGLJ2	IGLC2	CAAWDDSLSGVVF
7	IGH	IGHV4-34	IGHD6-13	IGHJ4	IGHD	CARPYSSSWYFDYW
	IGK	IGKV2-28	-	IGKJ1	IGKC	CMQALQTPRTF
8	IGH	IGHV1-69D	IGHD3-16	IGHJ3	IGHM	CARGGEDDAFDIW
	IGL	IGLV3-21	-	IGLJ2	IGLC2	CQVWDSSSDHPVF
9	IGH	IGHV1-2	IGHD1-26	IGHJ3	IGHM	CARVGAYDAFDIW
	IGL	IGLV3-21	-	IGLJ3	IGLC2	CQVWDSSSDHWVF
10	IGH	IGHV4-59	IGHD1-26	IGHJ4	IGHD	CARDLSGSYFDYW
	IGK	IGKV1D-39	-	IGKJ2	IGKC	CQQSYSTPYTF
11	IGH	IGHV1-2	IGHD7-27	IGHJ3	IGHM	CAREETGDAFDIW
	IGL	IGLV5-39	-	IGLJ2	IGLC2	CAIWYSSTSVVF
12	IGH	IGHV1-69D	IGHD1-26	IGHJ4	IGHM	CARDLGSYGFDYW
	IGL	IGLV2-8	-	IGLJ2	IGLC2	CSSYAGSNNVVF
13	IGH	IGHV1-2	IGHD6-13	IGHJ4	IGHM	CARDEAAAGDYW
	IGK	IGKV3-11	-	IGKJ4	IGKC	CQQRSNWLTF
14	IGH	IGHV4-34	IGHD7-27	IGHJ4	IGHM	CARGLGIFDYW
	IGK	IGKV4-1	-	IGKJ1	IGKC	CQQYYSTPWTF
15	IGH	IGHV1-2	n.a.	IGHJ4	IGHM	CARGSFYDW
	IGK	IGKV2-30	-	IGKJ1	IGKC	CMQGTHWPGETF

Für die Produktion von Antikörpern wurden die Sequenzen der Fab-Fragmente in Expressionsvektoren kloniert, die in ihrem *Backbone* Sequenzen für Fc-Domänen (IgG1, IgK, IgL) enthielten. Die Sequenzen für Fab-Fragmente von schwerer und leichter Kette wurden kommerziell erworben (eBlock, IDT). Die Sequenzen enthielten Abschnitte für deren Amplifikation, Restriktionsstellen für Klonierungen, eine Kozak-



Sequenz für eine stabile Translation sowie eine Sequenz für ein Signalpeptid für posttranslationale Modifikationen.

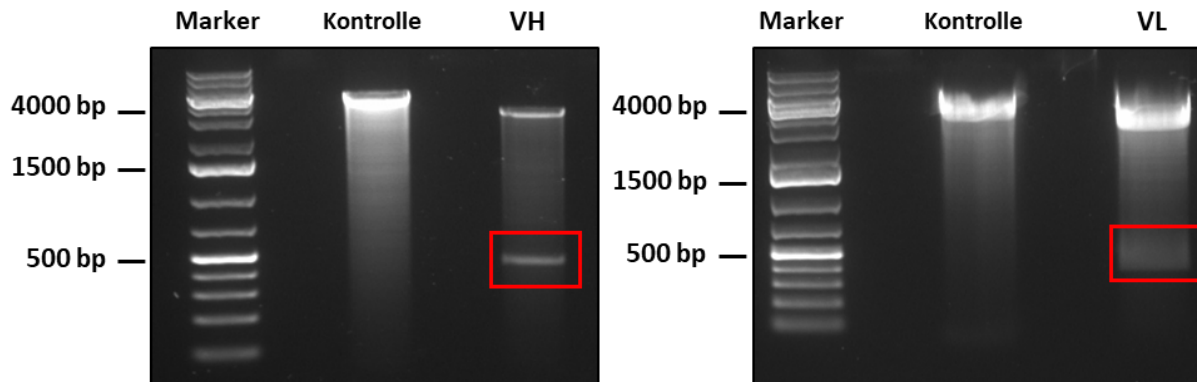
In einem ersten Schritt wurde für spätere TA-Klonierungen das Ausgangsmaterial mittels PCR amplifiziert. Die PCR zeigte für die variable Region der schweren Kette eine Bande zwischen 400 bp und 500 bp, was der Größe des Fragments (489 bp) entspricht. Bei der PCR für die Sequenz der variablen Region der leichten Kette war eine Bande zwischen 400 und 500 bp detektierbar. Dies entsprach ebenfalls der erwartbaren Größe (452 bp) (Abbildung 23).



**Abbildung 23: PCR der Sequenzen der variablen Regionen von schwerer und leichter Kette**

Repräsentative Darstellung einer Agarosegelelektrophorese von amplifizierten Sequenzen, welche für die Fab-Fragmente von schwerer und leichter Kette kodieren. In die Taschen wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz geladen. Konzentration des Gels: 2%. Programm: 100V für 60 min. Marker: 100bp ladder (InvivoGen), Farbstoff: GelRed.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden kloniert (TA-Klonierung), zur Qualitätskontrolle nach Sanger sequenziert und anschließend in Expressionsvektoren eingebracht, die den konstanten Terminus für IgG1 bzw. IgK in ihrem *Backbone* enthielten, sodass sich bei *in-Frame*-Ligation von variabler und konstanter Region die Sequenz einer vollständigen schweren bzw. leichten Kette ergab.



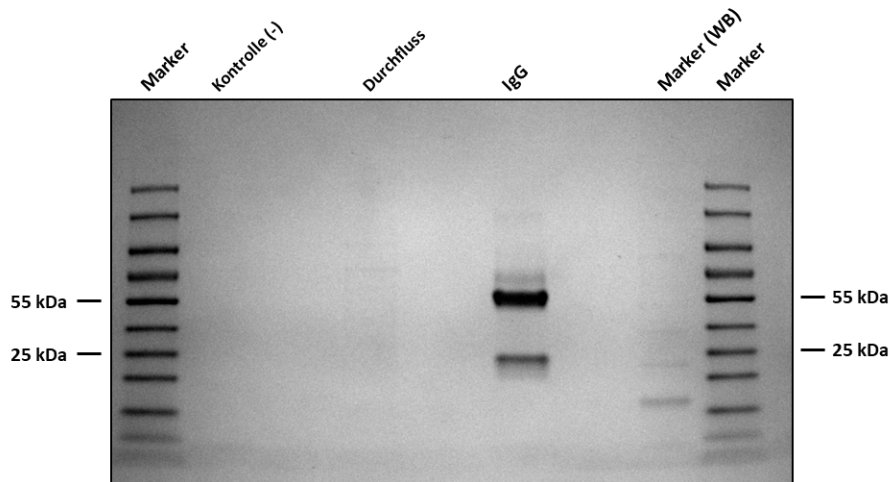
**Abbildung 24: Restriktionsverdau von VH- und VL-Sequenz im pGEMT-Vektor**

Repräsentative Darstellung einer Agarosegelelektrophorese von Konstrukten der TA-Klonierung sowie deren Verdau. Als Kontrolle diente unverdauter Vektor. Konzentration des Gels: 1%. Programm: 100V für 60 min. Marker: 1 kb GeneRuler Plus (Thermo Fisher), Farbstoff: GelRed.

Validierte Sequenzen wurden in HEK293F-Zellen ausgeprägt und der Zellkulturüberstand mit den potenziell sezernierten Antikörpern nach fünf Tagen abgenommen und für die Aufreinigung der sezernierten Antikörper verwendet. Im Durchschnitt ergab sich eine Proteinkonzentration von 300 µg/ml.

Für eine Bestimmung der Reinheit und zur Identifizierung des Produkts im Überstand wurde eine SDS-PAGE mit sich daran anschließender Coomassie-Färbung und ein Western Blot des aufgereinigten Überstands sowie des Durchflusses (Negativkontrolle) durchgeführt.

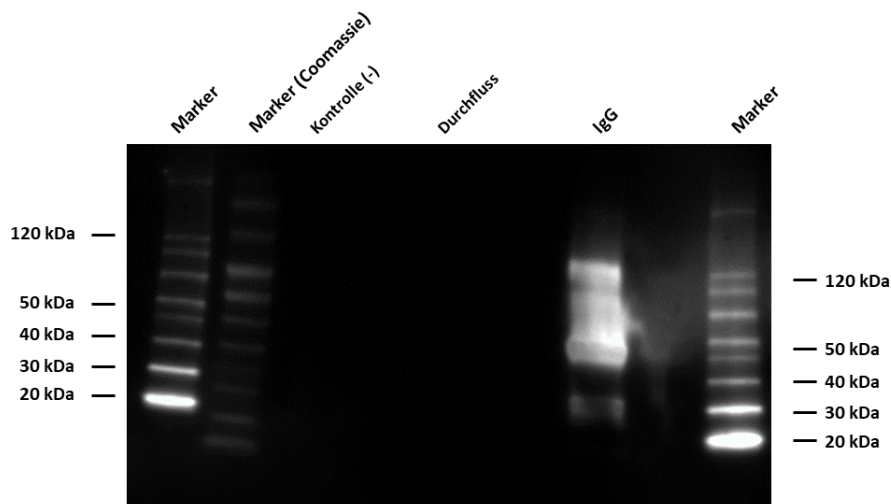
In der Negativkontrolle zeigten sich keine detektierbaren Mengen an Protein, während der Durchfluss eine geringe Menge an Proteinen unterschiedlicher Größen enthielt. Das Eluat dagegen zeigte zwei starke Banden bei einer erwarteten Größe von ca. 25 kDa sowie 50 kDa. Für eine qualitative Identifizierung der beiden Banden wurden Western Blots für den Isotyp des gewünschten Antikörpers (IgG1) durchgeführt.



**Abbildung 25: Gesamtproteinbestimmung der Antikörperproduktion**

Repräsentative Coomassie-Färbung zur Analyse der aufgereinigten Proteine. Aufgetragen wurde eine Negativkontrolle, der Durchfluss der Proteinaufreinigung sowie die aufgereinigten Antikörper. Marker = *Prestained ladder*, Marker (WB) = *Magic Mark*.

Im Western Blot waren bei der Negativkontrolle sowie beim Durchfluss keine Produkte detektierbar. In den Eluaten waren dagegen eindeutig rekombinante leichte und schwere Ketten bei ca. 30 kDa, ca. 50 kDa detektierbar.



**Abbildung 26: Bestimmung von Antikörpern im aufgereinigten Zellkulturüberstand**

Western Blot zur Validierung der Antikörperproduktion. Aufgetragen wurde eine Negativkontrolle, der Durchfluss der Proteinaufreinigung sowie die aufgereinigten Antikörper. Marker (Coomassie) = *Prestained ladder*, Marker = *Magic Mark*.

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von rekombinanten humanen Antikörpern (IgG) erfolgreich war.

## 4 Diskussion

Kleinkinder und Neugeborene erkranken häufiger an Infektionen und zeigen schwächeren Immunantworten auf Impfungen. Die vorliegende Arbeit umfasst vergleichende funktionelle Untersuchungen von B-Zellen aus Nabelschnurblut und peripherem Blut von Erwachsenen sowie molekulare Genexpressions- und epigenetische Analysen von B-Zell-Populationen aus Spendern in den Altersstufen von null bis 30 Jahren. Weiterhin wurde eine Methode zur Produktion rekombinanter humaner Antikörper etabliert.

### 4.1 B-Zellen aus Nabelschnurblut reagieren stärker auf T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Stimulierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen aus Nabelschnurblut – anders als bisher beschrieben – einen reifen Phänotyp besitzen und sehr effizient auf Reize reagieren können. Sie sind in der Lage sowohl auf T-Zell-abhängige (TD-Stimulierung und Ko-Inkubation mit autologen T-Zellen) und auf T-Zell-unabhängige Reize (TI-I- und TI-II-Stimulierung) zu reagieren und zeigen ein beschleunigtes Proliferations- und Differenzierungsvermögen gegenüber ihrem adulten Gegenpart, was auch mit publizierten Daten zur Expression von TLR-Rezeptoren übereinstimmt (Pettengill et al. 2016; Chelvarajan et al. 1999). Die beschriebene TI-Reaktivität erweist sich evolutionär als Vorteil, da bei Neugeborenen kaum affinitätsgereifte B-Zell-Populationen vorliegen. Diese entstehen erst zeitverzögert nach Interaktionen mit T-Zellen in Keimzentren von sekundären lymphatischen Organen (Blanco et al. 2018). Zusätzlich scheint die Architektur von lymphatischen Organen in Neugeborenen nicht komplett ausgereift zu sein (Pihlgren et al. 2003). Ohne T-Zell-unabhängige Mechanismen könnten sich eindringende Pathogene daher systemisch ausbreiten. Jedoch geht diese erhöhte Sensitivität auf externe Stimuli mit Nachteilen einher. So war der Anteil an proliferierten Zellen, die in Apoptose gingen oder starben bei Neugeborenen höher als bei deren adulten Gegenpart. Auf diese Weise besteht die Gefahr einer Ermüdung des Immunsystems, bei welchem das Reservoir an funktionierenden B-Zellen erschöpft ist, der Erreger aber noch nicht komplett neutralisiert wurde. Dies könnte schwere Folgen, wie beispielsweise eine potenziell lebensbedrohliche Sepsis, nach sich ziehen. In der Tat ist die Inzidenz von Sepsen in

Neugeborenen erhöht (Shane et al. 2017). Passend hierzu zeigten neonatale UCB-Zellen unter Ko-Stimulierung mit autologen aktivierten T-Zellen eine verringerte Responsivität verglichen mit ihrem adulten Gegenpart. Die beeinträchtigte Interaktion von B- und T-Zellen könnte einen direkten Einfluss auf die schnell abnehmenden Antikörpertiter im Serum bei proteinbasierten Impfungen haben, wie sie in Neugeborenen beobachtet werden (Saso und Kampmann 2017). Zusammenfassend besitzen B-Zellen in Neugeborenen sehr ursprüngliche Eigenschaften, die hauptsächlich ohne Zusammenspiel mit T-Zellen funktionieren. Dies wird auch durch die Geneigtheit zur Differenzierung zu Plasmablasten bei UCB-B-Zellen unterstrichen. Eine Reifung zu funktionellen „adulten“ B-Zellen scheint erst nach mehreren Jahren im Laufe der Kindheit zu erfolgen.

## **4.2 Die Transition von einem neugeborenen bzw. frühkindlichen zu einem ausgereiften und „adulten“ Immunsystem findet zwischen sieben und zehn Jahren statt.**

Bei der vergleichenden Einzelzell-RNA-Analyse von Spendern verschiedener Altersstufen von null bis 30 Jahren zeigte sich, dass die B-Zellen in Neugeborenen ausschließlich aus einer homogenen, überwiegend als naiv annotierten, B-Zell-Population bestand. Dies erscheint plausibel, da Föten in intra-uteriner Umgebung während ihrer Entwicklung zwar Erregern ausgesetzt sind (Hornef und Penders 2017; Theis et al. 2019), diese aber noch keine starken Immunantworten hervorrufen (Ygberg und Nilsson 2012). Daher fehlt Neugeborenen ein klassisches immunologisches Gedächtnis. Direkt nach Geburt werden Neugeborene jedoch einer Umwelt ausgesetzt, die eine hohe Last an Erregern beinhaltet, welche das neonatale Immunsystem als fremd erkennt und entgegenwirkt (Olin et al. 2018). Diese Vielzahl an Erregern sollte Immunreaktionen nach sich ziehen, die die Bildung von klassischen Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen begünstigen. Überraschenderweise zeigten die Altersstufen von zwei und drei Jahren jedoch kaum bzw. nur wenige klassische Gedächtnis-B-Zellen. Die dominante Population waren immer noch B-Zellen ohne Anzeichen von Antigenkontakt und Affinitätsreifung. Diese Beobachtung ist im Einklang mit durchflusszytometrischen Analysen anderer Publikationen (Blanco et al. 2018). B-Zell-Immunreaktionen in Neugeborenen und Kleinkindern (obwohl durch TD-

Stimuli aktivierbar) führen demnach nicht so effizient zu Gedächtnisbildung wie im adulten Gegenpart. Es scheint, als bräuchte das B-Zell-Immunsystem bis zu zehn Jahre, um einen B-Zell-Pool zu etablieren, der dem in Erwachsenen Individuen ähnelt. Erst ab diesem Zeitpunkt ändern sich die relativen Verhältnisse von klassischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen nicht mehr. Dies kann mehrere Gründe haben (Kostimulierende Faktoren (Kaur et al. 2007), lymphoide Architektur (Kruschinski et al. 2004)), die bereits anderweitig diskutiert wurden (Siegrist und Aspinal 2009). Andererseits werden Impfungen erfolgreich in Neugeborenen und Kleinkindern durchgeführt, die zwar nicht die gleiche Effizienz wie bei älteren Individuen haben, aber dennoch länger anhaltende Immunität vermitteln (Kollmann et al. 2020; Dagan et al. 2002). Wenn also keine klassischen affinitätsgereiften Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen existieren, so müssten sich doch Mechanismen bzw. Prozesse vollziehen, die eine Art von immunologischem Gedächtnis vermitteln, welche sich von ihrem adulten Gegenpart unterscheiden.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, reichte es nicht die unterschiedlichen Altersstufen getrennt voneinander zu analysieren. Vielmehr mussten alle Datensätze und jede einzelne Zelle samt ihres Transkriptoms in einem umfassenden Datensatz integriert werden, um direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen Zellpopulationen der unterschiedlichen Altersstufen anstellen zu können.

Ein Schwachpunkt der vorliegenden Analysen war, dass pro Altersstufe, mit Ausnahme der Neugeborenen, lediglich ein Spender untersucht wurde. Hierdurch könnten individuelle Abweichungen bei einzelnen Spendern das Gesamtbild der Analyse verfälschen und zu anderen Ergebnissen führen. Für eine robuste Analyse müssten daher pro Altersstufe mehrere Spender miteinander verglichen werden.

### **4.3 Integrierte Einzelzellanalysen von B-Zell-Populationen verschiedener Altersstufen**

Für vergleichende Analysen einzelner B-Zell-Populationen wurden die Genexpressionsprofile aller Altersstufen in einem alle Einzelzellen umfassenden Datensatz integriert. Hierbei wurde eine UMAP über die Top 2.000 differentiell exprimierten Gene generiert, die sich zwischen Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-

Zellen in Erwachsenen unterscheiden. Es zeigten sich in dieser Gesamtanalyse zwei Hauptcluster, die in mehrere Subcluster unterteilt werden konnten. Für eine Charakterisierung und Identifizierung der beiden Hauptcluster wurden verschiedene Parameter, die typisch für naive bzw. Gedächtnis-B-Zellen sind, untersucht. Erwartungsgemäß konnte beobachtet werden, dass die zwei Hauptcluster Gedächtnis- und naive B-Zellen voneinander separierten. Dies wurde durch Expression von charakteristischen Markern (CD23 für naive und CD27 für Gedächtnis-B-Zellen), Mutationsfrequenzen von V-Genen (niedrig bei naiven und hoch bei Gedächtnis-B-Zellen) und Ausprägung von Isotypen (IgM bei naiv und IgM, IgG und IgA bei Gedächtnis) nachgewiesen. Das naive B-Zellen enthaltene Cluster konnte in zwei und das Cluster, das Gedächtnis-B-Zellen enthielt, konnte in sechs Subcluster unterteilt werden. Die einzelnen Subcluster sollten weiter untersucht werden.

Bei den einzelnen Subclustern wurden durch PCAs eine *Gene Set Enrichment*-Analyse durchgeführt. Die *Genesets* sollten zwischen naiven- und Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten bzw. Plasmazellen und einigen weiteren Parametern wie beispielsweise der Aktivierung durch CD40 unterscheiden. Analysiert wurden alle einzelnen Subcluster der integrierten Analyse (zwei naive Subcluster und sechs Gedächtnis-Subcluster) sowie alle Altersstufen.

Die zwei naiven Subcluster zeigten in der Ausprägung der untersuchten *Genesets* untereinander keine Unterschiede. Ein Grund hierfür könnte eine nicht ausreichende Trennung durch die gewählten *Genesets* oder aber eine hohe Ähnlichkeit der zu den Clustern zugehörigen Populationen auf Genexpressionsebene sein. Die einzelnen Gedächtnis-Subcluster zeigten untereinander Unterschiede in der Ausprägung ihrer *Genesets* aber auch im Vergleich zu naiven B-Zell-Populationen. Die Gedächtnis-Subcluster 1, 3, 4 und 5 scheinen sich hierbei am meisten von naiven B-Zell-Populationen zu unterscheiden und demzufolge klassengewechselt, affinitätsgereift oder beides zu sein. Gedächtnis-Subcluster 0 und 2 zeigten keinen eindeutigen Trend in Richtung Gedächtnis- oder naivem Kompartiment. Hierbei könnte es sich im Gedächtnis-B-Zellen handeln, die am Beginn ihrer Differenzierung stehen und so ein Bindeglied zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Populationen darstellen. Darüber hinaus könnten Zellen, die zu diesen Clustern gehören, extrafollikulär oder

keimzentrumsunabhängig differenzieren. Diese Art von Gedächtnis-Bildung wurde bereits in Veröffentlichung beschrieben (Toyama et al. 2002; Taylor et al. 2012).

Bei der Untersuchung der einzelnen Altersstufen war zu beobachten, dass die B-Zell-Populationen der beiden neonatalen Spender weder *Genesets* aus erwachsenen Gedächtnis-B-Zell-Populationen noch *Genesets* erwachsenen naiven Populationen zugeordnet werden konnten. B-Zellen aus Neugeborenen scheinen sich nicht oder nur teilweise durch bekannte *Genesets* aus erwachsenen charakterisieren zu lassen was sich auch durch andere wissenschaftliche Publikationen stützen lässt (Kaur et al. 2007; Budeus et al. 2021).

Die folgenden Altersstufen zeigten anhand der PCA zeigten zumeist wohl naive B-Zell-Populationen (zwei und drei Jahre) bzw. naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen (ab sieben Jahren). Wie bereits in der separaten Analyse beobachtet (Abschnitt 4.2), lag auch hier die Transition von einem „neugeborenen“ zu einem „adulten“ Immunsystem zwischen sieben und zehn Jahren.

Für genauere Untersuchungen wurden beide Hauptcluster von naiven und Gedächtnis-B-Zellen separat voneinander auf Level der Genexpression untersucht.

#### **4.4 Naive B-Zellen von Erwachsenen und Neugeborenen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung**

Bei der Analyse des naiven Hauptclusters waren zwei naive Subcluster zu beobachten. Der relative Anteil der zwei naiven Subcluster an der Gesamt-B-Zellpopulation von naiv annotierten Zellen variierte altersabhängig stark. Während im Neugeborenen sowie in den Altersstufen bis drei Jahren beide Cluster in gleichem Maße vorkamen, verringerte sich das „neonatale“ Cluster sukzessiv, bis es in Erwachsenen kaum mehr nachzuweisen war. Über Analyse von Mutationsfrequenz, der Verwendung von Isotypen und der Anzahl von N-Nukleotiden ließen sich keine molekularen Unterschiede zwischen diesen beiden Populationen herleiten.

Die zuvor beschriebenen funktionellen Unterschiede in Bezug auf Proliferation und Differenzierung bei naiven und adulten B-Zellen (siehe 4.1) könnten durch diesen Fund erklärt werden. So könnte das mit dem Alter abnehmende Cluster naive B-Zellen



enthalten, die durch Stimulierung schneller reagieren als Zellen des naiven Clusters, das nicht mit zunehmendem Alter abnimmt. Auf diese Weise könnte die Gesamtpopulation an B-Zellen bei Neugeborenen stärker proliferieren und schneller differenzieren.

Um dies zu validieren oder zu falsifizieren, müssten beide Populationen voneinander getrennt und funktionell charakterisiert werden. Sollten diese Populationen für die funktionellen Unterschiede bei neugeborenen und adulten naiven B-Zellen verantwortlich sein, ergeben sich hierfür mehrere Erklärungsansätze. So könnten die beiden B-Zell-Populationen durch verschiedene Abstammungslinien erklärt werden. Eine Population könnte mit B1-Zellen, die vor allem in der Maus beschrieben sind, und die andere Population mit in Erwachsenen gut charakterisierten konventionellen B2-Zellen erklärt werden. Für diesen Ansatz existieren mehrere Anhaltspunkte. Beispielweise zeigten Studien von Arbeitsgruppen, die sich mit der Identifizierung des putativen menschlichen B1-Zellen-Gegenstück befassen, dass diese eine schnellere Reaktionskinetik als ihr adulter Gegenpart besitzen und schnell mit der Sezernierung von Antikörpern beginnen. Eigenschaften, die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnten (Abschnitt 4.1). Darüber hinaus wird angenommen, dass die relative Anzahl von B1-Zellen im Menschen mit dem Alter abnimmt (Rodriguez-Zhurbenko et al. 2019), was auch auf das mit dem Alter abnehmende Subcluster zutreffen würde. CD5, ein prominenter Marker für murine B1-Zellen (Hayakawa et al. 1983), scheint hier in diesem Fall jedoch keine Rolle zu spielen, da CD5 bei unseren Analysen nicht differentiell exprimiert war. Für eine tiefergehende Transkriptomanalyse müssten beide Populationen voneinander getrennt und durch Hochleistungstiefensequenzierung genauer charakterisiert werden. Ein weiteres Merkmal von B1-Zellen in der Maus ist, dass diese wahrscheinlich selbst-erneuernd sind und im späteren Verlauf des Lebens aus sich selbst und nicht aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen. (Kreslavsky et al. 2017; Kristiansen et al. 2018; Kobayashi et al. 2020; Yang et al. 2021). Ob eine der hier gefunden Populationen selbst-erneuernd ist, also bereits im Neugeborenen angelegt und anschließend unabhängig von HSCs persistiert, kann nicht gesagt werden. Hierfür könnten bspw. longitudinale Studien mit humanisierten Mäusen durchgeführt werden. Die Tatsache, dass ein Cluster bzw. eine Zellpopulation in der durchgeführten Analyse der naiven B-Zellen mit der Zeit verschwindet, könnte damit erklärt werden, dass

konventionelle B2-Zellen zu Beginn des Lebens nur in geringem Maße produziert werden und sich erst mit zunehmender Lebensdauer im peripheren Blut anreichern und die putative B1-Population mit der Zeit „überwachsen“.

## 4.5 In Neugeborenen existieren B-Zellen mit Gedächtnis-Signatur

Die Analyse der integrierten Einzelzellen mit Gedächtnis-Signatur ergab, abhängig von der jeweiligen Altersstufe, bis zu sechs verschiedene Subcluster. Durch Mutationsfrequenz und Ausprägung von Isotypen ließen sich insbesondere in den älteren Altersstufen Rückschlüsse auf die Identität einiger Cluster schließen. Auf diese Weise konnten unterschiedliche Gedächtnis-B-Zell-Populationen unterschieden und identifiziert werden (Seifert und Küppers 2009; Budeus et al. 2015; Siekevitz et al. 1987). Das mit zunehmendem Alter sukzessiv abnehmende und Ig-unmutierte Cluster 0 konnte jedoch keiner klassischen Gedächtnis-Population zugeordnet werden. Über eine *Trajectory*-Analyse konnte eine kohärente Abfolge von Differenzierungsschritten nachempfunden werden. Vom unmutierten Cluster 0 über frühe IgM-Gedächtnis-B-Zellen (Cluster 1) zu späten IgM-Gedächtnis-B-Zellen (Cluster 3) und zwei klassengewechselten Populationen (Cluster 2 und Cluster 4). Die zu Cluster 0 gehörende B-Zell-Population könnte demnach eine frühe Entwicklungsstufe von unmutierten und nicht klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen darstellen. Durch die Akkumulierung von klassischen Gedächtnis-B-Zellen im Laufe der Entwicklung des Immunsystems könnten diese rudimentäre Population von anderen Populationen „überwachsen“ werden. Für eine genauere Charakterisierung von Cluster 0 müsste die dementsprechende Population isoliert und bspw. durch Tiefensequenzierung weiter untersucht werden.

Die Existenz von Gedächtnis-B-Zellen und deren große Anzahl in Neugeborenen war nicht erwartet worden. Dies widerlegt die Theorie, dass in Neugeborenen fast ausschließlich B-Zellen existieren, die Antigen-unerfahren bzw. naiv sind (Duchamp et al. 2014). Jedoch scheint es sich bei diesen B-Zellen nicht um klassische, affinitätsgereifte Gedächtnis-B-Zellen zu handeln, da weder Klassenwechsel noch Mutationen beobachtet werden konnten. Das erklärt auch das Fehlen von Gedächtnismarkern, was durch verschiedene publizierte Studien bestätigt wird.

(IJspeert et al. 2016; Nielsen et al. 2019). In diesen Publikationen wird berichtet, dass erst im späteren Verlauf des Lebens (ab zwei bis drei Jahren) ausgereifte Gedächtnis-B-Zellen entstehen, wie sie auch in Adulten existieren. Dies stützt darüber hinaus in Abschnitt 4.2 getätigte Theorien über eine kontinuierliche Reifung des Immunsystems. Ein weiterer Punkt, der dagegenspricht, dass in Neugeborenen gefundene putative Gedächtnis-B-Zellen mit gereiften Gedächtnis-B-Zellen in Erwachsenen gleichzusetzen sind, ist die Tatsache, dass in anfänglichen Analysen alle Einzelzellen aus Neugeborenen als naiv annotiert wurden (Abschnitt 3.2). Dieser Widerspruch ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der Annotierung Einzelzelldaten mit *Bulk*-Daten verglichen wurden und dass, wie bereits erwähnt, B-Zellen in Neugeborenen nicht durch *Genesets* beschrieben werden, die im Erwachsenen naive von Gedächtnis-B-Zellen trennen (Abschnitt 3.3).

Über die exakte funktionale Kapazität der hier als „Gedächtnis“ annotierten B-Zellen bei Neugeborenen kann spekuliert werden. Es existieren Studien, die besagen, dass insbesondere in Neugeborenen und Kindern Gedächtnis-B-Zellen vorhanden sind, die anders funktionieren als im Erwachsenen. Phänotypisch unterscheiden sich diese B-Zellen durch die Expression des Markers CD27, der in Neugeborenen nur schwach und in adulten stärker ausgeprägt ist. Die schwach CD27 ausprägende Population, die in Neugeborenen angereichert ist, wird hierbei als CD27<sup>dull</sup> und die stark ausprägende Population, die vermehrt in Adulten vorkommt, wird als CD27<sup>bright</sup> betitelt (Grimsholm et al. 2020). Zwischen der von Grimsholm et al. beschriebenen B-Zellpopulation bei Neugeborenen und den in dieser Arbeit beschriebenen putativen Gedächtnis-B-Zellen existieren mehrere Gemeinsamkeiten. So teilen beide Populationen eine niedrige Frequenz an somatischer Hypermutation und fehlenden Klassenwechsel (Grimsholm et al. 2020). Darüber hinaus ist bei beiden beschriebenen Populationen die Anzahl der N-Nukleotide gegenüber dem adulten Gegenpart verringert. Allerdings existieren auch einige Unterschiede. So proliferieren CD27<sup>dull</sup> B-Zellen weniger als CD27<sup>bright</sup> B-Zellen und differenzieren weniger effizient zu Plasmablasten. Darüber hinaus ist der Anteil von CD27<sup>dull</sup> B-Zellen im Neugeborenen bei unter 3% (Grimsholm et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit lag der Anteil von putativen Gedächtnis-B-Zellen jedoch bei ca. 50%. Daher ist es unwahrscheinlich, dass beide beschriebenen Populationen im Neugeborenen identisch sind. Jedoch zeigt sich auch in dieser Publikation, dass Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen nicht völlig abwesend sind.

## 4.6 Neugeborene B-Zellen unterscheiden sich in ihrer Chromatinzugänglichkeit

Um zu verstehen, wie tiefgreifend die Unterschiede zwischen neonatalen und adulten B-Zellen sind, wurden epigenetische Analysen auf Einzelzellebene durchgeführt. Hierdurch kann bspw. über offene Chromatinstrukturen geklärt werden, ob sich Zellen mit unterschiedlichen Genexpressionsprofilen beispielsweise durch verschiedene Aktivitätszustände oder durch irreversible Veränderung in der Genregulation voneinander unterscheiden (Granja et al. 2019; Gontarz et al. 2020). Dass Chromatinsignaturen während der Embryonalentwicklung dynamischen Veränderungen unterliegen, konnte bereits in Studien gezeigt werden (Bogdanovic et al. 2012). Ebenso spielt die Epigenetik bei der Entwicklung sowie der Differenzierung von B-Zellen eine wichtige Rolle (Maier et al. 2004; Li et al. 2018; Koohy et al. 2018).

Es zeigte sich, dass auch auf Ebene von Kern-RNA sowohl bei UCB-B-Zellen als auch bei adulten PB-B-Zellen nach Integration putative Gedächtnis- und naive Populationen identifiziert werden konnten. Dies bestätigte die Ergebnisse der vergleichenden Genexpressionsanalyse auf Einzelzellebene zuvor (Abschnitt 3.3). Bei der vergleichenden Analyse der Chromatinzugänglichkeitsmuster sowie der kombinierten vergleichenden Analyse von Kern-RNA-Expression und Chromatinzugänglichkeit zeigten sich in einer UMAP-Darstellung keine starken Unterschiede zwischen neonatalen und erwachsenen B-Zellen. Aus diesem Grund wurden auch hier Gedächtnis- und naive B-Zellen unabhängig voneinander analysiert.

Bei naiven B-Zellen zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Chromatinverfügbarkeiten bei UCB-B-Zellen und ihrem adulten Gegenpart. Bei der kombinierten Analyse von Kern-RNA-Expression und Chromatinverfügbarkeit waren marginale Unterschiede bei der Zusammensetzung der Cluster zu beobachten. Die Grundstruktur der Cluster blieb jedoch auch hier identisch. Dies lässt den Schluss zu, dass die Unterschiede, die funktionell bei naiven neonatalen und adulten B-Zellen beobachtet wurden, zu einem großen Teil durch Effekte auf Genexpressionsebene und nicht durch Mechanismen wie Genregulation zustande kommen.

Bei der separaten epigenetischen Analyse von Gedächtnis-B-Zellen waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Adulte Spender zeigten ein breites Profil von Zellen mit unterschiedlichen Mustern von Chromatinzugänglichkeit. Dieses Muster war in Ansätzen auch bereits im neonatalen Gegenpart existent. Dies spricht dafür, dass auch in Neugeborenen heterogene putative Gedächtnis-B-Zell-Population vorliegen könnten, was sich mit den Genexpressionsdaten, die bereits vorher diskutiert wurden, deckt (Abschnitt 4.5). Bei der vergleichenden Analyse der Kombination von Chromatinverfügbarkeit und Kern-RNA-Expression bei adulten und neonatalen Spendern zeigten sich sehr große Unterschiede. Während bei neonatalen hier lediglich ein dominantes Cluster existierte, waren bei adulten bis zu vier Cluster mit einer hohen Zahl an Mitgliedern zu beobachten. Die Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Gedächtnis-B-zellen scheinen daher nicht nur auf Genexpressionsebene vorhanden zu sein, sondern zusätzlich auf Ebene des Chromatins. Das in Neugeborenen dominante Cluster 0 könnte, wie bereits in der Genexpressionsanalyse (3.3) diskutiert, Zellen enthalten, die in einem sehr frühen Stadium ihrer Entwicklung stehen.

#### **4.7 Putative naive und Gedächtnis-B-Zellen in Neugeborenen zeigen ähnliche Proliferationseigenschaften**

Die ermittelten Muster an Oberflächenproteinen für die putativen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Populationen bei neonatalen B-Zellen waren in der *Infinity Flow* Analyse in sich konsistent. So war der identifizierte putative Marker für naive Zellen, CD73, auf Zellen Ko-exprimiert, die CD23, einen in der Literatur beschriebenen Marker für naive B-Zellen, ausprägten. Das gleiche galt ebenso für putative Gedächtnis-B-Zell-Marker.

Durch durchflusszytometrische Untersuchungen der verschiedenen Marker konnte eine *Gating*-Strategie entwickelt werden, welche die Isolierung der putativen naiven und Gedächtnis-B-Zell-Populationen bei UCB-B-Zellen und zur Kontrolle auch bei adulten PB-B-Zellen ermöglichte.

Bei funktionellen Studien zeigten sich beim Proliferationsverhalten, wie bei vorherigen Analysen (Abschnitt 3.1), große Unterschiede zwischen adulten und neonatalen B-

Zellen. Jedoch waren keine Unterschiede bei der Proliferation zwischen den putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen festzustellen. Dies kann mehrere Ursachen haben. CD73, der putative naive Marker, erfüllt beispielsweise vielfältige Funktionen, die sich direkt auf die Funktionalität von Zellen auswirken können. So besitzt das Protein enzymatische und nicht-enzymatische Eigenschaften (Zhi et al. 2007; Stagg und Smyth 2010; Ghiringhelli et al. 2012). Zusammen mit CD39 ist CD73 von entscheidender Bedeutung bei Adenosin-Signalwegen, welche auch im Rahmen von Immunantworten eine Rolle spielen (Kaku et al. 2014). Darüber hinaus existieren Studien, die quantitative Unterschiede in der Ausprägung von CD73 bei neonatalen B-Zellen und adulten PB-B-Zellen beschreiben (Pettengill und Levy 2016). Ein weiterer Grund für die ähnlichen Proliferationseigenschaften könnte sein, dass detektierbare funktionelle Unterschiede erst in späteren Entwicklungsphasen auftreten können.

#### **4.8 Über die Produktion von klonotypischen Antikörpern aus Neugeborenen können Rückschlüsse auf die Spezifität dieser Antikörper gewonnen werden**

Die Etablierung einer Methode zur Produktion von rekombinanten humanen Antikörpern war erfolgreich. Dies wurde zum einen durch Coomassie-Färbungen und zum anderen durch Western Blot Analysen validiert (Abschnitt 3.6). Bei der Coomassie-Färbung zeigten sich nach Denaturierung des Produkts zwei Banden mit einer Molekülmasse, die exakt der von denaturiertem IgG entspricht (Mestecky 1972). Da Coomassie-Färbungen jedoch unspezifisch sind, könnten auch Proteine mit gleicher Molekülmasse gefärbt und fälschlicherweise als IgG interpretiert worden sein. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können, wurden daher Western Blots mit polyklonalen Antikörpern, die spezifisch IgG binden, durchgeführt. Hier zeigten sich ebenfalls Banden. Eine Produktion von IgG war demnach erfolgreich. Jedoch waren mehr als die zwei erwarteten Proteinbanden (schwere und leichte Kette) beobachtbar. Einer der Gründe hierfür könnte sein, dass IgG nicht komplett denaturiert wurde und daher beispielsweise noch schwere und leichte Kette verbunden sein könnten. Die Molekülmasse der aufgetrennten Proteine unterstützt diese These (van Eyk et al. 1967; Chiu et al. 2019).

Durch die Produktion von rekombinanten klonotypischen humanen Antikörpern ergeben sich mehrere Anwendungsmöglichkeiten für die Antwort auf einige vorangegangenen Fragestellungen. So ist bspw. die Spezifität von klonotypischen Antikörpern von Interesse. Die Existenz von klonotypischen Antikörpern als solche ist bei neonatalen nicht naheliegend. Klonotypen entstehen durch Affinitätsreifung bei Individuen, die mit ähnlichen oder identischen Antigenen konfrontiert wurden. Neugeborene haben jedoch keine affinitätsgereiften Antikörper. Das Vorhandensein von solchen Antikörpern könnte daher evolutionäre Gründe haben, was bereits für BCRs diskutiert wurde. So konnte bspw. gezeigt werden, dass in Mäusen angereicherte BCRs vorliegen, obwohl keine Infektion stattfand (Nowosad et al. 2020). Zudem existieren Studien, die zeigen, dass in der frühkindlichen Entwicklung Autoantigene von Bedeutung sind, welche das Repertoire bei Neugeborenen beeinflussen können (Merbl et al. 2007). Darüber hinaus gibt es Studien, die eine Verbindung von Autoreaktivität und kommensalen Bakterien bei Neugeborenen beschreiben (Chen et al. 2020).

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beinhaltet Arbeiten, die zur Klärung der Zusammensetzung des B-Zell-Pools sowie zu dessen Funktionalität bei Neugeborenen beitragen. Darüber hinaus wurden Erkenntnisse über die Transition von einem neonatalen, frühkindlichen B-Zell-Immunsystem zu einem adulten gewonnen.

Das Immunsystem von Neugeborenen ist als ineffektiv und unreif beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das neonatale B-Zell-Pool einen hohen Anteil an reifen B-Zellen besitzt, die in der Lage sind, ausgeprägte Immunantworten hervorzurufen. Insbesondere T-Zell-unabhängige Stimuli zogen intensive Reaktionen nach sich, die sogar stärker ausfielen als beim adulten Gegenpart. Für eine ausführliche Analyse von einzelnen B-Zell-Populationen im Neugeborenen und Erwachsenen sowie der Transition des Immunsystems von neonatal zu adult wurden vergleichende Einzelzellanalysen (auf Transkriptions-Epigenetischer und Proteinebene) mehrerer Altersstufen (0 bis 30 Jahre) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Ausreifung eines adulten B-Zell-Immunsystems bis zu 10 Jahre in Anspruch nimmt. Hierbei waren sowohl altersabhängige Dynamiken im naiven als auch im Gedächtnis-B-Zell-Kompartiment zu beobachten. Im naiven Pool existieren im Neugeborenen zwei distinkte B-Zell-Populationen, von denen eine sukzessive im Altersverlauf abnimmt, bis diese in Erwachsenen kaum noch nachzuweisen ist. Erklärungen hierfür könnten verschiedene B-Zell-Linien sein. Bei der Analyse des Gedächtnis-Pools zeigte sich überraschenderweise, dass auch im Neugeborenen B-Zellen existieren, die eine Gedächtnis-Signatur aufweisen, jedoch keine Anzeichen von Affinitätsreifung oder Klassenwechsel zeigen. Die am wenigsten „ausgereifte“ Population im Gedächtnis-B-Zell-Pool verringerte sich zunehmend mit dem Alter. Interessanterweise konnten Zellen dieser mit dem Alter abnehmenden Populationen zu allen bekannten Gedächtnis-Subsets differenzieren. Insofern könnten sich diese Zellen in einem sehr frühen Stadium der Gedächtnisreifung befinden. Auch auf epigenetischer Ebene zeigten sich Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Gedächtnis B-Zellen. Schließlich wurde eine Pipeline für die Synthese humaner rekombinanter Antikörper etabliert.



## 6 Summary

The present dissertation included work that contributes to clarifying the composition of the B-cell pool as well as its functionality in newborns. In addition, insights were gained into the transition from a neonatal, early childhood B-cell immune system to an adult one.

The immune system of newborns is described as ineffective and immature. However, this work showed that the neonatal B-cell pool has a high proportion of mature B-cells capable of eliciting pronounced immune responses. In particular, T-cell-independent stimuli elicited intense reactions that were even stronger than in the adult counterpart. For a detailed analysis of individual B-cell populations in newborns and adults, as well as the transition of the immune system from neonatal to adult, comparative single-cell analyses (on transcriptional, epigenetic, and protein levels) of several age groups (0 to 30 years) were performed. It turned out that the maturation of an adult B-cell immune system takes up to 10 years. Both age-dependent dynamics in the naïve and memory B-cell compartment could be observed. In the naïve pool, two distinct B-cell populations exist in newborns, one of which gradually decreases with age until it is hardly detectable in adults. Possible explanations for this could be different B-cell lineages. In the analysis of the memory pool, surprisingly, it was shown that B-cells with a memory signature also exist in newborns but show no signs of affinity maturation or class switching. The least "mature" population in the memory B cell pool decreased with age. Interestingly, cells of these decreasing populations could differentiate into all known memory subsets. Therefore, these cells could be in a very early stage of memory maturation. Differences between neonatal and adult memory B-cells were also observed on an epigenetic level. Finally, a pipeline for the synthesis of human recombinant antibodies was established.

## 7 Ausblick

Die epigenetischen ATAC-Analysen mittels der *10x Genomics* Plattform sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht komplett abgeschlossen. Ferner müssen hier mitunter zusätzliche Daten mit weiteren Altersstufen generiert werden, um mögliche Transitionen genauer bestimmen zu können.

Darüber hinaus sind tiefergehende Analysen der Funktionalität der putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei Neugeborenen noch anzustellen. Diese könnten neben dem Proliferationsverhalten weitere Parameter wie die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Zellen, die Sezernierung von Antikörpern selbst, das Apoptoseverhalten und mögliche metabolische Versuche, beispielsweise über den *Seahorse*-Assay beinhalten.

Nach erfolgreicher Trennung der putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei Neugeborenen sollten beide Populationen separat durch *Bulk*-RNA-Sequenzierungen transkriptionell weiter charakterisiert werden.

Zukünftige Analysen könnten zusätzlich darauf abzielen, die einzelnen Subcluster der der putativen naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei Neugeborenen weiter aufzutrennen und zu isolieren und separat von den anderen Subclustern transkriptionell und funktionell zu charakterisieren.

Ein Nachteil der vorliegenden Arbeit war die geringe Zahl an Datensätzen. So konnten aufgrund der geringen Probenzahl keine allgemeingültigen statistisch robusten Erkenntnisse bezüglich der Entwicklung und Funktion des neonatalen Immunsystems und dessen Transition erfolgen, sondern nur erste Annahmen, die durch mehr Spender und engmaschigere Altersstufen validiert werden müssen.

Nach der Etablierung des Arbeitsablaufs zur Produktion humaner rekombinanter Antikörper könnten weitere Versuche erfolgen, in denen die Spezifität dieser Klonotypen ermittelt wird. Hierbei könnten erforscht werden, ob es sich beispielsweise um autoreaktive AKs handelt oder um welche die beispielsweise kommensale Bakterien erkennen. Ebenso könnten diese Kreuzreaktiv sein und beides erkennen.

**Literaturverzeichnis**

- Abughali, N.; Berger, M.; Tosi, M. F. (1994): Deficient total cell content of CR3 (CD11b) in neonatal neutrophils. In: *Blood* 83 (4), S. 1086–1092.
- Aderem, A.; Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. In: *Annual review of immunology* 17, S. 593–623. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593.
- Adkins, Becky; Leclerc, Claude; Marshall-Clarke, Stuart (2004): Neonatal adaptive immunity comes of age. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (7), S. 553–564. DOI: 10.1038/nri1394.
- AGARWAL, S. C. (1964): NOMENCLATURE FOR HUMAN IMMUNOGLOBULINS. In: *Bulletin of the World Health Organization* 30, S. 447–450.
- Akashi, K.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. In: *Nature* 404 (6774), S. 193–197. DOI: 10.1038/35004599.
- Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Alberts, Bruce; Wilson, John H.; Hunt, Tim (2008): Molecular biology of the cell. 5th ed. New York, London: Garland Science; Taylor & Francis [distributor].
- Al-Lazikani, B.; Lesk, A. M.; Chothia, C. (1997): Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. In: *Journal of Molecular Biology* 273 (4), S. 927–948. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1354.
- Allen, Christopher D. C.; Cyster, Jason G. (2008): Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. In: *Seminars in immunology* 20 (1), S. 14–25. DOI: 10.1016/j.smim.2007.12.001.
- Allende, Maria L.; Tuymetova, Galina; Lee, Bridgin G.; Bonifacino, Eliana; Wu, Yun-Ping; Proia, Richard L. (2010): S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (5), S. 1113–1124. DOI: 10.1084/jem.20092210.
- Allman, David; Pillai, Shiv (2008): Peripheral B cell subsets. In: *Current Opinion in Immunology* 20 (2), S. 149–157. DOI: 10.1016/j.coi.2008.03.014.

- Allman, David; Wilmore, Joel R.; Gaudette, Brian T. (2019): The continuing story of T-cell independent antibodies. In: *Immunological reviews* 288 (1), S. 128–135. DOI: 10.1111/imr.12754.
- Alugupalli, Kishore R.; Leong, John M.; Woodland, Robert T.; Muramatsu, Masamichi; Honjo, Tasuku; Gerstein, Rachel M. (2004): B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. In: *Immunity* 21 (3), S. 379–390. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.06.019.
- Alzari, P. M.; Lascombe, M. B.; Poljak, R. J. (1988): Three-dimensional structure of antibodies. In: *Annual review of immunology* 6, S. 555–580. DOI: 10.1146/annurev.iy.06.040188.003011.
- Amitai, Assaf; Mesin, Luka; Victora, Gabriel D.; Kardar, Mehran; Chakraborty, Arup K. (2017): A Population Dynamics Model for Clonal Diversity in a Germinal Center. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1693. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01693.
- Amlot, P.L; Hayes, A.E (1985): IMPAIRED HUMAN ANTIBODY RESPONSE TO THE THYMUS-INDEPENDENT ANTIGEN, DNP-FICOLL, AFTER SPLENECTOMY. In: *The Lancet* 325 (8436), S. 1008–1011. DOI: 10.1016/S0140-6736(85)91613-7.
- Angelin-Duclos, C.; Cattoretti, G.; Lin, K. I.; Calame, K. (2000): Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (10), S. 5462–5471. DOI: 10.4049/jimmunol.165.10.5462.
- Aran, Dvir; Looney, Agnieszka P.; Liu, Leqian; Wu, Esther; Fong, Valerie; Hsu, Austin et al. (2019): Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. In: *Nature immunology* 20 (2), S. 163–172. DOI: 10.1038/s41590-018-0276-y.
- Arnold, James N.; Wormald, Mark R.; Sim, Robert B.; Rudd, Pauline M.; Dwek, Raymond A. (2007): The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. In: *Annual review of immunology* 25, S. 21–50. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.
- Avery, Danielle T.; Deenick, Elissa K.; Ma, Cindy S.; Suryani, Santi; Simpson, Nicholas; Chew, Gary Y. et al. (2010): B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. In:

*The Journal of experimental medicine* 207 (1), S. 155–171. DOI:  
10.1084/jem.20091706.

Bankovich, Alexander J.; Raunser, Stefan; Juo, Z. Sean; Walz, Thomas; Davis, Mark M.; Garcia, K. Christopher (2007): Structural insight into pre-B cell receptor function. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5822), S. 291–294. DOI:  
10.1126/science.1139412.

Barnett, Burton E.; Ciocca, Maria L.; Goenka, Radhika; Barnett, Lisa G.; Wu, Junmin; Laufer, Terri M. et al. (2012): Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. In: *Science (New York, N.Y.)* 335 (6066), S. 342–344. DOI:  
10.1126/science.1213495.

Basso, Katia; Klein, Ulf; Niu, Huifeng; Stolovitzky, Gustavo A.; Tu, Yuhai; Califano, Andrea et al. (2004): Tracking CD40 signaling during germinal center development. In: *Blood* 104 (13), S. 4088–4096. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4291.

Batten, M.; Groom, J.; Cachero, T. G.; Qian, F.; Schneider, P.; Tschopp, J. et al. (2000): BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (10), S. 1453–1466. DOI:  
10.1084/jem.192.10.1453.

Baumgarth, Nicole (2011): The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (1), S. 34–46. DOI:  
10.1038/nri2901.

Beaudin, Anna E.; Forsberg, E. Camilla (2016): To B1a or not to B1a: do hematopoietic stem cells contribute to tissue-resident immune cells? In: *Blood* 128 (24), S. 2765–2769. DOI: 10.1182/blood-2016-10-697813.

Becht, Etienne; Tolstrup, Daniel; Dutertre, Charles-Antoine; Morawski, Peter A.; Campbell, Daniel J.; Ginhoux, Florent et al. (2021): High-throughput single-cell quantification of hundreds of proteins using conventional flow cytometry and machine learning. In: *Science advances* 7 (39), eabg0505. DOI: 10.1126/sciadv.abg0505.

Benner, R.; Hijmans, W.; Haaijman, J. J. (1981): The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. In: *Clinical and experimental immunology* 46 (1), S. 1–8.

Bernasconi, Nadia L.; Onai, Nobuyuki; Lanzavecchia, Antonio (2003): A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. In: *Blood* 101 (11), S. 4500–4504. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3569.

Bernasconi, Nadia L.; Traggiai, Elisabetta; Lanzavecchia, Antonio (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5601), S. 2199–2202. DOI: 10.1126/science.1076071.

Bertrand, F. E.; Billips, L. G.; Burrows, P. D.; Gartland, G. L.; Kubagawa, H.; Schroeder, H. W. (1997): Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. In: *Blood* 90 (2), S. 736–744.

Biram, Adi; Shulman, Ziv (2020): T cell help to B cells: Cognate and atypical interactions in peripheral and intestinal lymphoid tissues. In: *Immunological reviews* 296 (1), S. 36–47. DOI: 10.1111/imr.12890.

Black, Robert E.; Cousens, Simon; Johnson, Hope L.; Lawn, Joy E.; Rudan, Igor; Bassani, Diego G. et al. (2010): Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. In: *Lancet (London, England)* 375 (9730), S. 1969–1987. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1.

Blanco, Elena; Pérez-Andrés, Martín; Arriba-Méndez, Sonia; Contreras-Sanfeliciano, Teresa; Criado, Ignacio; Pelak, Ondrej et al. (2018): Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 141 (6), 2208-2219.e16. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.02.017.

Boehmer, Harald von; Melchers, Fritz (2010): Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. In: *Nature immunology* 11 (1), S. 14–20. DOI: 10.1038/ni.1794.

Bogdanovic, Ozren; Fernandez-Miñán, Ana; Tena, Juan J.; La Calle-Mustienes, Elisa de; Hidalgo, Carmen; van Kruysbergen, Ila et al. (2012): Dynamics of enhancer chromatin signatures mark the transition from pluripotency to cell specification during embryogenesis. In: *Genome research* 22 (10), S. 2043–2053. DOI: 10.1101/gr.134833.111.

Borcherding, Nicholas; Vishwakarma, Ajaykumar; Voigt, Andrew P.; Bellizzi, Andrew; Kaplan, Jacob; Nepple, Kenneth et al. (2021): Mapping the immune environment in clear cell renal carcinoma by single-cell genomics. In: *Communications biology* 4 (1), S. 122. DOI: 10.1038/s42003-020-01625-6.

BOŽIČ, BORUT; ČUČNIK, SAŠA; KVEDER, TANJA; ROZMAN, BLAŽ (2007): AFFINITY AND AVIDITY OF AUTOANTIBODIES. In: *Autoantibodies*: Elsevier, S. 21–28.

Brack, C.; Hirama, M.; Lenhard-Schuller, R.; Tonegawa, S. (1978): A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. In: *Cell* 15 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90078-8.

Braden, B. C.; Poljak, R. J. (1995): Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (1), S. 9–16. DOI: 10.1096/fasebj.9.1.7821765.

Bräuninger, Andreas; Goossens, Tina; Rajewsky, Klaus; Küppers, Ralf (2001): Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. In: *European journal of immunology* 31 (12), S. 3631–3637. DOI: 10.1002/1521-4141(200112)31:12<3631::AID-IMMU3631>3.0.CO;2-L.

Budeus, Bettina; Kibler, Artur; Brauser, Martina; Homp, Ekaterina; Bronischewski, Kevin; Ross, J. Alexander et al. (2021): Human Cord Blood B Cells Differ from the Adult Counterpart by Conserved Ig Repertoires and Accelerated Response Dynamics. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 206 (12), S. 2839–2851. DOI: 10.4049/jimmunol.2100113.

Budeus, Bettina; Schweigle de Reynoso, Stefanie; Przekopowicz, Martina; Hoffmann, Daniel; Seifert, Marc; Küppers, Ralf (2015): Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (38), E5281-9. DOI: 10.1073/pnas.1511270112.

Cabeza-Cabrerizo, Mar; Cardoso, Ana; Minutti, Carlos M.; Da Pereira Costa, Mariana; Reis e Sousa, Caetano (2021): Dendritic Cells Revisited. In: *Annual review of immunology* 39, S. 131–166. DOI: 10.1146/annurev-immunol-061020-053707.

- Callewaert, Lien; Michiels, Chris W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. In: *Journal of biosciences* 35 (1), S. 127–160. DOI: 10.1007/s12038-010-0015-5.
- Cariappa, Annaiah; Tang, Mei; Parng, Chuenlei; Nebelitskiy, Eugene; Carroll, Michael; Georgopoulos, Katia; Pillai, Shiv (2001): The Follicular versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision Is Regulated by Aiolos, Btk, and CD21. In: *Immunity* 14 (5), S. 603–615. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00135-2.
- Carsetti, R.; Köhler, G.; Lamers, M. C. (1995): Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. In: *The Journal of experimental medicine* 181 (6), S. 2129–2140. DOI: 10.1084/jem.181.6.2129.
- Chaplin, David D. (2006): 1. Overview of the human immune response. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 117 (2 Suppl Mini-Primer), S430-5. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.09.034.
- Chelvarajan, Ralph L.; Raithatha, Roheen; Venkataraman, Chandrasekar; Kaul, Rajat; Han, Seong-Su; Robertson, Darrell A.; Bondada, Subbarao (1999): CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. In: *European journal of immunology* 29 (9), S. 2808–2818. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2808::AID-IMMU2808>3.0.CO;2-E.
- Chen, Jeff W.; Rice, Tyler A.; Bannock, Jason M.; Bielecka, Agata A.; Strauss, Juliet D.; Catanzaro, Jason R. et al. (2020): Autoreactivity in naïve human fetal B cells is associated with commensal bacteria recognition. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6501), S. 320–325. DOI: 10.1126/science.aay9733.
- Chen, Jeff W.; Schickel, Jean-Nicolas; Tsakiris, Nikolaos; Sng, Joel; Arbogast, Florent; Bouis, Delphine et al. (2022): Positive and negative selection shape the human naive B cell repertoire. In: *The Journal of clinical investigation* 132 (2). DOI: 10.1172/JCI150985.
- Chen, Kang; Cerutti, Andrea (2010): New insights into the enigma of immunoglobulin D. In: *Immunological reviews* 237 (1), S. 160–179. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x.



- Chi, Xiyang; Li, Yue; Qiu, Xiaoyan (2020): V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. In: *Immunology* 160 (3), S. 233–247. DOI: 10.1111/imm.13176.
- Chiu, Mark L.; Goulet, Dennis R.; Teplyakov, Alexey; Gilliland, Gary L. (2019): Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. In: *Antibodies (Basel, Switzerland)* 8 (4). DOI: 10.3390/antib8040055.
- Chuchana, P.; Blancher, A.; Brockly, F.; Alexandre, D.; Lefranc, G.; Lefranc, M. P. (1990): Definition of the human immunoglobulin variable lambda (IGLV) gene subgroups. In: *European journal of immunology* 20 (6), S. 1317–1325. DOI: 10.1002/eji.1830200618.
- Chung, James B.; Silverman, Michael; Monroe, John G. (2003): Transitional B cells: step by step towards immune competence. In: *Trends in immunology* 24 (6), S. 343–349. DOI: 10.1016/S1471-4906(03)00119-4.
- Cook, G. P.; Tomlinson, I. M.; Walter, G.; Riethman, H.; Carter, N. P.; Buluwela, L. et al. (1994): A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. In: *Nature genetics* 7 (2), S. 162–168. DOI: 10.1038/ng0694-162.
- Cooper, M. D. (1981): Pre-B cells; normal and abnormal development. In: *Journal of clinical immunology* 1 (2), S. 81–89. DOI: 10.1007/BF00915383.
- Corbett, S. J.; Tomlinson, I. M.; Sonnhammer, E. L.; Buck, D.; Winter, G. (1997): Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. In: *Journal of Molecular Biology* 270 (4), S. 587–597. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1141.
- Crotty, Shane (2011): Follicular helper CD4 T cells (TFH). In: *Annual review of immunology* 29, S. 621–663. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
- Crotty, Shane; Felgner, Phil; Davies, Huw; Glidewell, John; Villarreal, Luis; Ahmed, Rafi (2003): Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (10), S. 4969–4973. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.4969.

- Dagan, Ron; Givon-Lavi, Noga; Zamir, Orly; Sikuler-Cohen, Merav; Guy, Lior; Janco, Jacob et al. (2002): Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. In: *The Journal of infectious diseases* 185 (7), S. 927–936. DOI: 10.1086/339525.
- Davi, F.; Faili, A.; Gritti, C.; Blanc, C.; Laurent, C.; Sutton, L. et al. (1997): Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. In: *Blood* 90 (10), S. 4014–4021.
- Defrance, Thierry; Taillardet, Morgan; Genestier, Laurent (2011): T cell-independent B cell memory. In: *Current Opinion in Immunology* 23 (3), S. 330–336. DOI: 10.1016/j.coi.2011.03.004.
- Deisenhofer, J. (1981): Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. In: *Biochemistry* 20 (9), S. 2361–2370.
- DiMeglio, Linda A.; Evans-Molina, Carmella; Oram, Richard A. (2018): Type 1 diabetes. In: *The Lancet* 391 (10138), S. 2449–2462. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
- Dorrington, K. J. (1976): Properties of the Fc receptor on macrophages. In: *Immunological communications* 5 (4), S. 263–280. DOI: 10.3109/08820137609044280.
- Duan, Byian; Morel, Laurence (2006): Role of B-1a cells in autoimmunity. In: *Autoimmunity reviews* 5 (6), S. 403–408. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.10.007.
- Duchamp, Marie; Sterlin, Delphine; Diabate, Aminata; Uring-Lambert, Béatrice; Guérin-El Khourouj, Valérie; Le Mauff, Brigitte et al. (2014): B-cell subpopulations in children: National reference values. In: *Immunity, inflammation and disease* 2 (3), S. 131–140. DOI: 10.1002/iid3.26.
- Duffy, Ken R.; Wellard, Cameron J.; Markham, John F.; Zhou, Jie H. S.; Holmberg, Ross; Hawkins, Edwin D. et al. (2012): Activation-induced B cell fates are selected by intracellular stochastic competition. In: *Science (New York, N.Y.)* 335 (6066), S. 338–341. DOI: 10.1126/science.1213230.

- Dzidic, Majda; Boix-Amorós, Alba; Selma-Royo, Marta; Mira, Alex; Collado, Maria Carmen (2018): Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate. In: *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 6 (3). DOI: 10.3390/medsci6030056.
- Enders, Anselm; Short, Alanna; Miosge, Lisa A.; Bergmann, Hannes; Sontani, Yovina; Bertram, Edward M. et al. (2014): Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (12), S. 4513–4518. DOI: 10.1073/pnas.1402739111.
- Eskeland, T.; Christensen, T. B. (1975): IgM molecules with and without J chain in serum and after purification, studied by ultracentrifugation, electrophoresis, and electron microscopy. In: *Scandinavian journal of immunology* 4 (3), S. 217–228. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1975.tb02620.x.
- Fagarasan, S.; Honjo, T. (2000): T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5489), S. 89–92. DOI: 10.1126/science.290.5489.89.
- Fairfax, Kirsten A.; Corcoran, Lynn M.; Pridans, Clare; Huntington, Nicholas D.; Kallies, Axel; Nutt, Stephen L.; Tarlinton, David M. (2007): Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (7), S. 4104–4111. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4104.
- Fazilleau, Nicolas; Eisenbraun, Michael D.; Malherbe, Laurent; Ebright, Jessica N.; Pogue-Caley, Rebecca R.; McHeyzer-Williams, Louise J.; McHeyzer-Williams, Michael G. (2007): Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. In: *Nature immunology* 8 (7), S. 753–761. DOI: 10.1038/ni1472.
- Forthal, Donald N. (2014): Functions of Antibodies. In: *Microbiology spectrum* 2 (4), AID-0019-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014.
- Francis, Dailia B.; Kozlov, Mikhail; Chavez, Jose; Chu, Jennifer; Malu, Shruti; Hanna, Mary; Cortes, Patricia (2014): DNA Ligase IV regulates XRCC4 nuclear localization. In: *DNA repair* 21, S. 36–42. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.05.010.
- Franco, Christopher B.; Chen, Ching-Cheng; Drukker, Micha; Weissman, Irving L.; Galli, Stephen J. (2010): Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at

- the single-cell level. In: *Cell stem cell* 6 (4), S. 361–368. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.013.
- Frank, M. M.; Fries, L. F. (1991): The role of complement in inflammation and phagocytosis. In: *Immunology Today* 12 (9), S. 322–326. DOI: 10.1016/0167-5699(91)90009-I.
- Frippiat, J. P.; Lefranc, M. P. (1994): Genomic organisation of 34 kb of the human immunoglobulin lambda locus (IGLV): restriction map and sequences of new V lambda III genes. In: *Molecular immunology* 31 (9), S. 657–670. DOI: 10.1016/0161-5890(94)90175-9.
- Fritz, Jörg H.; Ferrero, Richard L.; Philpott, Dana J.; Girardin, Stephen E. (2006): Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. In: *Nature immunology* 7 (12), S. 1250–1257. DOI: 10.1038/ni1412.
- Fujiwara, Nagatoshi; Kobayashi, Kazuo (2005): Macrophages in inflammation. In: *Current drug targets. Inflammation and allergy* 4 (3), S. 281–286. DOI: 10.2174/1568010054022024.
- Gallo, Richard L.; Hooper, Lora V. (2012): Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (7), S. 503–516. DOI: 10.1038/nri3228.
- Garside, P.; Ingulli, E.; Merica, R. R.; Johnson, J. G.; Noelle, R. J.; Jenkins, M. K. (1998): Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373), S. 96–99. DOI: 10.1126/science.281.5373.96.
- Ghiringhelli, François; Bruchard, Mélanie; Chalmin, Fanny; Rébé, Cédric (2012): Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, S. 473712. DOI: 10.1155/2012/473712.
- Gitlin, Alexander D.; Mayer, Christian T.; Oliveira, Thiago Y.; Shulman, Ziv; Jones, Mathew J. K.; Koren, Amnon; Nussenzweig, Michel C. (2015): HUMORAL IMMUNITY. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 349 (6248), S. 643–646. DOI: 10.1126/science.aac4919.

- Glanville, Jacob; Zhai, Wenwu; Berka, Jan; Telman, Dilduz; Huerta, Gabriella; Mehta, Gautam R. et al. (2009): Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48), S. 20216–20221. DOI: 10.1073/pnas.0909775106.
- Godfrey, Dale I.; Zlotnik, Albert (1993): Control points in early T-cell development. In: *Immunology Today* 14 (11), S. 547–553. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90186-O.
- Gontarz, Paul; Fu, Shuhua; Xing, Xiaoyun; Liu, Shaopeng; Miao, Benpeng; Bazyljanska, Viktoriia et al. (2020): Comparison of differential accessibility analysis strategies for ATAC-seq data. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 10150. DOI: 10.1038/s41598-020-66998-4.
- Gonzalez, Hugo; Hagerling, Catharina; Werb, Zena (2018): Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. In: *Genes & development* 32 (19-20), S. 1267–1284. DOI: 10.1101/gad.314617.118.
- Good, Kim L.; Avery, Danielle T.; Tangye, Stuart G. (2009): Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (2), S. 890–901. DOI: 10.4049/jimmunol.182.2.890.
- Good, Kim L.; Tangye, Stuart G. (2007): Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33), S. 13420–13425. DOI: 10.1073/pnas.0703872104.
- Granja, Jeffrey M.; Klemm, Sandy; McGinnis, Lisa M.; Kathiria, Arwa S.; Mezger, Anja; Corces, M. Ryan et al. (2019): Single-cell multiomic analysis identifies regulatory programs in mixed-phenotype acute leukemia. In: *Nature biotechnology* 37 (12), S. 1458–1465. DOI: 10.1038/s41587-019-0332-7.
- Granoff, D. M.; Gupta, R. K.; Belshe, R. B.; Anderson, E. L. (1998): Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. In: *The Journal of infectious diseases* 178 (3), S. 870–874. DOI: 10.1086/515346.

- Grey, H. M.; Abel, C. A.; Zimmerman, B. (1971): Structure of IgA proteins. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 190, S. 37–48. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1971.tb13522.x.
- Griffin, Daniel O.; Holodick, Nichol E.; Rothstein, Thomas L. (2011): Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (1), S. 67–80. DOI: 10.1084/jem.20101499.
- Grimsholm, Ola; Piano Mortari, Eva; Davydov, Alexey N.; Shugay, Mikhail; Obraztsova, Anna S.; Bocci, Chiara et al. (2020): The Interplay between CD27dull and CD27bright B Cells Ensures the Flexibility, Stability, and Resilience of Human B Cell Memory. In: *Cell reports* 30 (9), 2963-2977.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.02.022.
- Gros, Piet; Milder, Fin J.; Janssen, Bert J. C. (2008): Complement driven by conformational changes. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (1), S. 48–58. DOI: 10.1038/nri2231.
- Guilliams, Martin; Bruhns, Pierre; Saeys, Yvan; Hammad, Hamida; Lambrecht, Bart N. (2014): The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (2), S. 94–108. DOI: 10.1038/nri3582.
- Guilmot, Aline; Hermann, Emmanuel; Braud, Véronique M.; Carlier, Yves; Truyens, Carine (2011): Natural killer cell responses to infections in early life. In: *Journal of innate immunity* 3 (3), S. 280–288. DOI: 10.1159/000323934.
- Hadley, Wickham (2016): Ggplot2. Elegant graphics for data analysis. Second edition. Switzerland: Springer (Use R!).
- Hammarlund, Erika; Thomas, Archana; Amanna, Ian J.; Holden, Lindsay A.; Slayden, Ov D.; Park, Byung et al. (2017): Plasma cell survival in the absence of B cell memory. In: *Nature communications* 8 (1), S. 1781. DOI: 10.1038/s41467-017-01901-w.
- Hartley, S. B.; Cooke, M. P.; Fulcher, D. A.; Harris, A. W.; Cory, S.; Basten, A.; Goodnow, C. C. (1993): Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. In: *Cell* 72 (3), S. 325–335. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90111-3.

- Hartley, S. B.; Crosbie, J.; Brink, R.; Kantor, A. B.; Basten, A.; Goodnow, C. C. (1991): Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. In: *Nature* 353 (6346), S. 765–769. DOI: 10.1038/353765a0.
- Hauser, Jannek; Grundström, Christine; Grundström, Thomas (2014): Allelic exclusion of IgH through inhibition of E2A in a VDJ recombination complex. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (5), S. 2460–2470. DOI: 10.4049/jimmunol.1302216.
- Hayakawa, K.; Hardy, R. R.; Herzenberg, L. A. (1986a): Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. In: *European journal of immunology* 16 (4), S. 450–456. DOI: 10.1002/eji.1830160423.
- Hayakawa, K.; Hardy, R. R.; Parks, D. R.; Herzenberg, L. A. (1983): The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. In: *The Journal of experimental medicine* 157 (1), S. 202–218. DOI: 10.1084/jem.157.1.202.
- Hayakawa, K.; Hardy, R. R.; Stall, A. M.; Herzenberg, L. A. (1986b): Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. In: *European journal of immunology* 16 (10), S. 1313–1316. DOI: 10.1002/eji.1830161021.
- Heesters, Balthasar A.; Myers, Riley C.; Carroll, Michael C. (2014): Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (7), S. 495–504. DOI: 10.1038/nri3689.
- Henderson, R. A.; Watkins, S. C.; Flynn, J. L. (1997): Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (2), S. 635–643.
- Hieter, P. A.; Korsmeyer, S. J.; Waldmann, T. A.; Leder, P. (1981): Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. In: *Nature* 290 (5805), S. 368–372. DOI: 10.1038/290368a0.
- Hirayama, Daisuke; Iida, Tomoya; Nakase, Hiroshi (2017): The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. In: *International journal of molecular sciences* 19 (1). DOI: 10.3390/ijms19010092.
- Honjo, T.; Nakai, S.; Nishida, Y.; Kataoka, T.; Yamawaki-Kataoka, Y.; Takahashi, N. et al. (1981): Rearrangements of immunoglobulin genes during differentiation and

- evolution. In: *Immunological reviews* 59, S. 33–67. DOI: 10.1111/j.1600-065X.1981.tb00455.x.
- Hornef, M.; Penders, J. (2017): Does a prenatal bacterial microbiota exist? In: *Mucosal immunology* 10 (3), S. 598–601. DOI: 10.1038/mi.2016.141.
- Hosea, S. W.; Brown, E. J.; Frank, M. M. (1980): The critical role of complement in experimental pneumococcal sepsis. In: *The Journal of infectious diseases* 142 (6), S. 903–909. DOI: 10.1093/infdis/142.6.903.
- Huber, C.; Schäble, K. F.; Huber, E.; Klein, R.; Meindl, A.; Thiebe, R. et al. (1993): The V kappa genes of the L regions and the repertoire of V kappa gene sequences in the human germ line. In: *European journal of immunology* 23 (11), S. 2868–2875. DOI: 10.1002/eji.1830231121.
- Ichihara, Y.; Matsuoka, H.; Kurosawa, Y. (1988): Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. In: *The EMBO journal* 7 (13), S. 4141–4150. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03309.x.
- Ichii, Michiko; Oritani, Kenji; Kanakura, Yuzuru (2014): Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. In: *World journal of stem cells* 6 (4), S. 421–431. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.421.
- IJspeert, Hanna; van Schouwenburg, Pauline A.; van Zessen, David; Pico-Knijnenburg, Ingrid; Driessen, Gertjan J.; Stubbs, Andrew P.; van der Burg, Mirjam (2016): Evaluation of the Antigen-Experienced B-Cell Receptor Repertoire in Healthy Children and Adults. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 410. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00410.
- Inbar, D.; Hochman, J.; Givol, D. (1972): Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (9), S. 2659–2662. DOI: 10.1073/pnas.69.9.2659.
- Inoue, Takeshi; Moran, Imogen; Shinnakasu, Ryo; Phan, Tri Giang; Kurosaki, Tomohiro (2018): Generation of memory B cells and their reactivation. In: *Immunological reviews* 283 (1), S. 138–149. DOI: 10.1111/imr.12640.



- Jaenichen, H. R.; Pech, M.; Lindenmaier, W.; Wildgruber, N.; Zachau, H. G. (1984): Composite human VK genes and a model of their evolution. In: *Nucleic acids research* 12 (13), S. 5249–5263. DOI: 10.1093/nar/12.13.5249.
- Janeway, Charles A.; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annual review of immunology* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- Janssen, Bert J. C.; Huizinga, Eric G.; Raaijmakers, Hans C. A.; Roos, Anja; Daha, Mohamed R.; Nilsson-Ekdahl, Kristina et al. (2005): Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. In: *Nature* 437 (7058), S. 505–511. DOI: 10.1038/nature04005.
- Jeske, D. J.; Jarvis, J.; Milstein, C.; Capra, J. D. (1984): Junctional diversity is essential to antibody activity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (3), S. 1090–1092.
- Kabashima, Kenji; Haynes, Nicole M.; Xu, Ying; Nutt, Stephen L.; Allende, Maria L.; Proia, Richard L.; Cyster, Jason G. (2006): Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (12), S. 2683–2690. DOI: 10.1084/jem.20061289.
- Kageyama, Yuki; Katayama, Naoyuki (2020): Ontogeny of human B1 cells. In: *International journal of hematology* 111 (5), S. 628–633. DOI: 10.1007/s12185-019-02775-y.
- Kaku, Hiroaki; Cheng, Kai Fan; Al-Abed, Yousef; Rothstein, Thomas L. (2014): A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (12), S. 5904–5913. DOI: 10.4049/jimmunol.1400336.
- Kaur, Kulwant; Chowdhury, Shimul; Greenspan, Neil S.; Schreiber, John R. (2007): Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. In: *Blood* 110 (8), S. 2948–2954. DOI: 10.1182/blood-2007-01-069245.
- Kawashima, I.; Hudson, S. J.; Tsai, V.; Southwood, S.; Takesako, K.; Appella, E. et al. (1998): The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid

- epithelial tumors. In: *Human immunology* 59 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/S0198-8859(97)00255-3.
- Kepler, T. B.; Perelson, A. S. (1993): Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. In: *Immunology Today* 14 (8), S. 412–415. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90145-B.
- Keyt, Bruce A.; Baliga, Ramesh; Sinclair, Angus M.; Carroll, Stephen F.; Peterson, Marvin S. (2020): Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. In: *Antibodies (Basel, Switzerland)* 9 (4). DOI: 10.3390/antib9040053.
- Khodadadi, Laleh; Cheng, Qingyu; Radbruch, Andreas; Hiepe, Falk (2019): The Maintenance of Memory Plasma Cells. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 721. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00721.
- Kim, C. H.; Rott, L. S.; Clark-Lewis, I.; Campbell, D. J.; Wu, L.; Butcher, E. C. (2001): Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (12), S. 1373–1381. DOI: 10.1084/jem.193.12.1373.
- Kindt, Thomas J.; Osborne, Barbara Anne; Goldsby, Richard A.; Kuby, Janis (2007): Kuby immunology. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. 6th ed. New York: W.H. Freeman.
- King, Cecile (2009): New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (11), S. 757–766. DOI: 10.1038/nri2644.
- Kitano, Masahiro; Moriyama, Saya; Ando, Yoshikazu; Hikida, Masaki; Mori, Yasuo; Kurosaki, Tomohiro; Okada, Takaharu (2011): Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. In: *Immunity* 34 (6), S. 961–972. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.03.025.
- Klein, U.; Küppers, R.; Rajewsky, K. (1997): Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. In: *Blood* 89 (4), S. 1288–1298.
- Klein, U.; Rajewsky, K.; Küppers, R. (1998): 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. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (9), S. 1679–1689. DOI: 10.1084/jem.188.9.1679.

Klobeck, H. G.; Meindl, A.; Combriato, G.; Solomon, A.; Zachau, H. G. (1985): Human immunoglobulin kappa light chain genes of subgroups II and III. In: *Nucleic acids research* 13 (18), S. 6499–6513. DOI: 10.1093/nar/13.18.6499.

Kobayashi, Michihiro; Lin, Yang; Mishra, Akansha; Shelly, Chris; Gao, Rui; Reeh, Colton W. et al. (2020): Bmi1 Maintains the Self-Renewal Property of Innate-like B Lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 204 (12), S. 3262–3272. DOI: 10.4049/jimmunol.2000030.

Kollmann, Tobias R.; Marchant, Arnaud; Way, Sing Sing (2020): Vaccination strategies to enhance immunity in neonates. In: *Science (New York, N.Y.)* 368 (6491), S. 612–615. DOI: 10.1126/science.aaz9447.

König, R.; Huang, L. Y.; Germain, R. N. (1992): MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. In: *Nature* 356 (6372), S. 796–798. DOI: 10.1038/356796a0.

Koohy, Hashem; Bolland, Daniel J.; Matheson, Louise S.; Schoenfelder, Stefan; Stellato, Claudia; Dimond, Andrew et al. (2018): Genome organization and chromatin analysis identify transcriptional downregulation of insulin-like growth factor signaling as a hallmark of aging in developing B cells. In: *Genome biology* 19 (1), S. 126. DOI: 10.1186/s13059-018-1489-y.

Kräutler, Nike J.; Suan, Dan; Butt, Danyal; Bourne, Katherine; Hermes, Jana R.; Chan, Tyani D. et al. (2017): Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. In: *The Journal of experimental medicine* 214 (5), S. 1259–1267. DOI: 10.1084/jem.20161533.

Kreslavsky, Taras; Vilagos, Bojan; Tagoh, Hiromi; Poliakova, Daniela Kostanova; Schwickert, Tanja A.; Wöhner, Miriam et al. (2017): Essential role for the transcription factor Bhlhe41 in regulating the development, self-renewal and BCR repertoire of B-1a cells. In: *Nature immunology* 18 (4), S. 442–455. DOI: 10.1038/ni.3694.

Kristiansen, Trine A.; Vanhee, Stijn; Yuan, Joan (2018): The influence of developmental timing on B cell diversity. In: *Current Opinion in Immunology* 51, S. 7–13. DOI: 10.1016/j.coi.2017.12.005.

- Kruschinski, Carsten; Zidan, Mohamed; Debertin, Anette S.; Hörsten, Stephan von; Pabst, Reinhard (2004): Age-dependent development of the splenic marginal zone in human infants is associated with different causes of death. In: *Human pathology* 35 (1), S. 113–121. DOI: 10.1016/S0046-8177(03)00422-2.
- Krystel-Whittemore, Melissa; Dileepan, Kottarappat N.; Wood, John G. (2015): Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 620. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00620.
- Lafaille, J. J.; DeCloux, A.; Bonneville, M.; Takagaki, Y.; Tonegawa, S. (1989): Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. In: *Cell* 59 (5), S. 859–870. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90609-0.
- Landau, N. R.; Schatz, D. G.; Rosa, M.; Baltimore, D. (1987): Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. In: *Molecular and cellular biology* 7 (9), S. 3237–3243. DOI: 10.1128/mcb.7.9.3237-3243.1987.
- Langrish, C. L.; Buddle, J. C.; Thrasher, A. J.; Goldblatt, D. (2002): Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. In: *Clinical and experimental immunology* 128 (1), S. 118–123. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01817.x.
- Lanier, Lewis L. (2005): NK cell recognition. In: *Annual review of immunology* 23, S. 225–274. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
- Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica (2001): Regulation of T Cell Immunity by Dendritic Cells. In: *Cell* 106 (3), S. 263–266. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00455-x.
- LeBien, Tucker W. (2000): Fates of human B-cell precursors. In: *Blood* 96 (1), S. 9–23. DOI: 10.1182/blood.V96.1.9.
- LeBien, Tucker W.; Tedder, Thomas F. (2008): B lymphocytes: how they develop and function. In: *Blood* 112 (5), S. 1570–1580. DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071.
- Lee, Jisoo; Kuchen, Stefan; Fischer, Randy; Chang, Sooghee; Lipsky, Peter E. (2009): Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (7), S. 4116–4126. DOI: 10.4049/jimmunol.0803391.

- Lefranc, M. P. (2001): IMGT, the international ImMunoGeneTics database. In: *Nucleic acids research* 29 (1), S. 207–209. DOI: 10.1093/nar/29.1.207.
- Li, Guideng; So, Alex Yick-Lun; Sookram, Reeshelle; Wong, Stephanie; Wang, Jessica K.; Ouyang, Yong et al. (2018): Epigenetic silencing of miR-125b is required for normal B-cell development. In: *Blood* 131 (17), S. 1920–1930. DOI: 10.1182/blood-2018-01-824540.
- Liang, T.Chyau (1998): Epitopes. In: *Encyclopedia of Immunology*: Elsevier, S. 825–827.
- Lin, Ang; Loré, Karin (2017): Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1781. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01781.
- Liu, Y. J.; Barthélémy, C.; Bouteiller, O. de; Arpin, C.; Durand, I.; Banchereau, J. (1995): Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. In: *Immunity* 2 (3), S. 239–248. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90048-9.
- Liu, Y. J.; Joshua, D. E.; Williams, G. T.; Smith, C. A.; Gordon, J.; MacLennan, I. C. (1989): Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. In: *Nature* 342 (6252), S. 929–931. DOI: 10.1038/342929a0.
- Loder, F.; Mutschler, B.; Ray, R. J.; Paige, C. J.; Sideras, P.; Torres, R. et al. (1999): B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. In: *The Journal of experimental medicine* 190 (1), S. 75–89. DOI: 10.1084/jem.190.1.75.
- Loken, M. R.; Shah, V. O.; Dattilio, K. L.; Civin, C. I. (1987): Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. In: *Blood* 70 (5), S. 1316–1324.
- Lowin, B.; Hahne, M.; Mattmann, C.; Tschopp, J. (1994): Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. In: *Nature* 370 (6491), S. 650–652. DOI: 10.1038/370650a0.
- Maarof, Ghyath; Bouchet-Delbos, Laurence; Gary-Gouy, Hélène; Durand-Gasselín, Ingrid; Krzysiek, Roman; Dalloul, Ali (2010): Interleukin-24 inhibits the plasma cell differentiation program in human germinal center B cells. In: *Blood* 115 (9), S. 1718–1726. DOI: 10.1182/blood-2009-05-220251.

- Mackay, Fabienne; Schneider, Pascal; Rennert, Paul; Browning, Jeffrey (2003): BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. In: *Annual review of immunology* 21, S. 231–264. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141152.
- MacLennan, Ian C. M.; Toellner, Kai-Michael; Cunningham, Adam F.; Serre, Karine; Sze, Daniel M-Y; Zúñiga, Elina et al. (2003): Extrafollicular antibody responses. In: *Immunological reviews* 194, S. 8–18. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2003.00058.x.
- Maier, Holly; Ostraat, Rachel; Gao, Hua; Fields, Scott; Shinton, Susan A.; Medina, Kay L. et al. (2004): Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 1069–1077. DOI: 10.1038/ni1119.
- Mamani-Matsuda, Maria; Cosma, Antonio; Weller, Sandra; Faili, Ahmad; Staib, Caroline; Garçon, Loïc et al. (2008): The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. In: *Blood* 111 (9), S. 4653–4659. DOI: 10.1182/blood-2007-11-123844.
- Manz, R. A.; Löhning, M.; Cassese, G.; Thiel, A.; Radbruch, A. (1998): Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. In: *International immunology* 10 (11), S. 1703–1711. DOI: 10.1093/intimm/10.11.1703.
- Manz, R. A.; Thiel, A.; Radbruch, A. (1997): Lifetime of plasma cells in the bone marrow. In: *Nature* 388 (6638), S. 133–134. DOI: 10.1038/40540.
- Marchalonis, J. J. (1975): Lymphocyte surface immunoglobulins. In: *Science (New York, N.Y.)* 190 (4209), S. 20–29. DOI: 10.1126/science.1101378.
- Martin, F.; Oliver, A. M.; Kearney, J. F. (2001): Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. In: *Immunity* 14 (5), S. 617–629. DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00129-7.
- Matsuda, F.; Ishii, K.; Bourvagnet, P.; Kuma, K. i.; Hayashida, H.; Miyata, T.; Honjo, T. (1998): The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2151–2162. DOI: 10.1084/jem.188.11.2151.
- McHeyzer-Williams, Louise J.; Milpied, Pierre J.; Okitsu, Shinji L.; McHeyzer-Williams, Michael G. (2015): Class-switched memory B cells remodel BCRs within

- secondary germinal centers. In: *Nature immunology* 16 (3), S. 296–305. DOI: 10.1038/ni.3095.
- McInnes, Leland; Healy, John; Melville, James (2018): UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction.
- Meindl, A.; Klobeck, H. G.; Ohnheiser, R.; Zachau, H. G. (1990): The V kappa gene repertoire in the human germ line. In: *European journal of immunology* 20 (8), S. 1855–1863. DOI: 10.1002/eji.1830200834.
- Melamed, D.; Benschop, R. J.; Cambier, J. C.; Nemazee, D. (1998): Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. In: *Cell* 92 (2), S. 173–182. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80912-5.
- Melchers, Fritz (2005): The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (7), S. 578–584. DOI: 10.1038/nri1649.
- Melchers, Fritz; Boekel, Edwin ten; Seidl, Thomas; Kong, Xian Chu; Yamagami, Tamotsu; Onishi, Kazuo et al. (2000): Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. In: *Immunological reviews* 175 (1), S. 33–46. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2000.imr017510.x.
- Merbl, Yifat; Zucker-Toledano, Merav; Quintana, Francisco J.; Cohen, Irun R. (2007): Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (3), S. 712–718. DOI: 10.1172/JCI29943.
- Mestecky, J. (1972): Structure of antibodies. In: *Journal of oral pathology* 1 (6), S. 288–300. DOI: 10.1111/j.1600-0714.1972.tb01667.x.
- Meyer-Hermann, Michael; Mohr, Elodie; Pelletier, Nadège; Zhang, Yang; Vitoria, Gabriel D.; Toellner, Kai-Michael (2012): A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. In: *Cell reports* 2 (1), S. 162–174. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.05.010.

- Milstein, C. (1966): Chemical structure of light chains. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 166 (1003), S. 138–149. DOI: 10.1098/rspb.1966.0089.
- Miscia, S.; Di Baldassarre, A.; Sabatino, G.; Bonvini, E.; Rana, R. A.; Vitale, M. et al. (1999): Inefficient phospholipase C activation and reduced Lck expression characterize the signaling defect of umbilical cord T lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (5), S. 2416–2424.
- Mok, C. C.; Lau, C. S. (2003): Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: *Journal of clinical pathology* 56 (7), S. 481–490. DOI: 10.1136/jcp.56.7.481.
- Mond, J. J.; Lees, A.; Snapper, C. M. (1995): T cell-independent antigens type 2. In: *Annual review of immunology* 13, S. 655–692. DOI: 10.1146/annurev.iy.13.040195.003255.
- Montecino-Rodriguez, Encarnacion; Dorshkind, Kenneth (2006): New perspectives in B-1 B cell development and function. In: *Trends in immunology* 27 (9), S. 428–433. DOI: 10.1016/j.it.2006.07.005.
- Montecino-Rodriguez, Encarnacion; Dorshkind, Kenneth (2012): B-1 B cell development in the fetus and adult. In: *Immunity* 36 (1), S. 13–21. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.11.017.
- Montecino-Rodriguez, Encarnacion; Fice, Michael; Casero, David; Berent-Maoz, Beata; Barber, Chad L.; Dorshkind, Kenneth (2016): Distinct Genetic Networks Orchestrate the Emergence of Specific Waves of Fetal and Adult B-1 and B-2 Development. In: *Immunity* 45 (3), S. 527–539. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.012.
- Moore, K. W.; Rogers, J.; Hunkapiller, T.; Early, P.; Nottenburg, C.; Weissman, I. et al. (1981): Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (3), S. 1800–1804. DOI: 10.1073/pnas.78.3.1800.
- Mukherjee, S.; Vaishnava, S.; Hooper, L. V. (2008): Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (19), S. 3019–3027. DOI: 10.1007/s00018-008-8182-3.
- Muramatsu, M.; Kinoshita, K.; Fagarasan, S.; Yamada, S.; Shinkai, Y.; Honjo, T. (2000): Class switch recombination and hypermutation require activation-induced



cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. In: *Cell* 102 (5), S. 553–563. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00078-7.

Murphy, Kenneth M.; Weaver, Casey (2017): Janeway's immunobiology. Unter Mitarbeit von Allan Mowat, Leslie Berg, David Chaplin, Charles A. Janeway, Paul Travers und Mark Walport. 9th edition. New York, London: GS, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Murphy, Kenneth M.; Weaver, Casey (2018): Janeway Immunologie. 9. Auflage. Berlin, Germany: Springer Spektrum (Lehrbuch).

Nakayama, Takashi; Hieshima, Kunio; Izawa, Dai; Tatsumi, Youichi; Kanamaru, Akihisa; Yoshie, Osamu (2003): Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (3), S. 1136–1140. DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1136.

Neefjes, Jacques; Jongsma, Marlieke L. M.; Paul, Petra; Bakke, Oddmund (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.

Nemazee, D.; Buerki, K. (1989): Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (20), S. 8039–8043. DOI: 10.1073/pnas.86.20.8039.

Nemazee, David (2017): Mechanisms of central tolerance for B cells. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (5), S. 281–294. DOI: 10.1038/nri.2017.19.

Nguyen, Muriel; Leuridan, Elke; Zhang, Tong; Wit, Dominique de; Willems, Fabienne; van Damme, Pierre et al. (2010): Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. In: *PloS one* 5 (4), e10407. DOI: 10.1371/journal.pone.0010407.

Nielsen, Sandra C. A.; Roskin, Krishna M.; Jackson, Katherine J. L.; Joshi, Shilpa A.; Nejad, Parastu; Lee, Ji-Yeun et al. (2019): Shaping of infant B cell receptor repertoires by environmental factors and infectious disease. In: *Science translational medicine* 11 (481). DOI: 10.1126/scitranslmed.aat2004.

- Nishimoto, N.; Kubagawa, H.; Ohno, T.; Gartland, G. L.; Stankovic, A. K.; Cooper, M. D. (1991): Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14), S. 6284–6288. DOI: 10.1073/pnas.88.14.6284.
- Noelle, R. J.; Roy, M.; Shepherd, D. M.; Stamenkovic, I.; Ledbetter, J. A.; Aruffo, A. (1992): A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14), S. 6550–6554. DOI: 10.1073/pnas.89.14.6550.
- Noto, Antonio; Fanos, Vassilios; Dessì, Angelica (2016): Metabolomics in Newborns. In: *Advances in clinical chemistry* 74, S. 35–61. DOI: 10.1016/bs.acc.2015.12.006.
- Nowosad, Carla R.; Mesin, Luka; Castro, Tiago B. R.; Wichmann, Christopher; Donaldson, Gregory P.; Araki, Tatsuya et al. (2020): Tunable dynamics of B cell selection in gut germinal centres. In: *Nature* 588 (7837), S. 321–326. DOI: 10.1038/s41586-020-2865-9.
- Nurieva, Roza I.; Chung, Yeonseok; Martinez, Gustavo J.; Yang, Xuexian O.; Tanaka, Shinya; Matskevitch, Tatyana D. et al. (2009): Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5943), S. 1001–1005. DOI: 10.1126/science.1176676.
- Nussbaum, Claudia; Gloning, Anna; Pruenster, Monika; Frommhold, David; Bierschenk, Susanne; Genzel-Boroviczény, Orsolya et al. (2013): Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. In: *Journal of leukocyte biology* 93 (2), S. 175–184. DOI: 10.1189/jlb.0912468.
- Nutt, Stephen L.; Hodgkin, Philip D.; Tarlinton, David M.; Corcoran, Lynn M. (2015): The generation of antibody-secreting plasma cells. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (3), S. 160–171. DOI: 10.1038/nri3795.
- Obukhanych, Tetyana V.; Nussenzweig, Michel C. (2006): T-independent type II immune responses generate memory B cells. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (2), S. 305–310. DOI: 10.1084/jem.20052036.

- Oettinger, M. A.; Schatz, D. G.; Gorka, C.; Baltimore, D. (1990): RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. In: *Science (New York, N.Y.)* 248 (4962), S. 1517–1523. DOI: 10.1126/science.2360047.
- Okada, Takaharu; Miller, Mark J.; Parker, Ian; Krummel, Matthew F.; Neighbors, Margaret; Hartley, Suzanne B. et al. (2005): Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. In: *PLoS biology* 3 (6), e150. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030150.
- Olin, Axel; Henckel, Ewa; Chen, Yang; Lakshminanth, Tadepally; Pou, Christian; Mikes, Jaromir et al. (2018): Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. In: *Cell* 174 (5), 1277-1292.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.045.
- Onodera, Taishi; Takahashi, Yoshimasa; Yokoi, Yusuke; Ato, Manabu; Kodama, Yuichi; Hachimura, Satoshi et al. (2012): Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7), S. 2485–2490. DOI: 10.1073/pnas.1115369109.
- O'Riordan, M.; Grosschedl, R. (1999): Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. In: *Immunity* 11 (1), S. 21–31. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80078-3.
- Palin, Amy C.; Ramachandran, Vasavi; Acharya, Swati; Lewis, David B. (2013): Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (6), S. 2682–2691. DOI: 10.4049/jimmunol.1202534.
- Panda, Santosh K.; Colonna, Marco (2019): Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 861. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00861.
- Paul, C.; Shimizu, A.; Köhler, H.; Putnam, F. W. (1971): Structure of the hinge region of the mu heavy chain of human IgM immunoglobulins. In: *Science (New York, N.Y.)* 172 (3978), S. 69–72. DOI: 10.1126/science.172.3978.69.
- Pavri, Rushad; Nussenzweig, Michel C. (2011): AID targeting in antibody diversity. In: *Advances in immunology* 110, S. 1–26. DOI: 10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3.

- Pelanda, R.; Schwers, S.; Sonoda, E.; Torres, R. M.; Nemazee, D.; Rajewsky, K. (1997): Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. In: *Immunity* 7 (6), S. 765–775. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80395-7.
- Pettengill, Matthew A.; van Haren, Simon D.; Li, Ning; Dowling, David J.; Bergelson, Ilana; Jans, Jop et al. (2016): Distinct TLR-mediated cytokine production and immunoglobulin secretion in human newborn naïve B cells. In: *Innate immunity* 22 (6), S. 433–443. DOI: 10.1177/1753425916651985.
- Pettengill, Matthew Aaron; Levy, Ofer (2016): Circulating Human Neonatal Naïve B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 121. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00121.
- Pichlmair, Andreas; Schulz, Oliver; Tan, Choon Ping; Näslund, Tanja I.; Liljeström, Peter; Weber, Friedemann; Reis e Sousa, Caetano (2006): RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. In: *Science (New York, N.Y.)* 314 (5801), S. 997–1001. DOI: 10.1126/science.1132998.
- Pihlgren, Maria; Tougne, Chantal; Bozzotti, Paola; Fulurija, Alma; Duchosal, Michel A.; Lambert, Paul-Henri; Siegrist, Claire-Anne (2003): Unresponsiveness to lymphoid-mediated signals at the neonatal follicular dendritic cell precursor level contributes to delayed germinal center induction and limitations of neonatal antibody responses to T-dependent antigens. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (6), S. 2824–2832. DOI: 10.4049/jimmunol.170.6.2824.
- Pike, B. L.; Boyd, A. W.; Nossal, G. J. (1982): Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (6), S. 2013–2017. DOI: 10.1073/pnas.79.6.2013.
- Pinder, Christopher L.; Kratochvil, Sven; Cizmeci, Deniz; Muir, Luke; Guo, Yanping; Shattock, Robin J.; McKay, Paul F. (2017): Isolation and Characterisation of Antigen-Specific Plasmablasts Using a Novel Flow Cytometry-Based Immunoglobulin Capture Assay (ICA). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (12), S. 4180–4188. DOI: 10.4049/jimmunol.1701253.
- Pioli, Peter D.; Debnath, Irina; Weis, Janis J.; Weis, John H. (2014): Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the Ighm/Ighd locus. In:

- Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (5), S. 2546–2553. DOI: 10.4049/jimmunol.1401275.
- PORTER, R. R. (1958): Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. In: *Nature* 182 (4636), S. 670–671. DOI: 10.1038/182670a0.
- Powell, Maree S.; Hogarth, P. Mark (2008): Fc receptors. In: *Advances in experimental medicine and biology* 640, S. 22–34. DOI: 10.1007/978-0-387-09789-3\_3.
- Prieto, J. M. B.; Felipe, M. J. B. (2017): Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. In: *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 54, S. 38–44. DOI: 10.1016/j.cimid.2017.08.002.
- R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, F. Hahne (2017): genefilter: Bioconductor.
- Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. In: *Nature* 381 (6585), S. 751–758. DOI: 10.1038/381751a0.
- Ravetch, J. V.; Siebenlist, U.; Korsmeyer, S.; Waldmann, T.; Leder, P. (1981): Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. In: *Cell* 27 (3 Pt 2), S. 583–591. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90400-1.
- Rechavi, G.; Bienz, B.; Ram, D.; Ben-Neriah, Y.; Cohen, J. B.; Zakut, R.; Givol, D. (1982): Organization and evolution of immunoglobulin VH gene subgroups. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (14), S. 4405–4409. DOI: 10.1073/pnas.79.14.4405.
- Ring, Johannes; Krämer, Ursula; Schäfer, Torsten; Behrendt, Heidrun (2001): Why are allergies increasing? In: *Current Opinion in Immunology* 13 (6), S. 701–708. DOI: 10.1016/S0952-7915(01)00282-5.
- Robbiani, Davide F.; Bunting, Samuel; Feldhahn, Niklas; Bothmer, Anne; Camps, Jordi; Deroubaix, Stephanie et al. (2009): AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. In: *Molecular cell* 36 (4), S. 631–641. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.11.007.

- Rock, Kenneth L.; Reits, Eric; Neefjes, Jacques (2016): Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. In: *Trends in immunology* 37 (11), S. 724–737. DOI: 10.1016/j.it.2016.08.010.
- Rodda, Lauren B.; Bannard, Oliver; Ludewig, Burkhard; Nagasawa, Takashi; Cyster, Jason G. (2015): Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (10), S. 4781–4791. DOI: 10.4049/jimmunol.1501191.
- Rodriguez-Zhurbenko, Nely; Quach, Tam D.; Hopkins, Thomas J.; Rothstein, Thomas L.; Hernandez, Ana M. (2019): Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 483. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00483.
- Rolink, A.; Grawunder, U.; Winkler, T. H.; Karasuyama, H.; Melchers, F. (1994): IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. In: *International immunology* 6 (8), S. 1257–1264. DOI: 10.1093/intimm/6.8.1257.
- Sadofsky, M. J. (2001): The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. In: *Nucleic acids research* 29 (7), S. 1399–1409. DOI: 10.1093/nar/29.7.1399.
- Sakaguchi, N.; Melchers, F. (1986): Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. In: *Nature* 324 (6097), S. 579–582. DOI: 10.1038/324579a0.
- Salgame, Padmini; Abrams, John S.; Clayberger, Carol; Goldstein, Harris; Convit, Jacinto; Modlin, Robert L.; Bloom, Barry R. (1991): Differing Lymphokine Profiles of Functional Subsets of Human CD4 and CD8 T Cell Clones. In: *Science (New York, N.Y.)* 254 (5029), S. 279–282. DOI: 10.1126/science.1681588.
- Saso, Anja; Kampmann, Beate (2017): Vaccine responses in newborns. In: *Seminars in immunopathology* 39 (6), S. 627–642. DOI: 10.1007/s00281-017-0654-9.
- Schäble, K. F.; Zachau, H. G. (1993): The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. In: *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 374 (11), S. 1001–1022.

- Schatz, David G.; Ji, Yanhong (2011): Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (4), S. 251–263. DOI: 10.1038/nri2941.
- Schroeder, Harry W.; Cavacini, Lisa (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Seifert, M.; Küppers, R. (2016): Human memory B cells. In: *Leukemia* 30 (12), S. 2283–2292. DOI: 10.1038/leu.2016.226.
- Seifert, Marc; Küppers, Ralf (2009): Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (12), S. 2659–2669. DOI: 10.1084/jem.20091087.
- Seifert, Marc; Przekopowicz, Martina; Taudien, Sarah; Lollies, Anna; Ronge, Viola; Drees, Britta et al. (2015): Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (6), E546-55. DOI: 10.1073/pnas.1416276112.
- Shane, Andi L.; Sánchez, Pablo J.; Stoll, Barbara J. (2017): Neonatal sepsis. In: *Lancet (London, England)* 390 (10104), S. 1770–1780. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.
- Shapiro-Shelef, Miriam; Calame, Kathryn (2005): Regulation of plasma-cell development. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (3), S. 230–242. DOI: 10.1038/nri1572.
- Siegrist, Claire-Anne; Aspinall, Richard (2009): B-cell responses to vaccination at the extremes of age. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (3), S. 185–194. DOI: 10.1038/nri2508.
- Siekevitz, M.; Kocks, C.; Rajewsky, K.; Dildrop, R. (1987): Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. In: *Cell* 48 (5), S. 757–770. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90073-0.

- Simon Garnier; Noam Ross; boB Rudis; Antoine Filipovic-Pierucci; Tal Galili; timelyportfolio et al. (2021): sjmgarnier/viridis: viridis 0.6.0 (pre-CRAN release): Zenodo.
- Sims, Gary P.; Ettinger, Rachel; Shirota, Yuko; Yarboro, Cheryl H.; Illei, Gabor G.; Lipsky, Peter E. (2005): Identification and characterization of circulating human transitional B cells. In: *Blood* 105 (11), S. 4390–4398. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4284.
- Slifka, Mark K.; Antia, Rustom; Whitmire, Jason K.; Ahmed, Rafi (1998): Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. In: *Immunity* 8 (3), S. 363–372. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80541-5.
- Smith, K. G.; Light, A.; Nossal, G. J.; Tarlinton, D. M. (1997): The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. In: *The EMBO journal* 16 (11), S. 2996–3006. DOI: 10.1093/emboj/16.11.2996.
- Smyth, D. S.; Utsumi, S. (1967): Structure at the hinge region in rabbit immunoglobulin-G. In: *Nature* 216 (5113), S. 332–335. DOI: 10.1038/216332a0.
- Soro, P. G.; Morales-A, P.; Martínez-M, J. A.; Morales-A, S.; Copín, S. G.; Marcos, M. A.; Gaspar, M. L. (1999): Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (2), S. 611–617.
- Sospedra, Mireia; Martin, Roland (2005): Immunology of multiple sclerosis. In: *Annual review of immunology* 23, S. 683–747. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
- Sousa-Pereira, Patrícia de; Woof, Jenny M. (2019): IgA: Structure, Function, and Developability. In: *Antibodies (Basel, Switzerland)* 8 (4). DOI: 10.3390/antib8040057.
- Spagnolo, Laura; Rivera-Calzada, Angel; Pearl, Laurence H.; Llorca, Oscar (2006): Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. In: *Molecular cell* 22 (4), S. 511–519. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.04.013.



- Spiegelberg, H. L. (1989): Biological role of different antibody classes. In: *International archives of allergy and applied immunology* 90 Suppl 1, S. 22–27. DOI: 10.1159/000235071.
- Spits, Hergen; Artis, David; Colonna, Marco; Diefenbach, Andreas; Di Santo, James P.; Eberl, Gerard et al. (2013): Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (2), S. 145–149. DOI: 10.1038/nri3365.
- Springer, Timothy A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. In: *Cell* 76 (2), S. 301–314. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90337-9.
- Stagg, J.; Smyth, M. J. (2010): Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. In: *Oncogene* 29 (39), S. 5346–5358. DOI: 10.1038/onc.2010.292.
- Stall, A. M.; Wells, S. M.; Lam, K. P. (1996): B-1 cells: unique origins and functions. In: *Seminars in immunology* 8 (1), S. 45–59. DOI: 10.1006/smim.1996.0007.
- Steiniger, Birte; Barth, Peter (2000): Microanatomy and function of the spleen. Berlin, New York: Springer (Advances in anatomy, embryology, and cell biology, v. 151).
- Steiniger, Birte; Timphus, Eva-Maria; Jacob, Ralf; Barth, Peter J. (2005): CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. In: *Immunology* 116 (4), S. 429–442. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02242.x.
- Steinman, R. M.; Inaba, K. (1999): Myeloid dendritic cells. In: *Journal of leukocyte biology* 66 (2), S. 205–208. DOI: 10.1002/jlb.66.2.205.
- Stoeckius, Marlon; Hafemeister, Christoph; Stephenson, William; Houck-Loomis, Brian; Chattopadhyay, Pratip K.; Swerdlow, Harold et al. (2017): Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. In: *Nature methods* 14 (9), S. 865–868. DOI: 10.1038/nmeth.4380.
- Street, Kelly; Risso, Davide; Fletcher, Russell B.; Das, Diya; Ngai, John; Yosef, Nir et al. (2018): Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. In: *BMC genomics* 19 (1), S. 477. DOI: 10.1186/s12864-018-4772-0.

- Stuart, Tim; Butler, Andrew; Hoffman, Paul; Hafemeister, Christoph; Papalexi, Efthymia; Mauck, William M. et al. (2019): Comprehensive Integration of Single-Cell Data. In: *Cell* 177 (7), 1888-1902.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2019.05.031.
- Swain, S. L. (1983): T cell subsets and the recognition of MHC class. In: *Immunological reviews* 74, S. 129–142. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1983.tb01087.x.
- Tangye, S. G.; Liu, Y. J.; Aversa, G.; Phillips, J. H.; Vries, J. E. de (1998): Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (9), S. 1691–1703. DOI: 10.1084/jem.188.9.1691.
- Tangye, Stuart G. (2011): Staying alive: regulation of plasma cell survival. In: *Trends in immunology* 32 (12), S. 595–602. DOI: 10.1016/j.it.2011.09.001.
- Taylor, Justin J.; Pape, Kathryn A.; Jenkins, Marc K. (2012): A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (3), S. 597–606. DOI: 10.1084/jem.20111696.
- Theis, Kevin R.; Romero, Roberto; Winters, Andrew D.; Greenberg, Jonathan M.; Gomez-Lopez, Nardhy; Alhousseini, Ali et al. (2019): Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 220 (3), 267.e1-267.e39. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.10.018.
- Thompson, Craig B. (1995): New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. In: *Immunity* 3 (5), S. 531–539. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90124-8.
- Toyama, Hirochika; Okada, Seiji; Hatano, Masahiko; Takahashi, Yoshimasa; Takeda, Nobue; Ichii, Hirohito et al. (2002): Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. In: *Immunity* 17 (3), S. 329–339. DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00387-4.
- Tsafaras, George P.; Ntontsi, Polyxeni; Xanthou, Georgina (2020): Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. In: *Frontiers in pediatrics* 8, S. 5. DOI: 10.3389/fped.2020.00005.

- Tull, Thomas J.; Pitcher, Michael J.; Guesdon, William; Siu, Jacqueline H. Y.; Lebrero-Fernández, Cristina; Zhao, Yuan et al. (2021): Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. In: *The Journal of experimental medicine* 218 (4). DOI: 10.1084/jem.20202001.
- Unanue, E. R. (1984): Antigen-presenting function of the macrophage. In: *Annual review of immunology* 2, S. 395–428. DOI: 10.1146/annurev.iy.02.040184.002143.
- van Chu, T.; Berek, Claudia (2013): The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. In: *Immunological reviews* 251 (1), S. 177–188. DOI: 10.1111/imr.12011.
- van Chu, Trung; Fröhlich, Anja; Steinhauser, Gudrun; Scheel, Tobias; Roch, Toralf; Fillatreau, Simon et al. (2011): Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. In: *Nature immunology* 12 (2), S. 151–159. DOI: 10.1038/ni.1981.
- van Eyk, H. G.; Terhorst, C.; Vijlder, M. M. de (1967): Fragmentation of human IgG globulin with papain, trypsin and pepsin. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 16 (3), S. 429–431. DOI: 10.1016/0009-8981(67)90309-9.
- Vettermann, Christian; Schlissel, Mark S. (2010): Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. In: *Immunological reviews* 237 (1), S. 22–42. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x.
- Viant, Charlotte; Weymar, Georg H. J.; Escolano, Amelia; Chen, Spencer; Hartweger, Harald; Cipolla, Melissa et al. (2020): Antibody Affinity Shapes the Choice between Memory and Germinal Center B Cell Fates. In: *Cell* 183 (5), 1298-1311.e11. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.063.
- Viant, Charlotte; Wirthmiller, Tobias; ElTanbouly, Mohamed A.; Chen, Spencer T.; Cipolla, Melissa; Ramos, Victor et al. (2021): Germinal center-dependent and -independent memory B cells produced throughout the immune response. In: *The Journal of experimental medicine* 218 (8). DOI: 10.1084/jem.20202489.
- Victoria, Gabriel D.; Dominguez-Sola, David; Holmes, Antony B.; Deroubaix, Stephanie; Dalla-Favera, Riccardo; Nussenzweig, Michel C. (2012): Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-

cell lymphomas. In: *Blood* 120 (11), S. 2240–2248. DOI: 10.1182/blood-2012-03-415380.

Victoria, Gabriel D.; Nussenzweig, Michel C. (2012): Germinal centers. In: *Annual review of immunology* 30, S. 429–457. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032.

Victoria, Gabriel D.; Nussenzweig, Michel C. (2022): Germinal Centers. In: *Annual review of immunology* 40, S. 413–442. DOI: 10.1146/annurev-immunol-120419-022408.

Victoria, Gabriel D.; Schwickert, Tanja A.; Fooksman, David R.; Kamphorst, Alice O.; Meyer-Hermann, Michael; Dustin, Michael L.; Nussenzweig, Michel C. (2010): Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. In: *Cell* 143 (4), S. 592–605. DOI: 10.1016/j.cell.2010.10.032.

Vivier, Eric; Tomasello, Elena; Baratin, Myriam; Walzer, Thierry; Ugolini, Sophie (2008): Functions of natural killer cells. In: *Nature immunology* 9 (5), S. 503–510. DOI: 10.1038/ni1582.

Wardemann, Hedda; Yurasov, Sergey; Schaefer, Anne; Young, James W.; Meffre, Eric; Nussenzweig, Michel C. (2003): Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5638), S. 1374–1377. DOI: 10.1126/science.1086907.

Weisel, Florian J.; Zuccarino-Catania, Griselda V.; Chikina, Maria; Shlomchik, Mark J. (2016): A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. In: *Immunity* 44 (1), S. 116–130. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.12.004.

Weller, Sandra; Braun, Moritz C.; Tan, Bruce K.; Rosenwald, Andreas; Cordier, Corinne; Conley, Mary Ellen et al. (2004): Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. In: *Blood* 104 (12), S. 3647–3654. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0346.

Wickham (2016): *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. Unter Mitarbeit von François, Henry, Müller, Vaughan.

- Willenbrock, Klaus; Jungnickel, Berit; Hansmann, Martin-Leo; Küppers, Ralf (2005): Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. In: *European journal of immunology* 35 (10), S. 3002–3007. DOI: 10.1002/eji.200535134.
- Wong, Rachel; Belk, Julia A.; Govero, Jennifer; Uhrlaub, Jennifer L.; Reinartz, Dakota; Zhao, Haiyan et al. (2020): Affinity-Restricted Memory B Cells Dominate Recall Responses to Heterologous Flaviviruses. In: *Immunity* 53 (5), 1078-1094.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.09.001.
- World Health Organization (2022): Newborn Mortality.
- Wu, Y.; Bressette, D.; Carrell, J. A.; Kaufman, T.; Feng, P.; Taylor, K. et al. (2000): Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BlyS. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (45), S. 35478–35485. DOI: 10.1074/jbc.M005224200.
- Yamane, Hidehiro; Paul, William E. (2013): Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. In: *Immunological reviews* 252 (1), S. 12–23. DOI: 10.1111/imr.12032.
- Yang, Yang; Li, Xiao; Ma, Zhihai; Wang, Chunlin; Yang, Qunying; Byrne-Steele, Miranda et al. (2021): CTLA-4 expression by B-1a B cells is essential for immune tolerance. In: *Nature communications* 12 (1), S. 525. DOI: 10.1038/s41467-020-20874-x.
- Ygberg, Sofia; Nilsson, Anna (2012): The developing immune system - from foetus to toddler. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 101 (2), S. 120–127. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x.
- Yu, G.; Boone, T.; Delaney, J.; Hawkins, N.; Kelley, M.; Ramakrishnan, M. et al. (2000): APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. In: *Nature immunology* 1 (3), S. 252–256. DOI: 10.1038/79802.
- Yu, Jack C.; Khodadadi, Hesam; Malik, Aneeq; Davidson, Brea; Da Salles, Évila Silva Lopes; Bhatia, Jatinder et al. (2018): Innate Immunity of Neonates and Infants. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1759. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01759.
- Yu, Xiacong; Tsibane, Tshidi; McGraw, Patricia A.; House, Frances S.; Keefer, Christopher J.; Hicar, Mark D. et al. (2008): Neutralizing antibodies derived from the

B cells of 1918 influenza pandemic survivors. In: *Nature* 455 (7212), S. 532–536.

DOI: 10.1038/nature07231.

Zasloff, Michael (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. In: *Nature* 415 (6870), S. 389–395. DOI: 10.1038/415389a.

Zhi, Xiuling; Chen, Sifeng; Zhou, Ping; Shao, Zhimin; Wang, Li; Ou, Zhouluo; Yin, Lianhua (2007): RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. In: *Clinical & experimental metastasis* 24 (6), S. 439–448. DOI: 10.1007/s10585-007-9081-y.

Zhou, Yan; Li, Yue-Sheng; Bandi, Srinivasa Rao; Tang, Lingjuan; Shinton, Susan A.; Hayakawa, Kyoko; Hardy, Richard R. (2015): Lin28b promotes fetal B lymphopoiesis through the transcription factor *Arid3a*. In: *The Journal of experimental medicine* 212 (4), S. 569–580. DOI: 10.1084/jem.20141510.

Zhu, Jinfang; Paul, William E. (2010): Heterogeneity and plasticity of T helper cells. In: *Cell research* 20 (1), S. 4–12. DOI: 10.1038/cr.2009.138.

# Anhang

**Tabelle 16: Verwendete Genesets für die GSEA**

GSEA - Genesets
GSE12366_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_DN
GSE12366_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_UP
GSE12366_PLASMA_CELL_VS_MEMORY_BCELL_DN
GSE12366_PLASMA_CELL_VS_MEMORY_BCELL_UP
GSE13411_IGM_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_DN
GSE13411_IGM_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_UP
GSE13411_IGM_VS_SWITCHED_MEMORY_BCELL_DN
GSE13411_IGM_VS_SWITCHED_MEMORY_BCELL_UP
GSE13411_NAIVE_BCELL_VS_PLASMA_CELL_DN
GSE13411_NAIVE_BCELL_VS_PLASMA_CELL_UP
GSE13411_NAIVE_VS_IGM_MEMORY_BCELL_DN
GSE13411_NAIVE_VS_IGM_MEMORY_BCELL_UP
GSE13411_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_DN
GSE13411_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_UP
GSE13411_PLASMA_CELL_VS_MEMORY_BCELL_DN
GSE13411_PLASMA_CELL_VS_MEMORY_BCELL_UP
GSE13411_SWITCHED_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_DN
GSE13411_SWITCHED_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_UP
BIOCARTA_ASBCELL_PATHWAY

GOBP_IMMUNOLOGICAL_MEMORY_FORMATION_PROCESS
GOBP_MATURE_B_CELL_DIFFERENTIATION_INVOLVED_IN_IMMUNE_RESPONSE
GSE42724_B1_BCELL_VS_PLASMAFAST_DN
GSE42724_B1_BCELL_VS_PLASMAFAST_UP
HP_MEMORY_IMPAIRMENT
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS

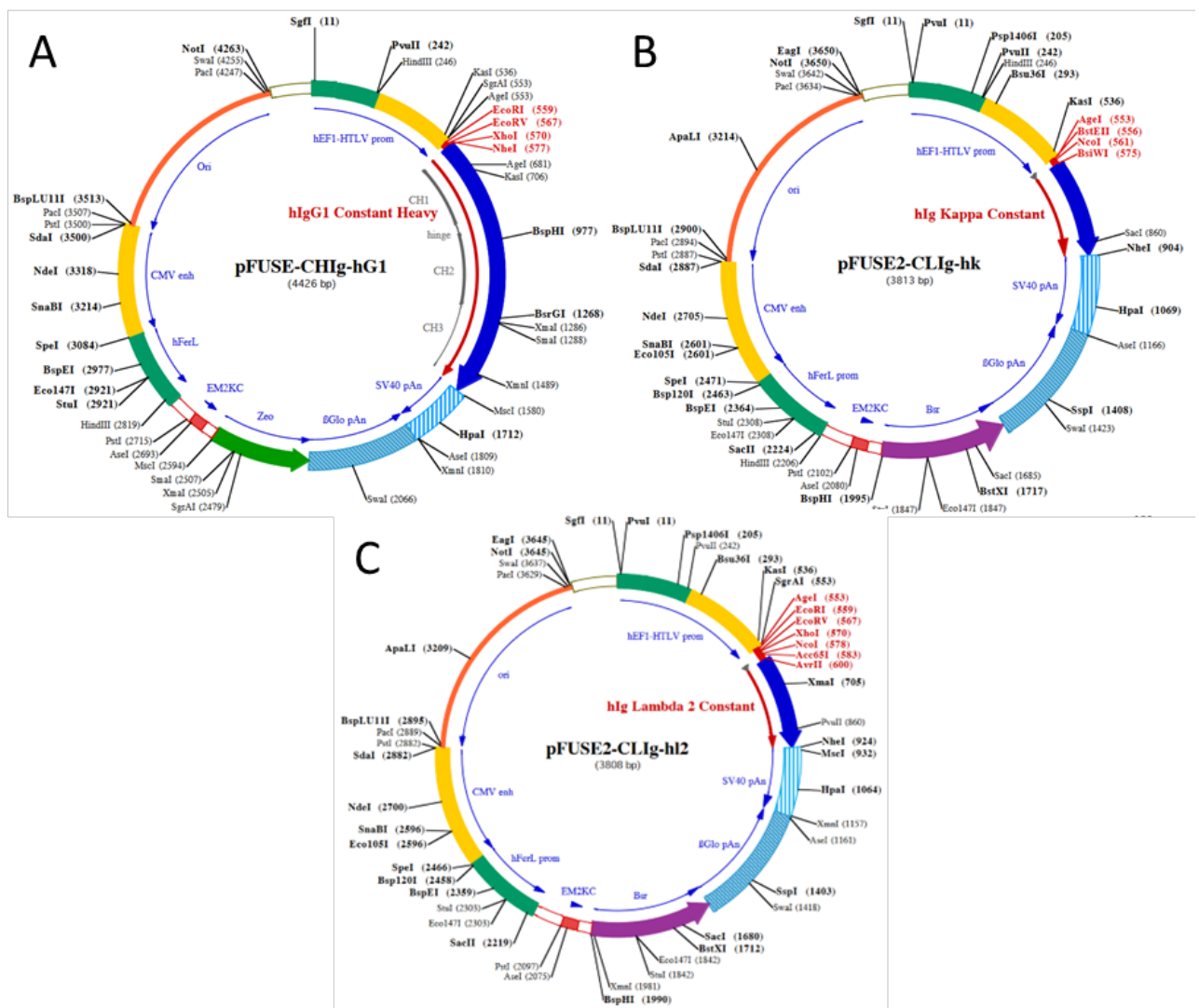
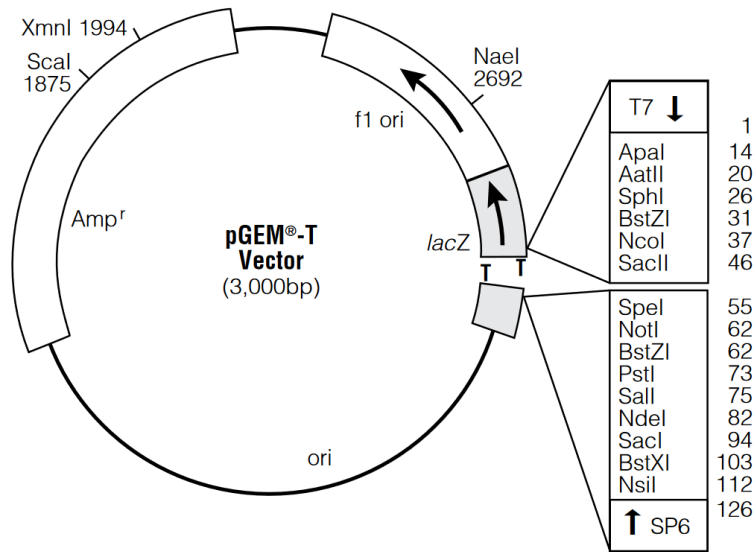


Abbildung 27: Expressionsvektoren für Antikörperproduktion

Vektorkarten der Expressionsvektoren (pFUSE) für IgG1 (A), IgK (B) und IgL (C) (alle InvivoGen).





**Abbildung 28: Klonierungsvektor**

Vektorkarte des Klonierungsvektors (Promega).

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine tiefe Dankbarkeit und Wertschätzung für all die Menschen zum Ausdruck bringen, die mich während meiner Dissertation auf so vielfältige Weise unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer Marc Seifert. Durch seine persönliche und zugleich anspruchsvolle Betreuung wurde ich immer wieder inspiriert und motiviert. Ich habe seine kritischen Anmerkungen und seine Ermutigung sehr geschätzt. Sowohl auf menschlicher als auch fachlicher Ebene hätte ich mir keinen besseren Betreuer vorstellen können.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Bettina Budeus und Artur Kibler für ihre fachliche Kompetenz, ihre wertvollen Ratschläge und für so manches Gespräch danken.

Besonders danken möchte ich auch Prof. Ralf Küppers, der mir die Möglichkeiten gab, in seinen Laboren zu arbeiten und auch für seine vielfältige Unterstützung.

Natürlich danke ich auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen für die wertvollen Erfahrungen, die ich während meiner Arbeit im Labor machen durfte. Ihre Unterstützung und ihre Freundschaft haben mich immer wieder motiviert und gestärkt.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an meine Familie und Freunde. Sie haben mich während der gesamten Zeit immer unterstützt und mich immer wieder daran erinnert, dass es neben der Arbeit auch noch andere wichtige Dinge im Leben gibt. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

Und schließlich möchte ich mich auch bei meiner Partnerin bedanken. Ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Verständnis für meine Arbeit haben mich in schwierigen Momenten immer wieder aufgebaut mir Trost gegeben und mir geholfen, durchzuhalten.

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der veröffentlichten Version enthalten.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die eidesstattliche Erklärung ist aus Datenschutzgründen nicht in der veröffentlichten Version enthalten.