

**Analyse der Entwicklung, Zusammensetzung und Dynamik
humaner splenischer Marginalzonen-B-Zellen im Altersverlauf**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Artur Kibler

aus Tscheljabinsk, Russland

Februar 2021

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



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/74429
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240723-103219-5

Alle Rechte vorbehalten.

1. Gutachter: PD Dr. Marc Seifert

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Robert Engel

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

Tag der Disputation: 20. Mai 2021

Vermerk

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Kibler, A., Budeus, B., Homp, E., Bronischewski, K., Berg, V., Sellmann, L., Murke, F., Heinold, A., Heinemann, F.M., Lindemann, M., Bekeredjian-Ding, I., Horn, P.A., Kirschning, C., Küppers, R., Seifert, M. (2020).

Systematic memory B cell archiving and random display shape the human splenic marginal zone throughout life.

The Journal of Experimental Medicine, doi: 10.1084/jem.20201952

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem des Menschen.....	1
1.2 Angeborene Immunität	1
1.3 Adaptive Immunität	4
1.4 Die Bildung des B-Zell-Rezeptors durch V(D)J-Rekombination.....	6
1.5 Die primäre Fokusreaktion und die Keimzentrumsreaktion	9
1.6 Gedächtnis-B-Zellen	12
1.7 Die Milz und splenische Marginalzonen	17
1.8 Splenische Marginalzonen-B-Zellen	19
1.9 Analysen des humanen B-Zell-Repzeptor-Repertoires	23
1.10 Immunalterung	24
1.11 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden	28
2.1 <i>Material</i>	28
2.1.1 Laborgeräte	28
2.1.2 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Chemikalien.....	29
2.1.3 Zelllinien	30
2.1.4 PCR-Primer	30
2.1.5 Antikörper	33
2.1.6 Kits	37
2.1.7 Software	38
2.2 <i>Methoden</i>	40
2.2.1 Verwendung von humanem Probenmaterial	40
2.2.2 Altersstufen humaner Proben.....	40
2.2.3 Isolierung humaner B-Lymphozyten.....	40

2.2.4	Isolierung humaner B-Zell-Populationen	41
2.2.5	Kultivierung humaner B-Lymphozyten	42
2.2.6	Durchflusszytometrische Analyse humaner B-Zell-Populationen	42
2.2.7	Messung von Zellproliferation.....	43
2.2.8	Ko-Kultur humaner B-Lymphozyten-Populationen mit OP9-Zelllinien.....	43
2.2.9	Datenauswertung, Datendarstellung und statistische Signifikanz.....	44
2.2.10	Hochdurchsatz-Sequenzierung der Variablen Regionen der Ig-Schwerketten (IGHV) humaner B-Zell-Populationen.....	44
2.2.11	Berechnung der Klonalität.....	45
2.2.12	Berechnung und Auswertung hierarchischer Dendrogramme	45
2.2.13	Analyse der Sequenzeigenschaften	45
2.2.14	Bestimmung von Klonotypen.....	46
2.2.15	Bestimmung von Antigen-spezifischen Klonotypen	46
2.2.16	Einzel-Zell-Analyse mittels Fluidigm 96.96	46
2.2.17	Einzel-Zell-Analyse mittels 10X Chromium.....	48
2.2.18	Immunhistochemie	49
2.2.19	<i>Ultra high content imaging</i> mittels MACSima Imaging System.....	49
2.2.20	RNA-Hochdurchsatz-Sequenzierung und Analyse von Genexpressionsprofilen humaner B-Zell-Populationen	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	<i>Durchflusszytometrische Bestimmung und Etablierung einer Sortierstrategie für naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen aus humanem PB und Milz</i>	<i>52</i>
3.2	<i>Der relative Anteil von sMZ-B-Zellen ist konstant mit dem Alter, wobei der Anteil von sMZ-CSW-B-Zellen zunimmt</i>	<i>55</i>
3.3	<i>Die Zusammensetzung der B-Zell-Kompartimente des PB und der Milz unterliegt einer altersabhängigen Dynamik im Menschen</i>	<i>56</i>
3.4	<i>Splenische CD21⁺ und CD21^{high} B-Zellen unterscheiden sich phänotypisch und funktionell</i>	<i>60</i>
3.5	<i>Genexpressionsanalyse humaner B-Zell-Populationen aus PB und Milz.....</i>	<i>66</i>
3.6	<i>Hochdurchsatz-Sequenzierung der IGHV-Gene von B-Lymphozyten-Populationen aus gepaarten Milzbiopsaten und PB.....</i>	<i>70</i>
3.7	<i>Umfassende klonale Verwandtschaft zwischen B-Zell-Populationen aus PB und Milz .</i>	<i>72</i>
3.8	<i>Klonmitglieder segregieren in separate PB- und Milz-Äste.....</i>	<i>77</i>
3.9	<i>CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen sind stark klonal verwandt.....</i>	<i>80</i>

3.10	<i>Humane splenische CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen unterscheiden sich nicht im IGHV-Repertoire</i>	82
3.11	<i>DLL1-NOTCH2-abhängige Induktion der CD21-Expressionsstärke</i>	85
3.12	<i>IGHV-Klonotypen sind im kindlichen IGHV-Repertoire angereichert</i>	87
3.13	<i>Antigen-spezifische Klonotypen im IGHV-Repertoire humaner B-Zellen aus PB und Milz</i>	89
3.14	<i>Einzel-Zell-basierte Genexpressionsanalyse humaner sMZ-B-Zellen</i>	91
3.15	<i>Die Milz-Architektur unterliegt altersabhängigen Veränderungen</i>	99
4	Diskussion	107
4.1	<i>Die menschliche Milz archiviert und konserviert Gedächtnis-B-Zell-Klone</i>	107
4.2	<i>Eine stochastische Auswahl von Gedächtnis-B-Zellen prägt die Zusammensetzung der splenischen Marginalzone</i>	108
4.3	<i>Die splenische Marginalzone induziert einen prä-aktivierten Zustand in B-Zellen</i>	110
4.4	<i>Systemische Immunität wird durch Rezirkulation von Gedächtnis-B-Zellen aus dem Milz-Archiv vermittelt</i>	112
4.5	<i>Die Reifung der Milz und der Funktion kindlicher sMZ-B-Zellen</i>	114
4.6	<i>Heterogenität humaner sMZ-B-Zellen</i>	117
4.7	<i>Immunalterung und Immunseneszenz im B-Zell-System</i>	120
4.8	<i>Ein Modell für die Dynamik humaner Gedächtnis-B-Zellen</i>	122
5	Zusammenfassung	124
6	Summary	125
7	Ausblick	126
8	Literaturverzeichnis	128
	Anhang	156
	Danksagung	160
	Lebenslauf	161
	Eidesstattliche Erklärung	162

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Allophycocyanin
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungs- <i>cluster</i>
CDR	Komplementaritäts-bestimmenden Regionen
CITE-Seq	<i>cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing</i>
D	Diversitäts-Gensegment
DLL1	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DZ	Dendritische Zelle
engl.	englisch
et al.	<i>et altera</i> (lat. und andere)
Fab	Antigen-bindende Fragment eines Antikörpers
Fc	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FcRn	<i>neonatal Fc receptor</i>
FDR	Erwarteter Anteil fälschlicherweise abgelehnter Null-Hypothesen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	Gerüstregion
GC	Keimzentrum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSEA	Gengruppen Anreicherungs-Analyse
HiB	<i>Haemophilus influenzae</i> Typ B
HLA	Humane Leukozytenantigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGHV	Variable Region der schweren Immunglobulin Kette
IHC	Immunhistochemie
IMGT	ImMunoGeneTics

J	Verbindungs-Gensegment
LED	lichtemittierende Diode
LOESS	<i>locally estimated scatterplot smoothing</i>
MACS	magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes
MICS	MACSima-Image-Cyclic-Staining
MSigDB	<i>Molecular Signature</i> Datenbank
N-Nukleotid	nicht-keimbahn-kodiertes Nukleotid
PALS	Periarteriolen lymphoide Scheide
PB	Peripheres Blut
PB-CSW-B-Zellen	klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen aus peripherem Blut
PB-MD27-B-Zellen	IgM ⁺ IgD ^{+/-} CD27 ⁺ B-Zellen aus peripherem Blut
PB-Naive-B-Zellen	naive B-Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponenten-Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pIgR	<i>polymeric immunoglobulin receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Milz
sCSW-B-Zellen	klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen aus Milz
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
sMD27-B-Zellen	IgM ⁺ IgD ^{+/-} CD27 ⁺ CD21 ⁺ B-Zellen aus Milz
sMZ	splenischen Marginalzone
sMZ-B-Zellen	Marginalzonen-B-Zellen aus Milz
sMZ-CSW-B-Zellen	klassengewechselte Marginalzonen-B-Zellen aus Milz
TD	T-Zell-abhängig
TI	T-Zell-unabhängig
TLR	Toll-like Rezeptor
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
UCB	Nabelschnurblut
UMAP	<i>uniform manifold approximation and projection</i>
us	unstimuliert
V	Variables-Gensegment

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strategie für die Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen aus Milzbiopsaten.....	53
Abb. 2: Strategie für die Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen aus PB	54
Abb. 3: Anteil von sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen in der Milz in Abhängigkeit vom Lebensalter	56
Abb. 4: Relativer Anteil der B-Zell-Populationen aus den Milzen von 104 Individuen im Alter von 0 Monaten bis 89 Jahren.....	57
Abb. 5: Relativer Anteil der B-Zell-Populationen aus dem PB von 67 Individuen im Alter von 0 Monaten bis 89 Jahren.....	58
Abb. 6: Expression von Zelloberflächenmolekülen auf ruhenden B-Zell-Populationen aus PB und Milz	61
Abb. 7: Oberflächenexpression ausgewählter Moleküle von ruhenden-, TD- bzw. TI-I-aktivierten B-Zell-Populationen aus PB und Milz.....	63
Abb. 8: Zellproliferation nach TD- bzw. TI-I-Stimulation von B-Zell-Populationen aus PB und Milz	64
Abb. 9: PCA humaner B-Zell-Populationen aus PB und Milz	66
Abb. 10: Hierarchisches Clustering von differenziell exprimierten Genen aus paarweisen Vergleichen zwischen B-Zell-Populationen aus PB	67
Abb. 11: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen angereicherte Gengruppen	68
Abb. 12: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen abgereicherte Gengruppen	69
Abb. 13: Mittlere IGHV-Mutationsfrequenz (Median) der B-Zell-Populationen aus Milz und PB von 17 Individuen zwischen 0 und 77 Jahren	71
Abb. 14: Anteil klonal expandierter IGHV-Sequenzen aus PB und Milz im Altersverlauf	73
Abb. 15: VDJ-Diversität, Klongröße und Lokalisation expandierter Klone im Altersverlauf	75
Abb. 16: PB-Klonmitglieder bilden häufig phylogenetisch distinkte Äste.....	77
Abb. 17: Anteil von Klonen mit distinktem PB-Ast im Altersverlauf.....	78
Abb. 18: Klonale Verwandtschaft von IGHV-Sequenzen aufgeschlüsselt nach B-Zell-Populationen aus PB und Milz	80
Abb. 19: Isotyp-Zusammensetzung splenischer und gemeinsamer Klone in Abhängigkeit von der Klongröße	81
Abb. 20: Durchmischung und Hierarchie von CD21 ⁺ und CD21 ^{high} B-Zell-Populationen	83
Abb. 21: IGHV-Gen-Nutzung und CDRIII-Längenverteilung splenischer CD21 ⁺ und CD21 ^{high} B-Zell-Populationen	84

Abb. 22: CD21-Expressionsstärke von B-Zellen nach einer Ko-Kultur mit OP9-DLL1 Zellen.....	86
Abb. 23: Anzahl und relativer Anteil von IGHV-Klonotypen im Altersverlauf	88
Abb. 24: Häufigkeit und Diversität Antigen-spezifischer Klonotypen im Altersverlauf	90
Abb. 25 PCA der Genexpression humaner sMZ-B-Zellen.....	92
Abb. 26 Altersabhängigkeit und Heterogenität der Genexpression humaner sMZ-B- Zellen.....	93
Abb. 27: Durchflusszytometrische Bestimmung des altersabhängigen Anteils CD27- negativer sMZ-B-Zellen	94
Abb. 28: UMAP der globalen Gemeinsamkeiten und Unterschiede humaner splenischer B-Zellen im Altersverlauf.....	96
Abb. 29: Auftrennung splenischer B-Zellen in molekular distinkte Gruppen	97
Abb. 30 Altersabhängige immunhistochemische Untersuchung humaner sMZ-B-Zellen	100
Abb. 31: Histologische Analyse ausgewählter Moleküle in der Milz eines Kleinkindes mittels MACSima	101
Abb. 32: Altersabhängige Multiplex-Immunfluoreszenz Untersuchung humaner sMZ-B- Zellen.....	102
Abb. 33: Mikromilieu in splenischen Marginalzonen im Altersverlauf	104
Abb. 34: Expressionsstärke ausgewählter Oberflächenmoleküle unter splenischen B- Zell-Populationen aus unterschiedlichen Altersstadien	106
Abb. 35: Modell für die Dynamik humaner Gedächtnis-B-Zellen	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller Geräte, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	28
Tabelle 2: Liste aller Nährmedien, Puffer, Lösungen und Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	29
Tabelle 3: Liste aller Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	30
Tabelle 4: Liste aller kommerziellen PCR-Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	30
Tabelle 5: Liste aller Fluorochrom-gekoppelten anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit für durchflusszytometrische Analysen verwendet wurden.....	33
Tabelle 6: Liste aller Fluorochrom-gekoppelten anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet wurden.	35
Tabelle 7: Liste aller Antikörper, die für immunhistochemische Färbungen verwendet wurden.....	36
Tabelle 8: Liste aller CITE-Seq anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	37
Tabelle 9: Liste aller kommerzieller Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	37
Tabelle 10: Liste der Software, die in dieser Arbeit verwendet wurde.	38
Tabelle 11: Liste aller R Programmiererweiterungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	38
Tabelle 12: Altersstufen humaner Proben.....	40
Tabelle 13: Das PCR-Reaktionsgemisch für die erste PCR-Runde des Fluidigm 96.96 Assays.....	47
Tabelle 14: Das PCR-Programm für die erste PCR-Runde des Fluidigm 96.96 Assays... 	47
Tabelle 15: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen angereicherte Gengruppen (Auswahl).....	156
Tabelle 16: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen abgereicherte Gengruppen (Auswahl).....	158

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Menschen

Der Mensch ist ab der Geburt von Mikroorganismen umgeben, die durch Eindringen in den Organismus Krankheiten auslösen können (Hornef *et al.*, 2002). Das Immunsystem (lateinisch *immunis*, „rein“, „frei“, „unberührt“) ist ein körperweites biologisches Netzwerk, bestehend aus spezialisierten Zelltypen und löslichen (humoralen) Komponenten (Owen *et al.*, 2013). Dieses Netzwerk dient der präventiven Abwehr von Mikroorganismen bzw. der Beseitigung infektiöser Erreger nach einer Besiedlung (Murphy und Weaver, 2016). Adaptive Immunität ist charakterisiert durch Gedächtnisbildung und Antigenspezifität, wodurch nach einer primären Immunantwort eine Re-Infektion verhindert werden kann (Ahmed und Gray, 1996).

1.2 Angeborene Immunität

Physiko-chemische Barrieren können eine Besiedlung durch krankheitsauslösende Mikroorganismen (Pathogene) verhindern (Janeway und Medzhitov, 2002). Die anatomischen Barrieren umfassen die Haut, Schleimhäute im respiratorischen Trakt und Verdauungstrakt und chemische Barrieren, wie Magensäure, Fettsäuren auf der Haut oder Enzyme im Verdauungstrakt (Turvey und Broide, 2010). Zudem besiedeln kommensale Bakterien, Pilze und Archaea (Mikrobiom) die inneren und äußeren Barrieren und erschweren dadurch eine Besiedlung durch Pathogene (Barko *et al.*, 2018). Werden die anatomischen Barrieren durchbrochen, kommt es zu einer Entzündungsreaktion und einer schnellen, unspezifischen und weitestgehend unveränderlichen Immunantwort („angeborene Immunantwort“) (Turvey und Broide, 2010). Das angeborene Immunsystem umfasst u.a. auf Phagozytose (altgriechisch *phagein*, „fressen“) spezialisierte Zelltypen (Aderem und Underhill, 1999) und humorale Faktoren wie das Komplementsystem und Defensine (De Smet und Contreras, 2005). Angeborene Immunantworten sind schnell (Sekunden bis Minuten nach der Infektion) und die Antigen-Erkennung erfolgt mittels Keimbahn-kodierter Mustererkennungsrezeptoren (Beutler und Rietschel, 2003).

Neuere Forschung deutet darauf hin, dass das angeborene Immunsystem durch transiente und kurzlebige epigenetische Modifizierung, metabolische Reprogrammierung und eine gesteigerte Ansprechempfindlichkeit der Immunzellen zu einer verbesserten Immunantwort in der Lage ist (Netea *et al.*, 2020). In Abgrenzung zum immunologischen Gedächtnis des adaptiven Immunsystems werden die vorgenannten Mechanismen als „geschulte Immunität“ (engl. *trained immunity*) bezeichnet (Pradeu und Du Pasquier, 2018).

Weiße Blutzellen (Leukozyten, altgriechisch *leukós*, „weiß“ sowie altgriechisch *kýtos*, „hohler Raum, Wölbung“) werden im Knochenmark gebildet, zirkulieren im Blut- und Lymphgefäßsystem und werden in lymphoide (überwiegend adaptive Immunzellen) und myeloische (angeborene Immunzellen) Zelltypen unterteilt (Chao *et al.*, 2008; Corces *et al.*, 2016; Nestorowa *et al.*, 2016). Dendritische Zellen (Abk. DZ), Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sind phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems (Aderem und Underhill, 1999; Reis e Sousa, 2004) und können mittels der Sezernierung von löslichen Mediatoren (Zytokine und Chemokine) Immunantworten auslösen oder beeinflussen (Ihle, 1995; Proudfoot, 2002). Aufgenommene Pathogene werden durch intrazellulären proteolytischen Verdau oder reaktive Sauerstoffspezies unschädlich gemacht (Bogdan *et al.*, 2000; Dahlgren und Karlsson, 1999; Reeves *et al.*, 2002). Mastzellen leiten eine lokale Entzündungsreaktion durch Ausschüttung von Histamin ein (Mekori und Metcalfe, 2000). Dendritische Zellen haben eine herausragende Funktion in der Antigen-Präsentation, sind für die Aktivierung von Antigen-spezifischen Lymphozyten essenziell (Germain, 1994; Segura und Villadangos, 2009) und fungieren daher als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem (Reis e Sousa, 2004). Die langlebigeren Phagozyten Makrophagen und DZ gehören zusammen mit den B-Lymphozyten zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (Weaver und Unanue, 1990). Ihre Funktion ist die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Trombetta und Mellman, 2005).

Die molekulare Erkennung von eingedrungenen Fremdorganismen erfolgt über evolutionär konservierte, Keimbahn-kodierte Mustererkennungsrezeptoren (Abk. PRR, von engl. pattern recognition receptor) zu denen u.a. die Familie der Toll-

like-Rezeptoren (Abk. TLR) gehört (Kirschning und Bauer, 2001; Lemaitre *et al.*, 1996). TLR werden von Immunzellen exprimiert (Zarembler und Godowski, 2002) und erkennen einerseits Moleküle, die durch Zerstörung von Zellen und Geweben freigesetzt werden können (Adenosintriphosphat, Histone) (Bianchi, 2007; Wagner, 2006) und andererseits evolutionär konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster auf der Oberfläche oder im Inneren von Mikroorganismen (Kirschning und Bauer, 2001). Hierzu zählen beispielsweise Komponenten der bakteriellen Zellwand wie Lipopolysaccharide, Lipoproteine und Lipoteichonsäure (Jin *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009), Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001), unmethylierte CpG Motive bakterieller oder viraler Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, Abk. DNA) (Krieg *et al.*, 1995) und doppelsträngige oder einzelsträngige Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, Abk. RNA) (Heil *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008). Diese molekularen Muster werden von eukaryotischen Zellen entweder nicht synthetisiert oder chemisch modifiziert (Ashkar und Rosenthal, 2002; Lander *et al.*, 2001). TLR erkennen ein Spektrum von Pathogenen, das von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien über Pilze bis hin zu DNA- und RNA-Viren reicht (Vidya *et al.*, 2018).

Neben den Zellen des angeborenen Immunsystems sind humorale Proteine an der Erkennung, Markierung, Inaktivierung und Beseitigung von eingedrungenen Mikroorganismen beteiligt (Owen *et al.*, 2013). Hierzu zählen z.B. anti-mikrobielle Peptide (Defensine) (Wilson *et al.*, 2013) und das Komplementsystem, welches eine große Gruppe unterschiedlicher Plasmaproteine umfasst (Gros *et al.*, 2008). Das Komplementsystem markiert Bakterien, Pilze und Viren (un-)spezifisch (Bohlsón *et al.*, 2007) für die Aufnahme durch Phagozyten (Opsonisierung) (Janssen *et al.*, 2006) und kann eine Zellyse durch Bildung von Poren in der Membran herbeiführen (Hadders *et al.*, 2007). Die Aktivierung der Komplementkaskade erfolgt entweder durch lösliche Proteine mit Mustererkennungs-Funktion wie z.B. das Mannose-bindende-Lektin (Fujita, 2002), durch spontane Hydrolyse (Pangburn *et al.*, 1981) oder durch die Bindung von Komplementfaktoren an gebundene Antikörper (Kaufmann, 2008; Schneider und Zacharias, 2012), die von Antigen-spezifischen Plasmazellen sezerniert werden (Slifka *et al.*, 1998). In Folge der Komplementaktivierung läuft eine proteolytische Kaskade ab, welche zur

Oponisierung des Antigens durch die Spaltprodukte der Komplementfaktoren C3 oder C5 führt (Schraufstatter *et al.*, 2002), die wiederum weitere Immunzellen durch Bindung an Komplementrezeptoren (wie z.B. CD21 und CD35) auf der Zelloberfläche aktivieren können (Carroll, 1999; Holers, 2014). Zudem entstehen durch die Komplementkaskade chemotaktisch wirksame Spaltprodukte, die weitere Immunzellen zum Infektionsherd attrahieren können (Helmy *et al.*, 2006). Das Komplementsystem ist ein humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems und bildet ein zentrales Bindeglied zum adaptiven Immunsystem (Carroll, 2004) und nutzt Bestandteile der humoralen adaptiven Immunantwort, um Antigen-spezifisch Pathogene zu eliminieren (Bohlson *et al.*, 2007). Mutationen in den Genen des Komplementsystems können u.a. das Risiko für schwere Infektionen (Meningitis, Pneumonie und Sepsis) mit Polysaccharid-verkapselten Bakterien steigern (Fijen *et al.*, 1994; Skattum *et al.*, 2011).

1.3 Adaptive Immunität

Kriterien für adaptive Immunität sind Antigen-Spezifität, Anpassungsfähigkeit und Gedächtnis-Bildung (Ahmed und Gray, 1996). Antigen-Spezifität bei der erstmaligen Begegnung wird durch ein breites Repertoire hochvariabler Antigenrezeptoren ermöglicht und kann bei B-Zellen einer Reifung (Adaptation) während einer Immunantwort unterliegen (Rajewsky, 1996). Gedächtnis-Zellen reagieren mit kürzerer Latenzzeit und vermitteln ihre Effektorfunktionen effizienter verglichen mit naiven Lymphozyten (Bernasconi *et al.*, 2002; Good *et al.*, 2009) Dadurch schützt das immunologische Gedächtnis vor einer Re-Infektion oder mildert den Krankheitsverlauf erheblich ab. Dieser Schutz kann lebenslang anhalten (Crotty *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2008).

Adaptive Immunität ist ein zeitaufwändiger, energieintensiver und regulierter Prozess, der bei einer erstmaligen Begegnung mit einem Fremdartigen (primäre Immunantwort) mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nehmen kann (De Silva und Klein, 2015; Hollowood und Macartney, 1992). Bei einer Reinfektion, d.h. einer sekundären Immunantwort auf das gleiche Antigen, werden spezifische Gedächtnis-Zellen reaktiviert und die erneute Immunantwort erfolgt deutlich

schneller und mit größerer Intensität im Vergleich zur primären Infektion (Ahmed und Gray, 1996; Rajewsky, 1996).

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören B- und T-Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) (Cooper *et al.*, 1965; LeBien und Tedder, 2008). Diese umfassen jeweils ab der Geburt Antigen-naive Populationen sowie Gedächtniszellen, die erst in Folge von Infektionen bzw. Vakzinierungen gebildet werden (Ahmed und Gray, 1996; Rajewsky, 1996). B- und -T-Gedächtniszellen umfassen funktionell und phänotypisch heterogene, spezialisierte Subpopulationen, die sich z.B. anhand ihrer Rezirkulation, Gewebslokalisation, funktionellen Kapazität, Differenzierungspotential und der Expression von Zytokinen und Zelloberflächenmolekülen unterscheiden (Restifo und Gattinoni, 2013; Seifert und Küppers, 2016; Seifert *et al.*, 2015; Yamane und Paul, 2012).

Die Zellen des adaptiven Immunsystems exprimieren Antigenrezeptoren, die durch somatische Genumlagerung und Verknüpfung von Genen (Kapitel 1.4) während der Reifung im Knochenmark bzw. Thymus aus einer Vielzahl von individuellen Genen gebildet werden (Schatz, 2004). T-Zellen erkennen mittels T-Zell-Rezeptor ausschließlich Proteinfragmente (Peptide), die für diesen Zweck auf spezialisierten Proteinkomplexen auf der Oberfläche somatischer Zellen präsentiert werden müssen (Garcia und Adams, 2005; Reinherz *et al.*, 1999). Die Präsentation von Peptidfragmenten auf den Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (Abk. MHC von engl. *major histocompatibility complex*) erfolgt durch alle kernhaltigen somatischen Zellen (Boegel *et al.*, 2018; Hewitt, 2003) und kann zur Aktivierung von T-Zellen führen, die den Ko-Rezeptor CD8 exprimieren (Gao *et al.*, 1997). Diese CD8⁺ T-Zellen (Zytotoxische T-Lymphozyten) erkennen infizierte Zellen an der Expression nicht-keimbahn kodierter Proteine, die von Viren oder intrazellulären Bakterien gebildet werden (Zinkernagel und Doherty, 1974). Die Präsentation von Peptidfragmenten auf MHC II erfolgt durch Antigen-präsentierende Zellen, die zuvor durch Phagozytose oder Makropinozytose Antigene aufgenommen und prozessiert haben (Germain, 1994; Segura und Villadangos, 2009). Peptidfragmente auf MHC II werden von T-Zellen mit dem Ko-Rezeptor CD4 erkannt (Biddison *et al.*, 1982, 1983), welche auch T-Helfer-Zellen (Abk. T_H)

genannt werden und spielen bei der Aktivierung von Makrophagen (T_H1 - Zellen) und B-Lymphozyten (T_H2 -Zellen) sowie in der Selektion während der Keimzentrumsreaktion (engl. *germinal center*, Abk. GC; folliculäre T_H -Zellen, Abk. fT_H) eine wesentliche Rolle (Mosmann *et al.*, 1986; Nurieva *et al.*, 2008; Saravia *et al.*, 2019; Shulman *et al.*, 2014). T_H17 -Zellen spielen eine Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene und Pilze und sind durch die Sezernierung von Interleukin-17 charakterisiert (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Ferner gehören regulatorische T-Zellen zur Gruppe der $CD4^+$ T-Zellen, die z.B. durch Sezernierung von Interleukin-10 und Transformierender Wachstumsfaktor- β (engl. *transforming growth factor beta*) vor überschießenden Immunreaktionen schützen und für die koordinierte Beendigung einer Immunantwort wichtig sind (Li *et al.*, 2006; Rubtsov *et al.*, 2008b; Sakaguchi *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu T-Zellen können B-Zellen mittels BCR (engl. *B cell receptor*, Abk. BCR) Antigene in ihrer nativen Konformation erkennen und sind in ihrer Spezifität nicht auf Proteinantigene limitiert, sondern können Epitope sämtlicher chemischen Verbindungen, darunter auch Kohlenhydrate oder Lipide, erkennen (Galli *et al.*, 2003; Mond *et al.*, 1995; Mosier und Subbarao, 1982).

Antikörper sind lösliche BCR (Alt *et al.*, 1980; Early *et al.*, 1980b; Rogers *et al.*, 1980), werden von Plasmazellen sezerniert (Fagraeus, 1948) und sind die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems (Metchnikoff und Binnie, 1905). Plasmazellen unterscheiden sich nach ihrer Gewebslokalisation (Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Darm-assoziierte lymphoide Gewebe), ihrer Langlebigkeit und der Klasse der sezernierten Immunglobuline (Abk. Ig) (Ellyard *et al.*, 2005; Hammarlund *et al.*, 2003; Slifka *et al.*, 1998). Antikörper zirkulieren über den Blutkreislauf im gesamten Organismus und bieten zusätzlichen Schutz vor (Re-) Infektionen auf den Schleimhäuten im respiratorischen- und Verdauungstrakt (Strugnell und Wijburg, 2010).

1.4 Die Bildung des B-Zell-Rezeptors durch V(D)J-Rekombination

Während der Reifung von B-Zellen im Knochenmark (Allman *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 2008) und T-Zellen im Thymus (Takahama, 2006) erfolgt die Bildung von

Antigenrezeptoren aus einer Vielzahl Keimbahn-kodierter Gene (Matsuda und Honjo, 1996) und wird im Folgenden am Beispiel von B-Lymphozyten beschrieben. Ein BCR besteht aus jeweils zwei schweren (engl. *heavy*) und leichten (engl. *light*) Polypeptidketten, die jeweils carboxyterminal eine konstante und aminoterminal eine variable Region enthalten und durch proteolytische Spaltung mit Papain in zwei Antigen-bindende Fragmente und ein kristallisierbares Fragment (Abk. Fc, engl. *fragment crystallisable*) ohne Antigen-bindende Funktion gespalten werden können (Pleiman *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1995). Die konstanten Regionen der schweren und leichten Ig-Ketten des BCR sind vollständig keimbahn-kodiert, wobei die konstante Region der schweren Ig-Kette membrangebunden die Signalweiterleitung und Interaktion mit anderen Membranproteinen und Komponenten des BCR-Signalkomplexes (Cambier *et al.*, 1994; DeFranco *et al.*, 1995) bzw. als sezernierter Antikörper die Effektorfunktionen vermittelt (z.B. Bindung an Fc-Rezeptoren, Opsonisierung, Komplementaktivierung) (Daeron, 1997; Davies und Metzger, 1983). Die variablen Regionen vermitteln die Antigenspezifität und bestimmen die Affinität des jeweiligen BCR (Saphire *et al.*, 2001; Wu und Kabat, 1970). BCR werden durch Umlagerung und Verknüpfung von Keimbahn-kodierten Genen gebildet und enthalten an den Verknüpfungsstellen zwischen den Genen nicht-Keimbahn-kodierte (N-) Nukleotidsequenzen, die durch zufälliges Anfügen und Entfernen von Basen an den Enden der Gene entstehen (Agrawal und Schatz, 1997; Komori *et al.*, 1993). Durch diese Mechanismen entsteht eine so hohe Diversität, dass jede neu gebildete B-Zelle eine einzigartige Kombination aus variablen Regionen der schweren und leichten Ketten des BCR exprimiert (Weigert *et al.*, 1980).

Bei der V(D)J-Rekombination bzw. somatischen Rekombination werden DNA-Bereiche der Ig-Loci auf den Chromosomen 14 (Schwerkettenloкус) sowie Chromosomen 2 (κ -Leichtkettenloкус) und 22 (λ -Leichtkettenloкус) umgelagert (Matsuda und Honjo, 1996; Schatz, 2004). Die Bildung der variablen Region der schweren Kette erfolgt durch RAG1- und RAG2-abhängige Umlagerung eines von 27 funktionalen D- (engl. *diversifying*) und eines von sechs J- (engl. *joining*) Genen und anschließender Umlagerung eines von ca. 40 V- (engl. *variable*) Genen an die DJ-Genumlagerung (Agrawal und Schatz, 1997; Early *et al.*, 1980a). An den

Verknüpfungsstellen zwischen den V-, (D-) und J-Genen einer Genumlagerung kann durch zufälliges Entfernen und Einfügen von N-Nukleotiden durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase, die V(D)J-Diversität erheblich gesteigert werden (Gilfillan *et al.*, 1993; Komori *et al.*, 1993). Eine VDJ-Rekombination der schweren Ig-Kette wird als produktiv bezeichnet, wenn das korrekte Leseraster der Nukleotidsequenz bei der Translation genutzt wird, das Protein korrekt faltet und kein Stopcodon entstanden ist (Bankovich *et al.*, 2007; Monroe, 2006). Die Produktivität der VDJ-Genumlagerung wird durch Expression der V-Region der schweren Kette in Verbindung mit der konstanten Region des μ -Gens und den Proteinen VpreB und $\lambda 5$ als Ersatz für die leichte Kette (engl. *surrogate light chain*) im Prä-B-Zell-Stadium getestet (Aslam *et al.*, 2020; Karasuyama *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993; Rolink *et al.*, 1994; Sakaguchi und Melchers, 1986; Winkler *et al.*, 1995). Wenn der Prä-BCR unproduktiv ist und nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann (Aslam *et al.*, 2020; Kitamura *et al.*, 1991), kann eine VDJ-Rekombination auf dem zweiten Allel des Schwerekettenlokus erfolgen (Ehlich *et al.*, 1994; Kleinfield *et al.*, 1986; Reth *et al.*, 1986).

Wenn der Prä-BCR erfolgreich auf der Oberfläche exprimiert werden kann, wird eine Rekombination auf dem zweiten Schwerekettenallel unterbunden (allelische Exklusion) (Grawunder *et al.*, 1995; Karasuyama *et al.*, 1994; Papavasiliou *et al.*, 1995) und die Rekombination der Gene der leichten Kette wird eingeleitet (Melchers *et al.*, 1999; Monroe *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999). Hierfür wird beginnend auf dem κ -Ig-Lokus eines von ca. 40 V-Genen mit einem von fünf J-Genen verknüpft. Neben dem zweiten Allel des κ -Ig-Lokus stehen für die Bildung einer leichten Kette des BCR zwei Allele des λ -Ig-Lokus, welche jeweils ca. 30 V-Gene und 4 J-Gene umfassen, zur Verfügung (Frippiat *et al.*, 1995; Malcolm *et al.*, 1982). Rezeptor-Editierung, Ersatz der schweren oder leichten Ig-Kette und periphere Deletion beseitigen autoreaktive Spezifitäten aus dem BCR-Zell-Repertoire (Casellas *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1995b; Cyster *et al.*, 1994; Ghia *et al.*, 1995; Prak und Weigert, 1995; Russell *et al.*, 1991). Die Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR, engl. *complementarity determining region*) der schweren und leichten Ketten des BCR vermitteln die

Bindung zwischen einem BCR bzw. Antikörper und einem Antigen (Decanniere *et al.*, 2000). Die Gerüstregionen (engl. *framework regions*) der schweren und leichten Ketten des BCR sind für die korrekte Proteinfaltung wichtig (Davies und Metzger, 1983). An den Verknüpfungsstellen zwischen V-, (D-) und J-Genen der schweren und leichten Ketten befinden sich die hochvariablen CDRIII (Johnson und Wu, 2000; Wu und Kabat, 1970), die für jede neu gebildete B-Zelle einzigartig sind und als molekularer Fingerabdruck bzw. klonaler Marker genutzt werden können.

Schätzungen der möglichen Diversität humaner BCR reichen von 10^{12} bis 10^{18} (Elhanati *et al.*, 2015; Weigert *et al.*, 1980). Die V(D)J-Rekombination ermöglicht die Bildung eines hoch-diversen BCR-Repertoires aus einer begrenzten Anzahl Keimbahn-kodierter Gene (Matsuda und Honjo, 1996). Der individuelle B-Zell-Pool enthält potenziell spezifische B-Zellen für eine ebenso große Vielfalt an fremd-Antigenen. Mechanismen, die eine Steigerung der Quantität Antigen-spezifischer B-Zellen und ihrer BCR-Qualität während einer Immunreaktion ermöglichen, sind die klonale Expansion und Affinitätsreifung in der GC-Reaktion (Burnet, 1959; Cyster und Allen, 2019; Rajewsky, 1996).

1.5 Die primäre Fokusreaktion und die Keimzentrumsreaktion

Neu gebildete B-Lymphozyten verlassen das Knochenmark und reifen zu Antigen-unerfahrenen (naiven) B-Zellen (Phänotyp: $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{high}}\text{CD38}^{\text{low}}\text{CD5}^{\text{low}}$) (Klein *et al.*, 1998; Loder *et al.*, 1999). Ruhende naive B-Zellen haben eine mittlere Lebensdauer von ca. sechs Wochen, zirkulieren im Blut- und Lymphgefäßsystem und können in B-Zell-Follikel der sekundären lymphatischen Organe (SLO) einwandern (Forster *et al.*, 1996; Fulcher und Basten, 1997; Macallan *et al.*, 2005).

Trifft eine naive B-Zelle auf ein passendes Antigen, kann es zur T-Zell-unabhängigen (Abk. TI, engl. *T-cell independent*) Aktivierung der B-Zelle kommen. Die aktivierte B-Zelle proliferiert und es kommt zu einer Expansion des Antigen-spezifischen B-Zell-Klons (Jacob und Kelsoe, 1992). Viele Klonmitglieder differenzieren in einer sog. primären Fokusreaktion in kurzlebige Plasmazellen aus (Liu *et al.*, 1991). Ein Teil der aktivierten B-Zellen migriert in primäre B-Zell-Follikel und trifft an der Grenzregion von B-Zell-Follikel und T-Zell-Zone auf

ebenfalls aktivierte, Antigen-spezifische T-Zellen (Cyster *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2018; Jacob und Kelsoe, 1992; Schlienger *et al.*, 2000). Aktivierte B-Zellen können in den B-Zell-Follikeln der SLO eine GC-Reaktion initiieren (Kitano *et al.*, 2011; Klein und Dalla-Favera, 2008; MacLennan, 1994). Die GC-Reaktion ist ein iterativer Prozess, der Proliferation, somatische Mutation und Selektion in histologisch unterscheidbaren Regionen des B-Zell-Follikels umfasst (Cyster und Allen, 2019; MacLennan, 1994):

In der dunklen Zone des GC proliferieren Zentroblasten und fügen Mutationen in ihre Ig-Gene ein, wodurch es zum Austausch von Aminosäuren in der Polypeptidkette des BCR kommen und somit die Affinität des BCR zum Antigen beeinflusst werden kann (Hauser *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 1991). Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet (Di Noia und Neuberger, 2007). Die Änderungen der Nukleotidsequenz des BCR entstehen durch die katalytische Funktion des Enzyms Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (Abk. AID), welches Cytidinreste zu Uridinresten umwandelt (Bransteitter *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2003). Diese Änderungen werden von fehleranfälligen DNA-Reparaturmechanismen erkannt und beseitigt (Di Noia und Neuberger, 2007). Durch Fehler während der DNA-Reparatur entstehen Punktmutationen, und auch Insertionen oder Deletionen (Goossens *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Zudem birgt dieser Prozess ein Risiko für Gentranslokationen, die Lymphompathogenese verursachen können (Goossens *et al.*, 1998; Odegard und Schatz, 2006).

In der hellen Zone des GC erfolgt die Selektion der Zentrozyten durch fT_H -Zellen, basierend auf der jeweiligen Affinität des BCR zum Antigen (Anderson *et al.*, 2009; Bannard *et al.*, 2013). Antigen-spezifische GC-B-Zellen konkurrieren um Antigen auf der Oberfläche von follikulären DZ (Ferguson *et al.*, 2004; Heesters *et al.*, 2013). Zentrozyten präsentieren fT_H -Zellen Antigenfragmente via MHC-II und erhalten im Gegenzug Überlebenssignale (Meyer-Hermann *et al.*, 2006; Schwickert *et al.*, 2011). GC-B-Zellen mit einer höheren Affinität können größere Mengen natives Antigen binden und aufnehmen und erhalten dadurch vermehrt Überlebenssignale von fT_H -Zellen (Gitlin *et al.*, 2014; Vitoria *et al.*, 2010). Mutationen in den Ig-Genen, die die Affinität zum Antigen nicht oder negativ beeinflussen oder zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führen, erhalten weniger bzw.

keine Überlebenssignale durch die Interaktion mit fT_H -Zellen (Anderson *et al.*, 2009). Die betreffende B-Zelle initiiert den programmierten Zelltod (Apoptose) und wird von GC-Makrophagen phagozytiert (Scott *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1998).

Innerhalb von Tagen bis Wochen entstehen in der GC-Reaktion klonal expandierte, hochaffine, spezifische B-Zellen, von denen einige durch AID-abhängige somatische, irreversible Umlagerung der konstanten Region der schweren Kette (Klassenwechsel-Rekombination) BCR der Isotypen IgG, IgA oder IgE exprimieren können (Avery *et al.*, 2008; Budeus *et al.*, 2015; Chaudhuri und Alt, 2004; McHeyzer-Williams *et al.*, 1991; Seifert und Küppers, 2009; Wu *et al.*, 2010). Diese GC-erfahrenen, affinitätsgereiften B-Zellen können zu Plasmazellen differenzieren (Gitlin *et al.*, 2016; Shapiro-Shelef und Calame, 2005), deren sezernierten Antikörper unterschiedliche Effektorfunktionen vermitteln, abhängig von der konstanten Region der schweren Ig-Kette (Isotyp, Antikörperklasse): IgM und IgG3 Antikörper aktivieren effizient die Komplementkaskade (Diebolder *et al.*, 2014; Hughey *et al.*, 1998). IgG-Antikörper können Antigene neutralisieren (Parren und Burton, 2001). Antikörper können außerdem mit der konstanten Region der schweren Ig-Ketten an Fc-Rezeptoren binden: IgE-Antikörper sensibilisieren Mastzellen (Kalesnikoff *et al.*, 2001). Multimere IgM und IgA Antikörper können durch Interaktion mit dem pIgR (engl. *polymeric immunoglobulin receptor*) über Epithelien transportiert werden und kleiden die Schleimhäute des Verdauungs- und respiratorischen Traktes aus (Johansen und Kaetzel, 2011; Mostov, 1994; Song *et al.*, 1994). IgG-Antikörper opsonisieren Antigene und können zudem durch Interaktion mit dem FcRn (engl. *neonatal Fc receptor*) über die Blut-Plazenta-Schranke transportiert werden, wodurch mütterliche IgG-Antikörper in Form einer passiven Immunisierung einen sog. „Nestschutz“ im Neugeborenen vermitteln (Akilesh *et al.*, 2008; Niewiesk, 2014). Fc-Rezeptor-vermittelte Effektorfunktionen von Antikörpern bilden eine Schnittstelle zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem (Daeron, 1997). Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten und Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems tragen zur effizienten Beseitigung von Pathogenen aus dem Organismus bei (Gasque, 2004; Nimmerjahn und Ravetch, 2007). Antigen-spezifische Antikörper im Serum und der Lymphe

vermitteln langanhaltenden Schutz vor Reinfektion (Hammarlund *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2008).

Die zentrale Funktion von fT_H -Zellen bei der Selektion von GC-B-Zellen wird bei deren Fehlen in Knockout-Mausmodellen deutlich (Defrance *et al.*, 2011): TI-GC-Reaktionen sind sehr kurzlebig und brechen innerhalb weniger Tage ab (de Vinuesa *et al.*, 2000; Toellner *et al.*, 2002). GC-B-Zellen in TI GC-Reaktionen exprimieren BCL6 und AID, jedoch mutieren < 20 % der B-Zellen in geringem Umfang ihre Ig-Gene (ein bis zwei Mutationen pro Genumlagerung), wohingegen GC-Reaktion mit T-Zell-Unterstützung im gleichen Zeitraum durchschnittlich 85 % der B-Zellen bis zu sechs Mutationen in ihren Ig-Genen tragen (Toellner *et al.*, 2002). Mögliche Ursachen für die limitierte Mutationsfrequenz trotz hoher Antigen-Verfügbarkeit auf folliculären DZ könnten verminderte Zirkulation der GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone des GC und fehlende Signale u.a. via CD40L durch fT_H -Zellen sein (Toellner *et al.*, 2002).

Zyklische Proliferation, Mutation und Selektion in der GC-Reaktion sind die Grundlage für Affinitätsreifung (MacLennan, 1994), wodurch in der GC-Reaktion Antigen-spezifische Gedächtnis-B-Zellen und langlebige Plasmazellen gebildet werden, welche hochaffine BCR exprimieren, bzw. Antikörper sezernieren (McHeyzer-Williams *et al.*, 1991).

1.6 Gedächtnis-B-Zellen

Klassische Merkmale von GC-erfahrenen Gedächtnis-B-Zellen sind die Klassenwechsel-Rekombination und AID-abhängige Mutationen in den Ig-Genen, die in den CDR der variablen Regionen von schwerer und leichter Kette angereichert sind (Coffman und Cohn, 1977; Yefenof *et al.*, 1985; Yuan *et al.*, 1977). Die klassische Definition umfasst somit vor allem klassengewechselte, Ig-mutierte B-Zellen (McHeyzer-Williams *et al.*, 1991). Nach einer erweiterten Definition sind Gedächtnis-B-Zellen Lymphozyten, die nach vorherigem Antigen-Kontakt zu einem ruhenden Zustand zurückgekehrt sind, längere Zeit nach einer primären Infektion im Organismus persistieren und bei einer Reinfektion schneller und effizienter reagieren als naive B-Zellen (Good *et al.*, 2009; Good *et al.*, 2006; Tangye

et al., 2003a; Tangye *et al.*, 2003b; Weisel und Shlomchik, 2017). Die erweiterte Definition umfasst im Menschen ebenso Ig-unmutierte, IgM⁺ und CD27-B-Zell-Populationen (Ehrhardt *et al.*, 2005; Fecteau *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007).

Gedächtnis-B-Zellen sind bei ihrem Überleben und einer Reaktivierung nicht zwingend auf T-Zell-Hilfe angewiesen, um eine protektive Immunantwort auszulösen (Vieira und Rajewsky, 1990). Abhängig vom Umfang der vorherigen GC-Erfahrung sind frühe (vor allem IgM⁺) Gedächtnis-B-Zellen bei erneutem Antigenkontakt stärker geneigt, erneut an einer GC-Reaktion teilzunehmen (Seifert *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2003), wohingegen spätere (überwiegend klassengewechselte, d.h. IgG⁺, IgA⁺ oder IgE⁺) Gedächtnis-B-Zellen eine stärkere Geneigtheit zur Plasmazell-Differenzierung haben (Agematsu *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1992; Seifert *et al.*, 2015). Die Dendrogrammstruktur von B-Zell-Klonen verdeutlicht die Arbeitsteilung im Gedächtnis-Kompartiment: Klassengewechselte Klonmitglieder sind häufig am Ende von langen Ästen, was auf viele Zyklen aus Mutation und Selektion in GC hindeutet (Budeus *et al.*, 2015; Seifert und Küppers, 2009). IgM⁺ Mitglieder desselben Klons sind häufig weniger stark mutiert und umfassen häufig diverse BCR-Varianten, die das Potenzial haben Varianten des Antigens zu erkennen (Budeus *et al.*, 2015; Purtha *et al.*, 2011; Seifert und Küppers, 2009). Die Selektion eines breiten Repertoires reaktiver BCR-Varianten vor und während der GC-Reaktion wirkt der Immunevasion von Pathogenen durch Mutation ihrer Antigene entgegen (Andrews *et al.*, 2019; Inamine *et al.*, 2005; Toyama *et al.*, 2002; Viant *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020). Eine vergleichbare immunologische Arbeitsteilung wurde für murine IgM⁺ bzw. IgG⁺ Gedächtnis-B-Zell-Populationen beschrieben (Zuccarino-Catania *et al.*, 2014). Naive B-Zellen haben das Potenzial an GC-Reaktionen teilzunehmen sowie in primären Fokusreaktionen zu Plasmablasten zu differenzieren, jedoch mit größerer Verzögerung als Gedächtnis-B-Zellen (Good *et al.*, 2009; Good *et al.*, 2006; Good und Tangye, 2007; Mesin *et al.*, 2020; Tangye *et al.*, 2003a; Tangye *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2020). Durch diese Arbeitsteilung zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen einerseits und zwischen IgM⁺ und IgG⁺ Gedächtnis-B-Zellen andererseits entstehen in einer sekundären Immunreaktion sowohl Antikörper-sezernierende Effektorzellen als auch neue GC-Reaktionen, die wiederum

Gedächtnis-B-Zellen hervorbringen (Turner *et al.*, 2020; Weisel und Shlomchik, 2017).

Neuere Mausmodelle zeigen, dass ein überraschend geringer Anteil Antigen-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen erneut in GC-Reaktionen während sekundären Infektionen eintritt und die meisten GC-B-Zellen erneut aus dem Fundus naiver B-Zellen stammen (Mesin *et al.*, 2020). Stattdessen differenzieren hoch-affine GC-B-Zellen einer primären Immunreaktion und ab einer sekundären Immunreaktion ebenfalls hoch-affine Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen und vermitteln eine humorale Immunantwort (Wong *et al.*, 2020). Diese Studien erweitern das immunologische Gedächtnis um die Merkmale der Antigen-Aktivierung, Langlebigkeit und niedrigeren Ansprechempfindlichkeit von B-Zellen bei erneuter Infektion (Weisel und Shlomchik, 2017). Nach diesen Kriterien können GC-unerfahrene B-Zellen ebenfalls Gedächtnis-B-Zellen sein (Foote und Kearney, 2009; Kaji *et al.*, 2012; Takemori *et al.*, 2014).

Aus GC-abhängigen Immunreaktionen gehen Ig-mutierte, affinitätsgereifte, klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen und langlebige Plasmazellen hervor (Cyster und Allen, 2019). Der GC-Ursprung und die Gedächtnis-B-Zell-Identität von Ig-mutierten IgM⁺ B-Zellen wurden angezweifelt (Tangye und Good, 2007; Weller *et al.*, 2004). Eine Subpopulation humaner IgM⁺ B-Zellen exprimiert mutierte Ig-Gene und ist durch die Oberflächenexpression des Gedächtnis-B-Zell-Markers bzw. T-Zell-Interaktionsmoleküls CD27 charakterisiert (Klein *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Tangye *et al.*, 1998). Humane IgM⁺CD27⁺ B-Zellen haben eine höhere Geneigtheit in sekundäre GC-Reaktionen einzutreten als naive oder IgG⁺CD27⁺ B-Zellen und exprimieren ein Genexpressionsprofil mit hoher Ähnlichkeit zu IgG⁺CD27⁺ B-Zellen (Seifert *et al.*, 2015). Darüber hinaus sind IgM⁺CD27⁺ B-Zellen häufig klonal mit klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen verwandt (Budeus *et al.*, 2015; Seifert und Küppers, 2009). Es wurde daher vorgeschlagen, dass IgM⁺CD27⁺ B-Zellen in GC-Reaktionen gebildet werden, jedoch das GC vor der Klassenwechsel-Rekombination verlassen (Budeus *et al.*, 2015; Insel *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1994, 1997; Klein *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1994; Seifert und Küppers, 2009). Die Existenz von affinitätsgereiften IgM-

Gedächtnis-B-Zellen wurde in Mausmodellen bestätigt (Soenawan *et al.*, 2004; White und Gray, 2000; Yuan *et al.*, 1977; Zuccarino-Catania *et al.*, 2014).

Es wurden jedoch auch alternative Herkunftsszenarien für IgM-Gedächtnis-B-Zellen vorgeschlagen: denen zufolge entstehen humane IgM⁺CD27⁺ B-Zellen entweder in TI-Immunantworten oder werden mittels primärer BCR-Diversifizierung Antigen-unabhängig gebildet (Kruetzmann *et al.*, 2003; Scheeren *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2008). Diese alternativen Herkunftsszenarien beruhen auf der Entstehung von Ig-mutierten IgM⁺CD27⁺ B-Zellen, jedoch dem selektiven Fehlen von klassengewechselten B-Zellen im peripheren Blut (Abk. PB) von Individuen mit somatischen Mutationen u.a. in den Genen CD40, CD40LG, SH2D1A, UNG, ICOS oder ICOSLG (Hyper-IgM-Syndrom oder Variables Immundefektsyndrom, engl. *common variable immunodeficiency*) (Agematsu *et al.*, 1998; Grimbacher *et al.*, 2003; Gulino und Notarangelo, 2003; Ma *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2005; Warnatz *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001). Vorgenannte Gendefekte beeinträchtigen die Klassenwechsel Rekombination durch eine gestörte B-Zell-T-Zell-Interaktion (Gulino und Notarangelo, 2003) und resultieren in der Abwesenheit von GC-Reaktionen in der Milz und in Lymphknoten (Ma *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2005; Warnatz *et al.*, 2006). Diese Daten sind die Basis für die Hypothese, dass humane Ig-mutierte IgM⁺CD27⁺ B-Zellen, die trotz dieser Gendefekte gebildet werden können, keine klassischen GC-abstammenden Gedächtnis-B-Zellen sind (Longo *et al.*, 2009; Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001). Diese Hypothesen besagen, dass humane IgM⁺CD27⁺ B-Zellen GC-unabhängig entstehen und ihrer Ig-Gene entweder mittels Antigen- und T-Zell-unabhängiger sog. „primärer Ig-Repertoire Diversifizierung“ oder in TI-Immunreaktionen mutieren, da B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe das Gen AICDA exprimieren und Ig-Mutationen tragen können (Scheeren *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004). Primäre BCR-Diversifizierung existiert in Hühnern und einigen Säugetieren wie Kaninchen und Schafen und ist in diesen Arten für die Bildung eines breiten Ig-Repertoires essenziell, da die Ig-Repertoire-Diversität durch Rekombination von Gensegmenten eine untergeordnete Rolle spielt (Reynaud *et al.*, 1994; Reynaud *et al.*, 1995; Vajdy *et al.*, 1998). Der Prozess der AID-abhängigen primären Diversifizierung (Gen-Konversion und somatische

Hypermuation) finden in spezialisierten Darm-assoziierten Strukturen früh im Leben von Hühnern und Schweinen statt und kann vom Darmmikrobiom beeinflusst werden (Granato *et al.*, 2015). Zur Rolle des Darm-assoziierten lymphoiden Gewebes bei der Diversifizierung von Ig-Genen humaner IgM-Gedächtnis-B-Zellen ist wenig bekannt. Im humanen B-Zell-System gibt es lediglich Hinweise auf einen immunologischen Kontrollpunkt, der autoreaktive transitionelle B-Zellen aus dem B-Zell-Pool eliminiert: Dieser Mechanismus lokalisiert in den lymphoiden Geweben des menschlichen Darms und ist in Individuen mit Systemischem Lupus erythematodes gestört, wodurch es zur Akkumulation von autoreaktiven naiven B-Zellen kommt (Vossenkamper *et al.*, 2013).

Eine alternative Hypothese zur Existenz von Ig-mutierten IgM-Gedächtnis-B-Zellen im PB von Hyper-IgM-Patienten sind unvollständige oder defekte (engl. *abortive*) GC-Reaktionen, in denen aktivierte B-Zellen zwar proliferieren und erste Mutationen in die Ig-Gene einfügen, danach jedoch keine weitere Selektion stattfindet und ein Teil der aktivierten B-Zellen in diesem frühen Stadium der GC-Reaktion zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren (Facchetti *et al.*, 1995). Es sind zudem alternative Liganden für CD40 beschrieben worden, wie das C4b-bindende Protein, die das Fehlen von CD40LG teilweise kompensieren könnten (Brodeur *et al.*, 2003).

Neuere Veröffentlichungen legen eine hohe Komplexität des immunologischen Gedächtnisses nahe, da es unter CD27⁺ B-Zellen ebenfalls Ig-mutierte bzw. IgG⁺ und IgA⁺ B-Zellen gibt, die möglicherweise zur funktionellen Diversität und Flexibilität des immunologischen Gedächtnisses beitragen (Ehrhardt *et al.*, 2005; Fecteau *et al.*, 2006; Tangye *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2007). Diese sog. „atypischen“ Gedächtnis-B-Zellen werden phänotypisch charakterisiert durch die Expression von Fc-Rezeptor-ähnlichen Molekülen (engl. *Fc-receptor like*) oder niedrigere Expression von CD21 (Isnardi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2015) und sind im humanen PB gesunder Individuen oder in lymphoiden Geweben detektierbar (Ehrhardt *et al.*, 2005). Atypische Gedächtnis-B-Zellen treten in höherer Frequenz im PB von Menschen mit verschiedensten Erkrankungen auf, darunter Autoimmunität, Immundefizienzen und chronische Infektionen (Charles

et al., 2011; Dauby *et al.*, 2014; Moir *et al.*, 2008; Rakhmanov *et al.*, 2009). Es ist unklar, welche funktionelle Bedeutung atypische Gedächtnis-B-Zellen im menschlichen Immunsystem unter physiologischen Bedingungen einnehmen, da es Hinweise auf eingeschränkte Funktionalität oder Anergie gibt (Isnardi *et al.*, 2010; Moir *et al.*, 2008; Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015). Ein weiterer phänotypischer Marker für humane Gedächtnis-B-Zellen ist das Oberflächenmolekül CD45RB^{MEM55}, ein Glykosylierung-abhängiges Epitop auf der Polypeptidkette des CD45-RB-Exons, welches durch den MEM55 Klon erkannt wird (Koethe *et al.*, 2011). CD45RB^{MEM55} wird von humanen Ig-mutierten bzw. klassengewechselten CD27⁻ sowie CD27⁺ B-Zellen exprimiert (Glass *et al.*, 2020).

Eine zentrale Frage in der Immunität des Menschen ist, wie Impfungen oder lokale Immunreaktionen wie z.B. Infektionen der Atemwege oder des Verdauungstraktes langanhaltenden, systemischen Immunschutz vermitteln (Crotty *et al.*, 2003; Giesecke *et al.*, 2014; Mamani-Matsuda *et al.*, 2008; Quiding *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 2008). In Kleintiermodellen wurde gezeigt, dass orale Immunisierung oder lokale Infektionen die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen auslöst, die in der Milz, im PB, in mesenterialen Lymphknoten und Lymphknoten des Darms detektierbar sind (Bemark *et al.*, 2016; Fazilleau *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 1988; Onodera *et al.*, 2012; Riedel *et al.*, 2020). Lokale Bildung von Gedächtnis-B-Zellen und die Verteilung im Organismus durch Rezirkulation ermöglichen systemischen Immunschutz bei Reinfektion.

1.7 Die Milz und splenische Marginalzonen

Die menschliche Milz befindet sich im linken oberen Quadranten des Abdomens, hat bei erwachsenen Individuen etwa die Dimensionen 4 x 7 x 11 cm und ist das größte SLO des Organismus (Lewis *et al.*, 2019). Die Milz nimmt im Immunsystem eine Sonderrolle ein: im Gegensatz zu den Lymphknoten, die im gesamten Körper verteilt sind und Fremdartigen aus der Lymphe für einen jeweils definierten anatomischen Bereich filtrieren, dient die Milz der Filtration des PB (Mebius *et al.*, 2004). Diese Funktion der Milz wird vom besonderen anatomischen Feinbau der Milz vermittelt (Mebius und Kraal, 2005).

Die histologischen Bereiche der Milz unterscheiden sich durch ihre zelluläre Zusammensetzung und (immunologische) Funktion (Kraal, 1992). In der Roten Pulpa findet die Beseitigung gealterter und beschädigter Erythrozyten, Proteinaggregate und zirkulierender Autoantigene sowie das Eisen-Recycling statt (Lewis *et al.*, 2019). Darüber hinaus befinden sich in der Roten Pulpa Plasmazellen (Ellyard *et al.*, 2005).

Die Weiße Pulpa ist entlang der kleinen Arteriolen der Milz angeordnet und gliedert sich in eine periarteriolare lymphoide Scheide (engl. *periarteriolar lymphoid sheath*, Abk. PALS), die vor allem T-Zellen beherbergt, und B-Zell-Follikel, die in regelmäßigen Abständen entlang der PALS verteilt sind (Lewis *et al.*, 2019). Sekundäre Follikel sind von einer Mantelzone sowie der splenischen Marginalzone (Abk. sMZ) und der perifollikulären Zone umgeben (Steiniger *et al.*, 2001). In den ersten beiden Lebensjahrzehnten können die B-Zell-Follikel der menschlichen Milz regelmäßig GC enthalten, in den Jahrzehnten danach treten diese seltener auf (Steiniger *et al.*, 1997; Steiniger *et al.*, 2003; Steiniger *et al.*, 2018). Die Milz von Vertebraten dient häufig als Reservoir für Erythrozyten und Thrombozyten und kann diese durch Kontraktion in die Blutzirkulation freisetzen (Mebius und Kraal, 2005). Eine vergleichbare Kontraktion der menschlichen Milz wurde beschrieben (Ilardo *et al.*, 2018; Stewart und McKenzie, 2002). Die Filtrationsfunktion der Milz kann durch verschiedenste Ursachen krankhaft gesteigert werden und wird als Hypersplenismus bezeichnet (McKenzie *et al.*, 2018). Langfristig äußert sich ein Hypersplenismus z.B. durch Anämie und Thrombozytopenie (McKenzie *et al.*, 2018; Pozo *et al.*, 2009). Zudem ist eine krankhafte Vergrößerung, sog. Splenomegalie, z.B. bei Infektionskrankheiten (Epstein-Barr-Virus, Humane Immundefizienz-Virus, bakterielle Infektionen), malignen Tumoren (darunter Lymphome, wie das splenische Marginalzonen-Lymphom, Haarzelleukämie, Hodgkin-Lymphom) aber auch bei bestimmten Lebererkrankungen, die einen Rückstau des Blutes zur Folge haben, beschrieben worden (McKenzie *et al.*, 2018; Pozo *et al.*, 2009).

Eine immunologische Sonderrolle kommt einer spezialisierten Population von B-Lymphozyten in der histologisch definierten sMZ zu (Kraal, 1992). Die Milz ist kein überlebensnotwendiges Organ, jedoch zeigen epidemiologische Studien, dass

Immunreaktionen gegen Pathogene im Blutkreislauf, wie z.B. Polysaccharid-verkapselte Bakterien, zu denen die Bakterien *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Typ B (HiB) und *Neisseria meningitidis* gehören, von der Milz bzw. Zellen der sMZ vermittelt werden (Di Sabatino *et al.*, 2011; Edgren *et al.*, 2014). Immunologische und infektiologische Untersuchungen mit Nagetieren stützen diese Auffassung (Balazs *et al.*, 2002; Colino *et al.*, 2002; Guinamard *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 1999; Song und Cerny, 2003). Menschen, die ohne eine funktionelle Milz geboren werden, haben ein gesteigertes Risiko für schwere Infektionen mit o.g. Pathogenen (Di Sabatino *et al.*, 2011). Dies trifft ebenfalls auf Menschen zu, deren Milz z.B. aufgrund eines Traumas (Milzriss) chirurgisch entfernt wurde (Di Sabatino *et al.*, 2011; Kruetzmann *et al.*, 2003). Nach Splenektomie ist eine starke Reduktion von Gedächtnis-B-Zellen beobachtet worden (Cameron *et al.*, 2011). Die Entfernung der Milz verändert die B-Zell-Zusammensetzung in SLO (Carsetti *et al.*, 2019). Die protektive Funktion der menschlichen Milz gegenüber Infektionen des Blutkreislaufs ist offenbar erst ab einem Alter von zwei Jahren voll ausgebildet und kann im hohen Alter (> 65 Jahre) verloren gehen, da diese beiden Altersgruppen verglichen mit erwachsenen Individuen zwischen 20 und 50 Jahren ebenfalls ein höheres Risiko für schwere und letale Verläufe bei Infektionen mit Polysaccharid-verkapselten Bakterien haben (Carsetti *et al.*, 2006; Sankilampi *et al.*, 1997; Sims *et al.*, 1992). Zahlreiche Studien zeigen, dass die B-Zellen der sMZ die protektive Funktion der Milz in o.g. Infektionen vermitteln (Carsetti *et al.*, 2006; Kruetzmann *et al.*, 2003; Moens *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2005; Wasserstrom *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004). Die zellulären und molekularen Ursachen für die Vulnerabilität gegenüber Infektionen von Kleinkindern und im hohen Alter sind unklar. Mögliche Ursachen umfassen einen quantitativen oder qualitativen Mangel von sMZ- oder IgM-Gedächtnis-B-Zellen sowie unvollständige Reifung bzw. Alterung des Immunsystems (Kruschinski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Timens *et al.*, 1989; Zandvoort *et al.*, 2001) (Kapitel 1.10).

1.8 Splenische Marginalzonen-B-Zellen

Aufgrund der guten Zugänglichkeit ist die Milz im Modellorganismus *Mus musculus* (Hausmaus) ein häufig untersuchtes Organ des Immunsystems (Haley,

2017). Ursprünglich wurden sMZ-B-Zellen in Mäusen und Ratten beschrieben und ihre immunologischen Funktionen charakterisiert (Kraal, 1992; Kumararatne *et al.*, 1981). Murine sMZ-B-Zellen werden ca. zwei Wochen nach der Geburt gebildet (Martin und Kearney, 2002; Mond *et al.*, 1995) und unterscheiden sich phänotypisch von folliculären B-Zellen durch eine höhere Expression von CD21/CD35, niedrigere Expression von CD23 und ein distinktes Expressionsmuster von IgM^{high} und IgD^{low} (Gray *et al.*, 1982; Oliver *et al.*, 1999; Pillai und Cariappa, 2009). Die Bildung muriner sMZ-B-Zellen erfolgt im Stadium 2 von transitionellen B-Zellen (Srivastava *et al.*, 2005) und ist abhängig von anhaltender Signaltransduktion über den NOTCH2-Rezeptor (Hozumi *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2009; Tanigaki *et al.*, 2002) und der Signalstärke bzw. der Autoreaktivität des BCR, was zu einer verzerrten Nutzung von Variablen Ig-Gen-Segmenten durch reife murine sMZ-B-Zellen führt (Carey *et al.*, 2008; Cariappa *et al.*, 2001; Pillai und Cariappa, 2009). Murine sMZ-B-Zellen nehmen meistens nicht an GC-Reaktionen teil, demzufolge sind ihre Ig-Gene unmutiert und sie exprimieren IgM-BCR (Cerutti *et al.*, 2013; Pillai und Cariappa, 2009; Song und Cerny, 2003). Die sMZ-B-Zellen der Maus und der Ratte können unter besonderen Bedingungen auch an GC-Reaktionen teilnehmen und Ig-mutierte, GC-erfahrene Gedächtnis-B-Zellen können in die sMZ einwandern (Anderson *et al.*, 2007; Hendricks *et al.*, 2011; Hendricks *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 1988). Murine sMZ-B-Zellen reagieren schneller als folliculäre B-Zellen auf Stimulation und haben eine stärkere Geneigtheit auf TI-Antigene zu reagieren, die durch eine Bindung an PRR oder Kreuzvernetzung der BCR durch repetitive Antigenmotive eine Aktivierung von B-Zellen auslösen (Oliver *et al.*, 1999; Rubtsov *et al.*, 2008a). Aktivierte murine sMZ-B-Zellen differenzieren schnell zu kurzlebigen Plasmazellen, die große Mengen niedrig-affines IgM sezernieren, wodurch in frühen Phasen von Infektionen in der Abwesenheit von hoch-affinen, affinitätsgereiften Antikörpern Pathogene opsonisiert und beseitigt werden können (Balazs *et al.*, 2002; Garcia de Vinuesa *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001; Pone *et al.*, 2012). Die für Lymphozyten außergewöhnliche Kinetik mit der sMZ-B-Zellen auf Antigene reagieren können und die Unabhängigkeit dieser B-Lymphozyten-Population von T-Zell-Hilfe werden als Vermischung klassischer Merkmale adaptiver und angeborener Immunität betrachtet, daher werden sMZ-

B-Zellen als *innate-like* Lymphozyten bezeichnet (Cerutti *et al.*, 2013). Murine sMZ-B-Zellen sind sessil in der Milz (Gray *et al.*, 1982), ihre Lokalisation in der sMZ erfolgt Integrin-abhängig (Lu und Cyster, 2002) und die Migration beschränkt sich auf das sog. „follikuläre Pendeln“ (engl. *follicular shuttling*) (Arnon *et al.*, 2013), wodurch Komplement- oder Antikörper-opsonisierte Antigene sMZ-B-Zell-vermittelt in die splenischen B-Zell-Follikel transportiert und von follikulären DZ übernommen werden (Cinamon *et al.*, 2008). Aufgrund von Unterschieden zwischen den Spezies sind Erkenntnisse aus dem Studium der Milz in Modellorganismen wie der Maus und Ratte eingeschränkt oder nur indirekt auf den Menschen übertragbar (Steiniger *et al.*, 1997; Steiniger *et al.*, 2006; Steiniger, 2015).

Die korrespondierende sMZ-B-Zell-Population im Menschen unterscheidet sich in mehreren zentralen Aspekten von murinen sMZ-B-Zellen: Humane sMZ-B-Zellen exprimieren den Gedächtnis-B-Zell-Marker CD27 auf der Zelloberfläche (Tangye *et al.*, 1998; Weller *et al.*, 2004). Im Einklang mit einer geringeren Frequenz von Gedächtnis-B-Zellen, exprimieren die B-Zellen der kindlichen sMZ altersabhängig weniger bzw. kein CD27 (Zandvoort *et al.*, 2001). Die sMZ-B-Zellen erwachsener Individuen exprimieren im Gegensatz zu follikulären B-Zellen mutierte Ig-Gene (Dunn-Walters *et al.*, 1995; Tangye *et al.*, 1998; Weller *et al.*, 2004), was auf GC-Erfahrung humaner sMZ-residenter B-Zell-Population hindeutet. Einige Studien zeigten, dass auch in den Modellorganismen der Maus und der Ratte sMZ-B-Zellen Ig-mutiert sein können bzw. als Gedächtnis-B-Zellen aus GC-Reaktionen hervorgehen können (Anderson *et al.*, 2007; Hendricks *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 1988). Es wurde vorgeschlagen, dass humane sMZ-B-Zellen die Milz verlassen und im Blutkreislauf als IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen zirkulieren können (Kruetzmann *et al.*, 2003; Weller *et al.*, 2004). In Lymphknoten, Tonsillen und den Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben des Verdauungstraktes wurden Marginalzonen-ähnliche histologische Regionen beschrieben, die Gedächtnis-B-Zellen enthalten (Dono *et al.*, 2000; Lettau *et al.*, 2020; Puga *et al.*, 2011; Spencer *et al.*, 1985; Tierens *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2018).

Die Gemeinsamkeiten von humanen und murinen sMZ-B-Zellen umfassen den Phänotyp und die schnelle Aktivierbarkeit und infolgedessen die effiziente Differenzierung zu kurzlebigen Plasmazellen (Cerutti *et al.*, 2013).

Humane sMZ-B-Zellen zeigen höhere Expression von CD21, CD35 und niedrigere Expression von CD23 als naive folliculäre B-Zellen, vergleichbar mit murinen sMZ-B-Zellen (Pillai und Cariappa, 2009). Ein humaner sMZ-B-Zell-Vorläufer wurde beschrieben, welcher NOTCH2-abhängig den Phänotypen und das Genexpressionsmuster von sMZ-B-Zellen *in vitro* annimmt (Descatoire *et al.*, 2014). Mutationen in NOTCH2, die zu einer Erhöhung der Stabilität der intrazellulären NOTCH2-Domäne führen, sind im splenischen Marginalzonen-Lymphom häufig (Campos-Martin *et al.*, 2017), was die Bedeutung dieses Signalwegs für sMZ-B-Zellen unterstreicht. Einige Studien deuten darauf hin, dass humane sMZ-B-Zellen keine homogene Population darstellen, sondern eine heterogene Zusammensetzung haben könnten (Garraud *et al.*, 2012): Das menschliche sMZ-B-Zell-Kompartiment enthält unterschiedliche Subpopulationen, die sich durch Expression von IgM bzw. IgG oder IgA und der damit assoziierten Lokalisation in inneren bzw. äußeren Bereichen der sMZ unterscheiden (Colombo *et al.*, 2013; Lettau *et al.*, 2020; Tangye *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2018). Es wurde vorgeschlagen, dass humane sMZ- und IgM-Gedächtnis-B-Zellen in TI- und TD-Immunreaktionen gebildet werden können (Della Valle *et al.*, 2014; Dunn-Walters *et al.*, 1995; Kruetzmann *et al.*, 2003; Tierens *et al.*, 1999; Wasserstrom *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004). In Kindern gibt es Hinweise darauf, dass GC-, T-Zell- und Antigen-unabhängige Mechanismen an der Diversifizierung der Ig-Gene von sMZ-B-Zellen beteiligt sein könnten (Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2008). Allerdings wurde die Expression von AID in der sMZ von Milzbiopsaten adulter Individuen nur sporadisch nachgewiesen (Willenbrock *et al.*, 2005). Zudem ist AID für die Klassenwechsel-Rekombination notwendig und daher kein eindeutiges Merkmal für somatische Mutation (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). IgM-Gedächtnis-B-Zellen aus dem PB erwachsener Individuen sind häufig klonal mit IgG-Gedächtnis-B-Zellen verwandt (Budeus *et al.*, 2015; Seifert und Küppers, 2009). Zumindest diese IgM-Gedächtnis-B-Zellen stammen demnach aus gemeinsamen GC-Reaktionen mit IgG-Gedächtnis-B-Zellen. Da

humane sMZ-B-Zellen im PB als IgM-Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren, könnte dies ein weiterer Hinweis auf ihre GC-abhängige Entstehung sein (Weller *et al.*, 2004).

1.9 Analysen des humanen B-Zell-Rezeptor-Repertoires

Ig-Repertoire-Analysen können wichtige Erkenntnisse über die Reifung, Diversität, Klonalität und Funktionsweise des Immunsystems ableiten (Budeus *et al.*, 2020; Budeus *et al.*, 2015; Gibson *et al.*, 2009; Seifert und Küppers, 2009; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010). Das Ig-Repertoire humaner naiver B-Zellen ist bei der Geburt sehr divers. Die Bildung, Diversifizierung und Antigen-Selektion des Ig-Repertoires beginnen jedoch bereits pränatal und beruhen möglicherweise auf der Selektion durch Autoantigene (Budeus *et al.*, 2020; Rechavi *et al.*, 2015). Bekannte Unterschiede zwischen kindlichen und adulten Ig-Repertoiren umfassen Ig-Mutationsfrequenz, Antigen-Selektion von Mutationen, Isotyp-Subklassen- und Ig-Gen-Nutzung sowie CDRIII-Längenverteilung, letztere beruhen auf verminderter IL7R- und DNMT-Expression von B-Zell-Vorläufern (Ghraichy *et al.*, 2020; IJspeert *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2019; Rother *et al.*, 2016).

Neuere Studien beleuchten vermehrt die klonalen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen unterschiedlichen lymphoiden Geweben des menschlichen Organismus (Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Dabei treten zwei Erkenntnisse in den Vordergrund: Erstens gibt es Gewebs-spezifische B-Zell-Klone, die präferentiell in ähnlichen lymphoiden Geweben detektierbar sind: Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe des Darms verteilen sich über mehrere Meter des Verdauungstraktes, enthalten jedoch klonal verwandte Ig-Sequenzen an verschiedenen Stellen, was auf Rezirkulation über den Blutkreislauf und bevorzugte Gewebslokalisierung hinweist (Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Zweitens finden sich klonal verwandte Ig-Sequenzen der Milz in nahezu allen anderen lymphoiden Geweben und dem PB (Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017). Dieses körperweite klonale Netzwerk umfasst B-Zellen im PB, Knochenmark, den Mukosa-assoziierten Geweben des Darms und der Lunge, wodurch die Milz das am stärksten klonal-vernetzte lymphoide Gewebe des menschlichen Organismus ist (Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017). Frühere Studien an gepaarten Proben von Milz und PB desselben Individuums zeigten, dass z.B. Tetanus- oder Vacciniavirus-spezifische B-Zellen stärker in der Milz

angereichert und Jahrzehnte nach einer Impfung detektierbar sind (Giesecke *et al.*, 2014; Mamani-Matsuda *et al.*, 2008). Altersabhängige Veränderungen des Ig-Repertoires wurde bisher nur an B-Zellen aus dem PB untersucht (Gibson *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). Eine Dynamik oder das klonale Verhältnis zu B-Zellen aus SLO wurden hingegen nicht untersucht.

Aufgrund der Verfügbarkeit und guten Zugänglichkeit wurde ein Großteil der humanen Ig-Repertoire-Analysen an B-Zellen aus dem PB durchgeführt (Boyd und Crowe, 2016). Expandierte B-Zell-Klone können anhand der IGHV-Gensequenz verlässlich identifiziert werden (Zhou und Kleinstein, 2019). Interindividuell konservierte Klonotypen (d.h. identische Ig-Sequenzen aus unterschiedlichen Individuen) sind selten (Briney *et al.*, 2019; Budeus *et al.*, 2020; Ghraichy *et al.*, 2020; Soto *et al.*, 2019) und könnten auf eine vergleichbare Infektions- oder Impf-Geschichte der betreffenden Individuen hinweisen. Veränderungen des Ig-Repertoires während Erkrankungen und deren Therapie wurden beobachtet (Bashford-Rogers *et al.*, 2019).

1.10 Immunalterung

Ein höheres Lebensalter ist assoziiert mit einer höheren Morbidität und Mortalität durch Infektionskrankheiten (Yoshikawa, 1997, 2000). Die altersabhängige Reduktion und Dysregulation immunologischer Funktionen wird als „Immunoseneszenz“ bezeichnet und betrifft die Zellen und humoralen Effektoren der angeborenen und adaptiven Immunität (Allman und Miller, 2005; Gomez *et al.*, 2005; Weng, 2006). In vielen älteren Individuen wurde ein Zustand chronischer Entzündung („*inflamm-aging*“) beobachtet, der aus einer unvollständigen Beseitigung von Pathogenen oder chronischen Stimulation des gealterten Immunsystems heraus resultiert (Franceschi *et al.*, 2000).

Die Immunalterung betrifft sowohl primäre als auch sekundäre lymphatische Organe. Veränderungen im Knochenmark umfassen eine altersabhängige Reduktion der Teilungsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen (Geiger und Van Zant, 2002; Lansdorp *et al.*, 1994; Vaziri *et al.*, 1994). Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Verschiebung der Differenzierung hämatopoetischer

Vorläuferzellen zu myeloischen Vorläufern auf Kosten von lymphoiden Vorläufern (Beerman *et al.*, 2010; Miller und Allman, 2003; Sharp *et al.*, 1990; Sudo *et al.*, 2000). Stromazellen des Knochenmarks werden altersabhängig durch Fettgewebe ersetzt (Kirkland *et al.*, 2002). Diese Veränderungen tragen zu einer Reduktion der Bildung von B-Zell-Vorläufern und reifen naiven B-Zellen bei (Cancro, 2005).

Die Involution des Thymus ist charakterisiert durch eine altersabhängige Reduktion der Organgröße und Austausch von Cortex- und Medullagewebe durch Fettgewebe (Weiskopf *et al.*, 2009). Dieser Prozess beginnt früh im Leben und ist mit ca. 40-50 Jahren nahezu abgeschlossen (George und Ritter, 1996). Mit der Involution des Thymus geht eine Abnahme naiver T-Zellen einher (Chen, 2004), die Diversität der CD4⁺ T_H-Zellen nimmt jedoch erst ab ca. 70 Jahren dramatisch ab (Goronzy und Weyand, 2005). Altersabhängige Änderungen der Funktionen naiver T-Zellen wurden beschrieben und umfassen kürzere Telomere, geringere Teilungskapazität und beeinträchtigte Differenzierung in Effektor-Zell-Populationen (Effros *et al.*, 2005; Haynes *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2005; Miller, 2000; Nociari *et al.*, 1999; Pfister *et al.*, 2006). T_H-Zellen älterer Individuen produzieren weniger Interleukin 2 und CD40LG, wodurch B-Zell-Aktivierung limitiert wird (Weiskopf *et al.*, 2009). Eine Abnahme naiver T-Zellen durch homöostatische Proliferation und Differenzierung in Gedächtnis-T-Zellen wurde beschrieben (Naylor *et al.*, 2005).

Ein höheres Lebensalter ist assoziiert mit einer Reduktion der B-Zell-Funktion und einer Beeinträchtigung humoraler Immunantworten (Siegrist und Aspinall, 2009). Die Wirksamkeit von Impfungen gegen TI- und TD-Antigene nimmt im hohen Alter substantiell ab (Goodwin *et al.*, 2006; Hannoun *et al.*, 2004; Looney *et al.*, 2001; Melegaro und Edmunds, 2004). Die Dauer von Immunreaktionen nimmt im hohen Alter ab (Weinberger *et al.*, 2008). Veränderungen der Hämatopoese und die Involution des Thymus haben indirekte Auswirkungen auf das B-Zell-System, es sind jedoch auch T-Zell-unabhängige altersabhängige Veränderungen der B-Zellen bekannt (Ademokun *et al.*, 2010; Cancro *et al.*, 2009; Frasca und Blomberg, 2009). Gedächtnis-B-Zellen akkumulieren auf Kosten naiver B-Zellen im Altersverlauf (Colonna-Romano *et al.*, 2008; Morbach *et al.*, 2010) und CD27-negative B-Zellen sind im Alter stark reduziert (Weiskopf *et al.*, 2009). Eine

Abnahme der Empfänglichkeit für Apoptose-induzierende Signale von Gedächtnis-B-Zellen führt zur Anhäufung klonaler Spezifitäten und könnte die Diversität des Ig-Repertoires beeinträchtigen (Chong *et al.*, 2005; Weksler, 2000; Weksler und Szabo, 2000). GC-Reaktionen in gealterten Mäusen zeigen eine altersabhängige Verringerung der Affinitätsreifung (Kosco *et al.*, 1989; Szakal *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1997). Eine Ursache dafür könnte die verringerte Antigen-Transportkapazität zu B-Zell-Follikeln sein (Szakal *et al.*, 1988; Szakal *et al.*, 1990). Eine relative Erhöhung von B-Zell-T-Zell-Interaktion via OX40 und OX40LG während GC-Reaktionen könnte die Bildung von kurzlebigen Plasmazellen auf Kosten der Gedächtnis-B-Zell-Bildung in alten Individuen begünstigen (Arpin *et al.*, 1995; Stuber *et al.*, 1995; Stuber und Strober, 1996; Weiskopf *et al.*, 2009).

Die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen in GC-Reaktionen und hoch-affiner Antikörper durch Plasmazellen erfordert T_H -Zellen, die durch Zytokin-Sekretion und Zell-Zell-Interaktion (z.B. via CD40-CD40LG) GC-Reaktionen steuern (Defrance *et al.*, 2011; Toellner *et al.*, 2002). Hierfür ist eine intakte GC-Architektur eine grundlegende Voraussetzung (Allen und Cyster, 2008; Fu und Chaplin, 1999; Wang *et al.*, 2011).

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Humane sMZ-B-Zellen sind essenziell für die Abwehr von bakteriellen Infektionen, jedoch ist dieser Schutz erst im Alter von zwei Jahren voll ausgebildet und kann in Senioren unzureichend sein. Zentrale Aspekte der Entstehung, Zusammensetzung, klonalen Verwandtschaft und Rezirkulation humaner sMZ-B-Zellen sind umstritten. Aus diesen Gründen soll die altersabhängige Dynamik humaner sMZ-B-Zellen phänotypisch, molekular und funktionell untersucht werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht eine Analyse des IGHV-Repertoires humaner B-Zellen aus gepaarten PB- und Milz-Proben aus Kleinkindern, Erwachsenen und Senioren. Die Analyse von IGHV-Mutationsfrequenz, Klonalität, Klongröße und Verteilung soll einen Einblick in die altersabhängige Entstehung, Reifung, Rezirkulation, und Komplexität humaner sMZ- und Gedächtnis-B-Zellen geben. Weiterhin sollen Genexpressionsprofile generiert werden, mit deren Hilfe eine Klärung der GC-Abstammung und Identifizierung sMZ-B-Zell-spezifischer Signaturen ermöglicht werden soll. Mit Hilfe dieser Informationen sollen funktionelle Untersuchungen der einzelnen B-Zell-Populationen aus PB und Milz, Unterschiede in Kinetik, Proliferationskapazität und Expression von B-Zell-T-Zell-Interaktionsmolekülen erfassen.

Weiterhin soll die Zusammensetzung humaner sMZ-B-Zellen mittels Einzel-Zell-Analysen auf Heterogenität und altersabhängige Reifung hin untersucht werden. Schließlich ermöglichen histologische Untersuchungen die Lokalisation von sMZ-B-Zellen und die Reifung B-Zell-extrinsischer Faktoren des Mikromilieus in der sMZ im Altersverlauf abzubilden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Liste aller Geräte, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Hersteller (Name, Sitz)
FACSaria Fusion	Becton Dickinson (Abk. BD) Biosciences, Heidelberg
CytoFLEX S	Beckman Coulter, Krefeld
Axioscope 5 Mikroskop mit Axiocam 305 color Kamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen
MACSima Imaging System	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Chromium Controller & Next GEM Accessory Kit	10X Genomics, Leiden, Niederlande
Kryostat CM1850 UV	Leica Biosystems, Wetzlar
Inkubator C200	Labotect, Rosdorf
Illumina MiSeq	Illumina Inc., San Diego, CA, USA
Eppendorf Mastercycler gradient (PCR-Thermocycler)	Eppendorf AG, Hamburg
Biometra UNO-II (PCR-Thermocycler)	Biometra GmbH, Göttingen
Vortexmischer	Scientific Industries Inc., Bohemia
Waage AE240 DR	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific
Micro Star 17R	VWR, Langenfeld
Nanodrop ND-1000	Peqlab GmbH, Erlangen
Kühlschrank	Liebherr AG, Bulle
Gefrierschrank	Liebherr AG
MDF-DU700VH-PE Ultra-low Temperature Freezer	Panasonic, Hamburg

Laminar Flow Werkbank UVF 6.12	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Scanlaf Mars Sterilbank	LaboGene, Lillerød, Dänemark

2.1.2 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Chemikalien

Tabelle 2: Liste aller Nährmedien, Puffer, Lösungen und Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
dNTP Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Thermo Fischer Scientific
MgCl ₂	Thermo Fischer Scientific
10X Taq Puffer	Thermo Fischer Scientific
Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> , Abk. PBS)	PAN Biotech GmbH GmbH, Aidenbach
Fötales Kälberserum (Abk. FCS)	PAN Biotech GmbH GmbH
Bovines Serum Albumin (Abk. BSA)	PAN Biotech GmbH GmbH
Normales Ziegenserum (engl. <i>normal goat serum</i>)	PAN Biotech GmbH GmbH
RPMI-1640 Medium	PAN Biotech GmbH GmbH
MEM α Medium	PAN Biotech GmbH GmbH
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	PAN Biotech GmbH GmbH
Tissue-Tek® O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Type B CpG Oligonukleotid (ODN D-SL01)	Invivogen Inc., San Diego, USA
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L)	Jackson Immunoresearch Europe Ltd, Newmarket, England
Rekombinanter humaner CD40-Ligand-HA-tag	R&D Systems Inc., Minneapolis, MS, USA
anti-HA-tag-Antikörper	R&D Systems Inc.
Cell Proliferation Dye eFluor TM 670	eBioscience, San Diego, CA, USA
DAB+ Substrat K3468	Agilent Dako, Waldbronn

Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Carl Roth
ROTI®Mount Aqua	Carl Roth
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Darmstadt
FcR Block	Miltenyi Biotec
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 3: Liste aller Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Originalarbeit
OP9-GFP	(Six <i>et al.</i> , 2007)
OP9-DLL1	(Six <i>et al.</i> , 2007)

2.1.4 PCR-Primer

Tabelle 4: Liste aller kommerziellen PCR-Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Gensymbol	Assay Name	Assay ID	Hersteller
ABCB1	ABCB1_80514_i23	GEP00080514	Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA
CCR1	CCR1_79963_i0	GEP00079963	Fluidigm
CD27	CD27_80442_i0	GEP00080442	Fluidigm
CD81	CD81_80446_i5	GEP00080446	Fluidigm
CR1	CR1_80457_i35	GEP00080457	Fluidigm
FCER2	FCER2_80459_i5	GEP00080459	Fluidigm
ICAM2	ICAM2_80466_i2	GEP00080466	Fluidigm
IL27RA	IL27RA_80475_i0	GEP00080475	Fluidigm
KLF8	KLF8_80483_e4	GEP00080483	Fluidigm
PRKD1	PRKD1_80486_i15	GEP00080486	Fluidigm
RHOB	RHOB_80493_e0	GEP00080493	Fluidigm
TCL1A	TCL1A_80502_i2	GEP00080502	Fluidigm

ACKR3	ACKR3_80432_i0	GEP00080432	Fluidigm
CCR2	CCR2_79966_i0	GEP00079966	Fluidigm
CD300A	CD300A_80443_i2	GEP00080443	Fluidigm
CD9	CD9_80448_i5	GEP00080448	Fluidigm
CR2	CR2_80453_i3	GEP00080453	Fluidigm
FCRL4	FCRL4_80461_i6	GEP00080461	Fluidigm
ICAM3	ICAM3_79290_i4	GEP00079290	Fluidigm
IRAK2	IRAK2_80474_i6	GEP00080474	Fluidigm
LTB	LTB_80480_i2	GEP00080480	Fluidigm
PSEN1	PSEN1_80491_i9	GEP00080491	Fluidigm
RORA	RORA_80497_i6	GEP00080497	Fluidigm
TLR10	TLR10_80503_e3	GEP00080503	Fluidigm
AICDA	AICDA_80433_i3	GEP00080433	Fluidigm
CCR6	CCR6_80435_e2	GEP00080435	Fluidigm
CD38	CD38_24380_i2	GEA00024380	Fluidigm
CDK5R1	CDK5R1_80447_e1	GEP00080447	Fluidigm
CXCR4	CXCR4_80454_e2	GEP00080454	Fluidigm
IGHD	FLDM- 017301_80511_e0	GEP00080511	Fluidigm
IFNLR1	IFNLR1_80468_i2	GEP00080468	Fluidigm
ITGAM	ITGAM_80476_i22	GEP00080476	Fluidigm
LY9	LY9_80482_i0	GEP00080482	Fluidigm
PSEN2	PSEN2_80487_i5	GEP00080487	Fluidigm
RUNX2	RUNX2_11914_i2	GEA00011914	Fluidigm
TNFRSF10A	TNFRSF10A_80504_i3	GEP00080504	Fluidigm
AKT1	AKT1_80509_i6	GEP00080509	Fluidigm
CD180	CD180_80437_i1	GEP00080437	Fluidigm
CD44	CD44_56546_i0	GEP00056546	Fluidigm
CDKN1B	CDKN1B_80449_i0	GEP00080449	Fluidigm
CXCR5	CXCR5_79971_e1	GEP00079971	Fluidigm
FOXP1	FOXP1_80467_i18	GEP00080467	Fluidigm
IL10RA	IL10RA_80469_i2	GEP00080469	Fluidigm

ITGB1	ITGB1_79303_i2	GEP00079303	Fluidigm
MTOR	MTOR_80512_i14	GEP00080512	Fluidigm
PTK2B	PTK2B_80490_i21	GEP00080490	Fluidigm
SIGLEC11	SIGLEC11_80496_i8	GEP00080496	Fluidigm
TNFSF13	TNFSF13_80507_e0	GEP00080507	Fluidigm
ATF3	ATF3_80439_i1	GEP00080439	Fluidigm
CD1A	CD1A_80438_i1	GEP00080438	Fluidigm
CD5	CD5_80444_i6	GEP00080444	Fluidigm
CHL1	CHL1_80451_i17	GEP00080451	Fluidigm
DTX1	DTX1_80455_i3	GEP00080455	Fluidigm
GPR183	GPR183_80462_i0	GEP00080462	Fluidigm
IL12RB1	IL12RB1_80471_i1	GEP00080471	Fluidigm
ITGB2	ITGB2_80478_i4	GEP00080478	Fluidigm
NOTCH1	NOTCH1_80484_i4	GEP00080484	Fluidigm
PTPRJ	PTPRJ_80489_i5	GEP00080489	Fluidigm
SIGLEC6	SIGLEC6_80500_i1	GEP00080500	Fluidigm
TNFSF13B	TNFSF13B_80505_i4	GEP00080505	Fluidigm
BACH2	BACH2_80434_i7	GEP00080434	Fluidigm
CD1C	CD1C_80440_i3	GEP00080440	Fluidigm
CD58	CD58_79289_i2	GEP00079289	Fluidigm
CLEC2B	CLEC2B_80450_i2	GEP00080450	Fluidigm
EBF1	EBF1_80458_i6	GEP00080458	Fluidigm
HCK	HCK_80463_i5	GEP00080463	Fluidigm
IL15RA	IL15RA_80470_i3	GEP00080470	Fluidigm
KDM5D	KDM5D_80479_i24	GEP00080479	Fluidigm
NOTCH2	NOTCH2_80488_i4	GEP00080488	Fluidigm
RFTN1	RFTN1_80495_i7	GEP00080495	Fluidigm
SOCS3	SOCS3_80498_e1	GEP00080498	Fluidigm
TNFSF4	TNFSF4_80506_i1	GEP00080506	Fluidigm
BANK1	BANK1_80436_i11	GEP00080436	Fluidigm
CD200	CD200_79977_i4	GEP00079977	Fluidigm
CD69	CD69_80445_i3	GEP00080445	Fluidigm

CLEC2D	CLEC2D_80452_e2	GEP00080452	Fluidigm
EGR1	EGR1_80456_i0	GEP00080456	Fluidigm
HES1	HES1_80464_i0	GEP00080464	Fluidigm
IL18BP	IL18BP_80473_i0	GEP00080473	Fluidigm
KLF2	KLF2_80477_i1	GEP00080477	Fluidigm
NT5E	NT5E_56640_i0	GEP00056640	Fluidigm
RGS1	RGS1_80492_i3	GEP00080492	Fluidigm
SOX7	SOX7_80499_i0	GEP00080499	Fluidigm
TNFSF8	TNFSF8_80508_i2	GEP00080508	Fluidigm
BCL6	BCL6_80020_i3	GEP00080020	Fluidigm
CD24	CD24_80441_e2	GEP00080441	Fluidigm
CD80	CD80_79981_i3	GEP00079981	Fluidigm
CLNK	CLNK_80513_i15	GEP00080513	Fluidigm
FAS	FAS_80460_i0	GEP00080460	Fluidigm
ICAM1	ICAM1_80465_i2	GEP00080465	Fluidigm
IL18R1	IL18R1_80472_i7	GEP00080472	Fluidigm
KLF3	KLF3_80481_i4	GEP00080481	Fluidigm
PCDH9	PCDH9_80485_i0	GEP00080485	Fluidigm
RGS2	RGS2_80494_i0	GEP00080494	Fluidigm
TANK	TANK_80501_i2	GEP00080501	Fluidigm
TRAF3IP3	TRAF3IP3_80510_i10	GEP00080510	Fluidigm

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Liste aller Fluorochrom-gekoppelten anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit für durchflusszytometrische Analysen verwendet wurden.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
anti-CD1c	AD5-8E7	PE	Miltenyi Biotec
anti-CD11a	HI111	PE	BD Biosciences
anti-CD11c	B-ly6	PE	BD Biosciences
anti-CD18	6.7	PE	BD Biosciences
anti-CD20	2H7	BV421	BD Biosciences
anti-CD21	B-ly4	PE, APC	BD Biosciences

anti-CD22	HIB22	PE	BD Biosciences
anti-CD23	M-L233	PE	BD Biosciences
anti-CD24	ML5	PE	BD Biosciences
anti-CD25	M-A251	FITC	BD Biosciences
anti-CD27	M-T271	PE-Cy7	BD Biosciences
anti-CD29	K20	FITC	Beckman Coulter
anti-CD35	E11	PE	BD Biosciences
anti-CD38	HIT2	FITC	BD Biosciences
anti-CD49d	9F10	PE	BD Biosciences
anti-CD50	TU41	PE	BD Biosciences
anti-CD54	HA58	FITC	BD Biosciences
anti-CD69	FN50	PE	BD Biosciences
anti-CD80	L307.4	FITC	BD Biosciences
anti-CD86	IT2.2	PE	BD Biosciences
anti-CD148	A3	PE	BioLegend, Koblenz
anti-CD184	12G5	PE	BD Biosciences
anti-CD185	RF8B2	FITC	BD Biosciences
anti-CD196	G034E3	PE	BioLegend
anti-CD197	3D12	PE	BD Biosciences
anti-CD199	L053E8	PE	BioLegend
anti-CD300a	MEM-260	PE	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-ITBG7	FIB504	FITC	BD Biosciences
anti-NOTCH2	HMN2-35	PE	BioLegend
anti-IgM	G20-127	FITC	BD Biosciences
anti-IgD	IA6-2	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
anti-IgG	G18-145	PE	BD Biosciences
anti-IgA	IS11-8E10	FITC	Miltenyi Biotec

Tabelle 6: Liste aller Fluorochrom-gekoppelten anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet wurden.

Antikörper	Klon	Titer	Hersteller
anti-CD10	REA877	50	Miltenyi Biotec
anti-CD105	REA794	50	Miltenyi Biotec
anti-CD106	REA269	50	Miltenyi Biotec
anti-CD11a	REA378	10	Miltenyi Biotec
anti-CD11c	REA618	50	Miltenyi Biotec
anti-CD14	rea599	50	Miltenyi Biotec
anti-CD141	REA674	50	Miltenyi Biotec
anti-CD156c	REA309	10	Miltenyi Biotec
anti-CD157	REA465	50	Miltenyi Biotec
anti-CD16	REA423	50	Miltenyi Biotec
anti-CD18	Clone 6.7	10	BD Biosciences
anti-CD19	REA675	50	Miltenyi Biotec
anti-CD196	REA190	50	Miltenyi Biotec
anti-CD1c	AD5-8E7	50	Miltenyi Biotec
anti-CD1d	51.1	10	Miltenyi Biotec
anti-CD21	REA940	50	Miltenyi Biotec
anti-CD22	REA340	50	Miltenyi Biotec
anti-CD23	M-L23.4	50	Miltenyi Biotec
anti-CD268	REA1115	50	Miltenyi Biotec
anti-CD27	M-T2T1	50	Miltenyi Biotec
anti-CD271	REA844	50	Miltenyi Biotec
anti-CD29	TS2/16	10	Miltenyi Biotec
anti-CD3	REA613	50	Miltenyi Biotec
anti-CD31	REA730	50	Miltenyi Biotec
anti-CD317	REA202	10	Miltenyi Biotec
anti-CD35	E11	10	Miltenyi Biotec
anti-CD36	REA760	50	Miltenyi Biotec
anti-CD4	VIT4	50	Miltenyi Biotec
anti-CD40	HB14	50	Miltenyi Biotec

anti-CD45RA	T6D11	50	Miltenyi Biotec
anti-CD45RB	REA119	10	Miltenyi Biotec
anti-CD49d	REA545	50	Miltenyi Biotec
anti-CD5	REA782	50	Miltenyi Biotec
anti-CD54	REA266	50	Miltenyi Biotec
anti-CD56	REA196	50	Miltenyi Biotec
anti-CD79a	REA1168	50	Miltenyi Biotec
anti-CD79b	REA120	50	Miltenyi Biotec
anti-CD81	REA513	50	Miltenyi Biotec
anti-CD83	REA714	50	Miltenyi Biotec
anti-CD90	REA 897	50	Miltenyi Biotec
anti-IgA	REA1014	50	Miltenyi Biotec
anti-IgD	REA740	50	Miltenyi Biotec
anti-IgG	IS11-3B2.2.3	50	Miltenyi Biotec
anti-IgM	PJ2-22H3	50	Miltenyi Biotec
anti-Syk	REA111	10	Miltenyi Biotec

Tabelle 7: Liste aller Antikörper, die für immunhistochemische Färbungen verwendet wurden.

Antikörper	Klon	Spezies	Titer	Hersteller
anti-IgM	R1/69	Maus	50	Agilent Dako
anti-CD21	B-ly4	Maus	25	BD Biosciences
anti-CD27	M-T271	Maus	50	Agilent Dako
anti-Maus IgG-HRP	Polyklonal	Ziege	500	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd

Tabelle 8: Liste aller CITE-Seq anti-human Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Antikörper	Barcode	Klon	Nukleotidequenz	Hersteller
anti-CD5	C0138	UCHT2	CATTAACGGGATGCC	BioLegend
anti-CD23	C0897	EBVCS-5	TCTGTATAACCGTCT	BioLegend
anti-CD27	C0154	O323	GCACTCCTGCATGTA	BioLegend
anti-CD29	C0369	TS2/16	GTATTCCTCAGTCA	BioLegend
anti-CD35	C0167	E11	ACTTCCGTCGATCTT	BioLegend
anti-CD38	C0389	HIT2	TGTACCCGCTTGTGA	BioLegend
anti-CD49d	C0576	9F10	CCATTCAACTTCCGG	BioLegend

2.1.6 Kits

Tabelle 9: Liste aller kommerzieller Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Kit	Hersteller
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
Trio RNA-Seq Library Preparation Kit	Tecan, Redwood City, CA, USA
Gentra Puregene Core Kit	Qiagen
LymphoTrackDx IGH FR1 assay	Invivoscribe Inc., San Diego, CA, USA
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina Inc.
Chromium Single Cell Human BCR Amplification Kit	10X Genomics
Chromium Next GEM Chip K Single Cell Kit	10X Genomics
Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2	10X Genomics
Dual Index Kit TT Set A (for Gene Expression and BCR/TCR Libraries)	10X Genomics
Library Construction Kit	10X Genomics
CellsDirect™ One-Step qRT-PCR Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Software

Tabelle 10: Liste der Software, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Software	Version	Entwickler
R	4.0.4	R Core Team, John M. Chambers
R Studio	1.3.1093	RStudio, PBC, Boston, USA
FACSDiva Software	6.0	BD Biosciences
CytExpert	2.4	Beckman Coulter, Krefeld
ImageJ	1.5.3	Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA
Inkscape	0.92.5	Inkscape Community, Maximilian Albert et al.
GSEA	4.1.0	Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA
FlowJo	10.5	BD Biosciences
Cell Ranger Analysis Pipeline	5.0.1	10X Genomics
Loupe Browser	5.0.0	10X Genomics
ZEN blue	3.2.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

Tabelle 11: Liste aller R Programmiererweiterungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

R Programmiererweiterung	Version	Programmierer
pheatmap	1.0.12	(Kolde, 2018)
pcaExplorer	4.0	(Marini und Binder, 2019)
DESeq2	3.12	(Love <i>et al.</i> , 2014)
ggplot2	3.3.2	(Wickham, 2016)
viridis	0.5.1	(Garnier, 2017)
Rcolorbrewer	1.1-2	(Neuwirth, 2005)
EBImage	3.12	(Pau <i>et al.</i> , 2010)
GGally	2.1	(Schloerke <i>et al.</i> , 2017)
genefilter	3.12	(Gentleman <i>et al.</i> , 2020)
svglite	1.2.3.2	(Wickham <i>et al.</i> , 2020)

ggthemes	4.2.4	(Arnold, 2017)
dplyr	1.0.3	(Wickham <i>et al.</i> , 2015)
tibble	3.0.5	(Müller und Wickham, 2017)
rBLAST	1.0	(Hahsler und Nagar, 2017)
Igtree	20.2	(Barak <i>et al.</i> , 2008)
circlize	0.4.12	(Gu <i>et al.</i> , 2014)
fmsb	0.7.0	(Nakazawa M, 2019)
igraph	0.8.5	(Csárdi und Nepusz, 2020a)
Rgraphviz	3.12	(Hansen <i>et al.</i> , 2020b)
ggpubr	0.4.0	(Kassambara, 2020)
Markov Affinity-Based Graph Imputation of Cells (MAGIC)	2.0.3	(van Dijk <i>et al.</i> , 2018)
Seurat	3.2.3	(Stuart <i>et al.</i> , 2019)
Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)	0.2.7.0	(Konopka, 2020)
singleR	3.12	(Aran <i>et al.</i> , 2019)

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendung von humanem Probenmaterial

Humane Milzbiopsate und peripheres Blut (PB), die als Restmaterial desselben Individuums in Folge von HLA-Typisierungen übriggeblieben waren, wurden vom Institut für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Milzbiopsate und PB stammten von Individuen, deren Todesursache anoxischer Hirnschaden, Herzstillstand, Hirntrauma, -blutung oder -infarkt waren, d.h. nicht durch Infektionen oder maligne Erkrankungen verursacht wurden. Die Verwendung der Milzbiopsate und des PB ist durch ein Votum der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen als ethisch und rechtlich unbedenklich eingestuft worden.

Leukozytenfilme (engl. *buffy coats*) aus dem PB wurden mit schriftlichem Einverständnis von gesunden erwachsenen Blutspendern nach der Deklaration von Helsinki vom Institut für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum erhoben.

2.2.2 Altersstufen humaner Proben

Die Altersstufen der humanen Proben werden wie folgt definiert:

Tabelle 12: Altersstufen humaner Proben

Alter	Altersstufe
bis 4 Wochen	Neugeborene
bis 24 Monate	Kleinkinder
bis 12 Jahre	Kinder
bis 18 Jahre	Jugendliche
bis 65 Jahre	Erwachsene
ab 65 Jahre	Senioren

2.2.3 Isolierung humaner B-Lymphozyten

Zur Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Milz oder PB wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Für die Anreicherung von B-

Lymphozyten wurde der Pan-B-Lymphozyten-Marker CD19 für eine magnetisch-aktivierte Zellsortierung (engl. *magnetic activated cell sorting*, MACS) genutzt.

Die Milzbiopsate wurden mit Hilfe eines Skalpell in Stücke geschnitten, mit einem Stößel zerkleinert und durch ein grobes Sieb passiert. Die hieraus entstandene Suspension wurde mittels eines Zellsiebs mit 100 µm Porengröße filtriert. Filtrierte Milzsuspensionen oder PB bzw. Leukozytenfilme wurden mit PBS (0,5 % BSA, Pan Biotech GmbH) verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Pancoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml (Pan-Biotech GmbH) in einem 50 ml Reaktionsgefäß überschichtet. Eine Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 18°C für 35 min mit 400x g in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Leukozytenfilm (Interphase) in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS (0,5 % BSA) aufgefüllt, bei 4°C für 5 min mit 400x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in PBS (0,5 % BSA) resuspendiert, die Zellzahl auf 10⁸ pro ml eingestellt, mit 10 % v/v anti-CD19-Microbeads (Miltenyi Biotech) vermischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension wurde auf 50 ml PBS (0,5 % BSA) aufgefüllt und bei 4°C für 5 min mit 400x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die anti-CD19-immunmarkierten Zellen wurden nach Herstellerangaben über LS-MACS Säulen (Miltenyi Biotech) positiv angereichert. Die Elution der Positivfraktion erfolgt in 4 ml PBS (0,5 % BSA).

2.2.4 Isolierung humaner B-Zell-Populationen

B-Zellen aus humaner Milz bzw. PB wurden für Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting*, im Folgenden als Zellsortierung bezeichnet) mit anti-CD20-BV421, anti-CD21-PE, anti-CD27-PE-Cy7, anti-IgM-BUV396, anti-IgD-PerCP-Cy5.5, anti-IgG-FITC, anti-IgA-FITC und anti-CD23-APC Antikörpern (alle BD Biosciences) für 20 min bei 4°C inkubiert, und mit 10-fachem Volumen PBS (0,5 % BSA) gewaschen und 5 min bei 4°C und 400x g zentrifugiert. Die B-Zell-Populationen aus Milzsuspensionen (Präfix „s“) und aus PB (Präfix „PB“) wurden am FACSAria Fusion Zellsortierer (BD Biosciences) mit einer Reinheit von 95-99 % nach den folgenden Immunphänotypen aufgetrennt: Naive B-Zellen (sNaive und PB-Naive

CD20⁺CD21⁺CD23⁺CD27-IgM⁺IgD^{high}IgG-IgA⁻), IgM-Gedächtnis-B-Zellen (sMD27 und PB-MD27, CD20⁺CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD⁺IgG-IgA⁻), klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (sCSW und PB-CSW, für engl. *class switched* CD20⁺CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM-IgD-IgG⁺/IgA⁺), sMZ-B-Zellen (sMZ, CD20⁺CD21^{high}CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD^{+/-}IgG-IgA⁻) und klassengewechselte sMZ-B-Zellen (sMZ-CSW, CD20⁺CD21^{high}CD23⁻CD27⁺IgM-IgD-IgG⁺/IgA⁺). Für eine detaillierte Sortierstrategie von B-Zell-Populationen aus Milzsuspensionen und PB siehe Abb. 1 und Abb. 2.

2.2.5 Kultivierung humaner B-Lymphozyten

Sortierte B-Lymphozyten-Populationen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre *in vitro* in RPMI1640 (Pan-Biotech GmbH) mit 20 % fötalem Kälberserum (Pan-Biotech GmbH) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Pan-Biotech GmbH) kultiviert. Die Zellkultur erfolgte entweder ohne weitere Zugabe von Stimulanzen (unstimuliert, us) oder unter Zugabe von 2,5 µM unmethyliertem CpG Dinukleotid (engl. *T-cell independent type I*, Abk. TI-I Stimulation, Invivogen, Inc.) oder 10 µg/ml AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd), 1 µg/ml rekombinantes humanes CD40-Ligand-HA und 5 µg/ml anti-HA-tag-Antikörper (engl. *T-cell dependent*, TD Stimulation, R&D Systems Inc.).

2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse humaner B-Zell-Populationen

Für die phänotypischen Untersuchungen wurden humane B-Lymphozyten-Populationen aus Milz und PB mit dem Immunfärbeschema (anti-CD20-BV421, anti-CD21-APC, anti-IgM-BUV396, anti-IgD-PerCP-Cy5.5, anti-CD27-PE-Cy7, alle BD Biosciences) sortiert. Die B-Zell-Populationen PB-CSW, sCSW und sMZ-CSW wurden im Unterschied zur Sortierstrategie in Kapitel 2.2.4 als IgM-IgD⁺ statt IgG/IgA⁺ definiert. Im Anschluss an die Zellsortierung wurden die B-Zell-Populationen entweder sofort immunmarkiert oder nach der Zugabe von TI-I- bzw. TD-Stimulation für 24 h kultiviert und danach markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Für die phänotypischen Untersuchungen wurden die sortierten B-Zell-Populationen in parallelen Ansätzen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörper für 20 min bei 4°C immungefärbt und anschließend mit 10-fachem Volumen PBS (0,5 % BSA) aufgefüllt und für 5 min bei 4°C und 400x g

zentrifugiert. Die Messung der immungefärbten B-Zell-Populationen erfolgte am Cytoflex S Durchflusszytometer (Beckman Coulter) und die Auswertung erfolgte mit der CytExpert Software (Beckman Coulter). Für die Berechnung der medianen Fluoreszenzintensität (Abk. MFI) wurden lebende, einzelne Lymphozyten ausgewählt. Die MFI von Oberflächenmolekülen auf sMZ-B-Zellen aus Kleinkindern oder Erwachsenen wurden mit der R Programmiererweiterung *heatmap* als *heatmap* dargestellt.

2.2.7 Messung von Zellproliferation

Humane B-Lymphozyten-Populationen wurden nach der Zellsortierung (Kapitel 2.2.6) mit 5 μ M des Zellproliferations-Farbstoff eFluor670 (eBioscience) nach Herstellerangaben für 15 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiger eFluor 670 Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit jeweils 10-fachem Volumen RPMI1640 (mit 20 % FCS, Pan Biotech GmbH) und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 400x g entfernt. Danach wurden die eFluor670-markierten B-Zell-Populationen in parallelen Ansätzen nach Zugabe von TI-I- oder TD-Stimulation für 48, 72 und 96 h bei 37°C inkubiert und am Cytoflex S Durchflusszytometer (Beckman Coulter) gemessen. Die Auswertung der Zellproliferation erfolgte durch die Untersuchung der Verdünnung des eFluor 670 Farbstoffs in TI-I- oder TD-stimulierten B-Zell-Populationen im Vergleich zu Kontrollproben ohne Zugabe von Stimulanzen.

2.2.8 Ko-Kultur humaner B-Lymphozyten-Populationen mit OP9-Zelllinien

OP9-Zelllinien, die entweder GFP oder rekombinantes, humanes Delta Like Canonical Notch Ligand 1 (Abk. DLL1) exprimieren wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten in MEM α Medium (Pan Biotech GmbH) mit 20 % fötalem Kälberserum (Pan Biotech GmbH) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Pan Biotech GmbH) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Humane B-Lymphozyten-Populationen wurden nach der Zellsortierung (Kapitel 2.2.6) in einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well zu den OP9-GFP bzw. OP9-DLL1 Zellen hinzugefügt und für 96 h zusammen bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS (0,5 % BSA) aufgenommen, 5 min bei 4°C und 400x g zentrifugiert, mit anti-CD21-PE, anti-CD27-PE-Cy7 und anti-CD20-

BV421 (alle BD Biosciences) immungefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen (Kapitel 2.2.6).

2.2.9 Datenauswertung, Datendarstellung und statistische Signifikanz

Die Daten wurden mittels R 3.6 (www.R-project.org) ausgewertet und dargestellt. Hierfür wurden die R Programm-Erweiterungen aus Tabelle 11 verwendet. Verwendete statistische Tests und Irrtumswahrscheinlichkeiten sind an den Stellen ihrer Verwendung gekennzeichnet.

2.2.10 Hochdurchsatz-Sequenzierung der Variablen Regionen der Ig-Schwerketten (IGHV) humaner B-Zell-Populationen

Umgelagerte IGHV-Gene humaner B-Lymphozyten-Populationen aus gepaarten Milzbiopsaten und PB wurden nach der Zellsortierung (Immunphänotypen der B-Zell-Populationen aus Kapitel 2.2.4) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt. Hierzu wurde genomische DNA mittels Gentra Puregene Core Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Sequenzierbibliotheken wurden mit dem LymphoTrackDx IGH FR1 assay (Invivoscribe Inc.) vorbereitet. Die Sequenzierbibliotheken wurden aus äquimolaren Mengen DNA der B-Lymphozyten-Populationen zusammengestellt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem MiSeq Instrument (Illumina) mit dem Schnell-Durchlauf Programm (engl. *rapid run program*) mit gepaarter Enden-Sequenzierung (engl. *paired end sequencing*) mit jeweils 300 bp Leselänge (engl. *read length*). Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken und Durchführung der Sequenzierreaktion erfolgten durch das BioChip-Labor am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung). Es wurden nur IGHV-Sequenzen in die Analyse einbezogen, sofern die durchschnittliche Qualität (MiSeq-interner „*Q score*“) der gesamten IGHV-Sequenz ≥ 25 war. Uneindeutigkeiten zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz wurden durch „N“ ersetzt. Es wurden nur IGHV-Sequenzen innerhalb des Leserasters beachtet, die mindestens zweifach detektiert worden sind. Identische IGHV-Sequenzen innerhalb einer Probe (separat sortierte B-Zell-Populationen) wurden als PCR-Duplikat gewertet und auf die längste detektierte IGHV-Sequenz kollabiert. Die Zuordnung der IGHV-Gene und Identifikation der CDRIII erfolgten nach dem ImMunoGeneTics (IMGT) Informationssystem (www.imgt.org). Definition klonaler IGHV-Sequenzen erfolgte bei gleichem IGHV-Gen und

mindestens 97 % Sequenzhomologie in der CDRIII und der Detektion in mindestens zwei separat isolierten B-Zell-Populationen. Die Identifizierung von Klonen allein anhand der IGHV-Sequenz ist verlässlich (Zhou und Kleinstein, 2019). Analyse von IGHV-Sequenzen, Klonen, hierarchischer Dendrogramme und Klonotypen erfolgte in Kooperation mit Dr. Bettina Budeus am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

2.2.11 Berechnung der Klonalität

Die Klonalität (der Anteil IGHV-Sequenzen in Klonen unter allen IGHV-Sequenzen eines Individuums) wurde innerhalb einer stochastischen Stichprobe berechnet, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Individuen zu ermöglichen und Schwankungen der Anzahl sortierter, prozessierter und sequenzierter B-Zellen auszugleichen. Die Größe der Stichprobe richtete sich nach der jeweils in allen Individuen zur Verfügung stehenden Anzahl einzigartiger IGHV-Sequenzen pro B-Lymphozyten-Population. Die stochastische Stichprobe umfasste pro Individuum z.B. jeweils 4.800 IGHV-Sequenzen für PB-CSW und 40.000 IGHV-Sequenzen für sMZ-B-Zellen. Die Abbildungen der Klonalität wurden mit Hilfe der R Programmerweiterungen *circlize* und *fmsb* erstellt.

2.2.12 Berechnung und Auswertung hierarchischer Dendrogramme

Für jedes Individuum wurden die hierarchischen Dendrogramme unter allen klonal verwandten IGHV-Sequenzen mittels der R Programmerweiterung *Igtree* (Barak *et al.*, 2008) berechnet. Die Analyse und Darstellung der Dendrogramme erfolgte mit Hilfe der R Programmerweiterungen *igraph* (Csárdi und Nepusz, 2020b) and *Rgraphviz* (Hansen *et al.*, 2020a). Die Analyse der Unteräste erfolgte in Dendrogrammen mit mindestens fünf IGHV-Sequenzen aus der zu untersuchenden B-Lymphozyten-Population (z.B. ≥ 5 IGHV-Sequenzen aus B-Zell-Populationen des PB).

2.2.13 Analyse der Sequenzeigenschaften

Alle Untersuchungen basierten auf der internationalen IMGT Datenbank. Die Ig-Mutationsfrequenz wurde auf Grundlage der Anzahl der unterschiedlichen Nukleotide im IGHV Gen (exklusive der CDRIII) im paarweisen Vergleich einer IGHV-Sequenz mit der unmutierten allelischen Variante des entsprechenden Individuums. Die Zuordnung des IGHV Gens erfolgte mittels *rBLAST* unter

Verwendung der IMGT-Keimbahn-Sequenzen. Die Längenverteilung der CDRIII für B-Lymphozyten-Populationen wurde auf Grundlage der Nukleotide innerhalb der CDRIII nach IMGT Klassifizierung berechnet.

2.2.14 Bestimmung von Klonotypen

VDJ-Genumlagerungen mit mindestens 90 % Übereinstimmung der CDRIII bei gleichem IGHV-Gen, die wiederholt in unterschiedlichen Individuen detektiert wurden, wurden als „Klonotypen“ klassifiziert. Intraindividuelle klonale Expansionen innerhalb solcher Klonotypen wurden für die Berechnung der relativen Häufigkeit von Klonotypen unter allen IGHV-Sequenzen ausgeschlossen.

2.2.15 Bestimmung von Antigen-spezifischen Klonotypen

IGHV-Sequenzen mit bekannter Antigen-Spezifität wurden in einer Datenbank erfasst (Adler *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2015; Baxendale *et al.*, 2000; Baxendale und Goldblatt, 2006; Chen *et al.*, 2018; Corti *et al.*, 2017; de Kruif *et al.*, 2009; DeKosky *et al.*, 2013; Di Niro *et al.*, 2010; Frolich *et al.*, 2010; Galson *et al.*, 2015; Goodwin *et al.*, 2006; Hannoun *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2019; Higo-Moriguchi *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2015; Lavinder *et al.*, 2015; Lavinder *et al.*, 2014; Looney *et al.*, 2001; Melegaro und Edmunds, 2004; Nandin *et al.*, 2017; Pappas *et al.*, 2014; Poulsen *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2007; Setliff *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2008; Truck *et al.*, 2015; Wrammert *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). VDJ-Genumlagerungen mit bis zu einem Aminosäureaustausch in der CDRIII bei gleichem IGHV-Gen mit Homologie zu den IGHV-Sequenzen aus der Datenbank wurden bestimmt. Die relative Häufigkeit Antigen-spezifischer Klonotypen wurde unter allen IGHV-Sequenzen berechnet. Die Diversität Antigen-spezifischer Klonotypen wurde durch Multiplikation der Antigen-spezifischen IGHV-Sequenzen mit der Anzahl der Klone und normalisiert auf die Anzahl aller IGHV-Sequenzen bestimmt.

2.2.16 Einzel-Zell-Analyse mittels Fluidigm 96.96

Es wurden 96-Well-Platten mit dem CellsDirect One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) vorbereitet.

Tabelle 13: Das PCR-Reaktionsgemisch für die erste PCR-Runde des Fluidigm 96.96 Assays.

Reagenz	Volumen per Well (μl)	Konzentration der Stammlösung
CellsDirect Reaction Mix	2,5	2x
MgSO ₄	0,5	50 mM
Primer Mix (äquimolare Mengen der Primer aus Tabelle 4)	0,25	100 μ M
SuperScript III RT / Platinum Taq	0,1	25x
DEPC-treated H ₂ O	2,15	NA

Splenische B-Zellen wurde mittels Einzelzell-Ablage am FACS Aria Fusion in 96-Well Platten (mit dem PCR-Reaktionsgemisch aus Tabelle 13) sortiert. Die 96-Well-Platten wurden mit Microseal 'B' seal Klebefolie (Bio-Rad, Düsseldorf) versiegelt und in einem Mastercycler gradient (Eppendorf) PCR-Thermocycler wurden die 96 Transkripte der sortierten Zellen mit dem PCR-Programm in Tabelle 14 prä-amplifiziert.

Tabelle 14: Das PCR-Programm für die erste PCR-Runde des Fluidigm 96.96 Assays.

Temperatur (°C)	Zeit (s)
50	900
95	120
95	15 (22 Zyklen)
60	240 (22 Zyklen)
4	600

Die PCR-Produkte wurden auf Trockeneis zum kommerziellen Sequenzier-Dienstleister EMBL-GeneCore (Heidelberg) transportiert, welcher eine Multiplex-qRT-PCR am Biomark HD (Fluidigm) durchführte. Dabei werden die prä-amplifizierten PCR-Produkte der 96 Transkripte aus jeweils 96 Zellen mittels

Mikrofluidik der 96.96 *dynamic array* IFCs (Fluidigm) in separate Reaktionsräume aufgetrennt und es erfolgt eine parallele Hochdurchsatz-qRT-PCR (ca. 192.000 parallele Reaktionen). Die Ct-Werte der Multiplex-qRT-PCR am Biomark HD (Fluidigm) wurden nach der Qualitätskontrolle bioinformatisch ausgewertet. Hauptkomponenten-Analysen (engl. principal component analysis, Abk. PCA) und *t-distributed stochastic neighbor embedding* (Abk. t-SNE) Analysen wurden entweder *unsupervised* oder basierend auf ausgewählten (*supervised*) Transkripten (Zelloberflächenmoleküle, NOTCH-Zielgene, Moleküle, deren Expression von sMZ-B-Zellen beschrieben wurde) (Descatoire *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2004) durchgeführt.

2.2.17 Einzel-Zell-Analyse mittels 10X Chromium

Splenische B-Zell-Suspensionen wurden mit anti-CD20-BV421, anti-CD21-PE, anti-IgM-FITC, anti-CD27-PE-Cy7 und anti-IgD-PerCP-Cy5.5 (alle BD Biosciences) immungefärbt. Zusätzlich wurden 0,5 µg pro 10⁶ Zellen der CiteSeq-Antikörper anti-CD5, anti-CD23, anti-CD27, anti-CD29, anti-CD35, anti-CD38 und anti-CD49d (alle Biolegend) gefärbt. Immungefärbte splenische B-Zell-Suspensionen wurden am FACSFusion (BD Biosciences) Durchflusszytometer analysiert und B-Zell-Suspensionen mit einem sMZ-B-Zell-Anteil von bis zu 60 % hergestellt. Sortierte splenische B-Zell-Suspensionen wurde in Kooperation mit Kevin Bronischewski vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) mit Hilfe des Chromium Controller und des Next GEM Accessory Kit (beide 10X Genomics) lysiert und die zelluläre RNA mit molekularen Zell-spezifischen Barcodes konjugiert. Die Herstellung und Prozessierung der drei Sequenzierbibliotheken (engl. sequencing *libraries*; Genexpression, VDJ-Umlagerung und Zelloberflächenproteine via TotalSeq-Antikörper) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. VDJ- und CITE-Seq Sequenzierbibliotheken wurden auf einem MiSeq Instrument (Illumina) mit einer Leselänge von 2x150 bp am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) sequenziert. Die Genexpressionsbibliothek wurde auf einem NovaSeq Instrument (Illumina) mit einer Leselänge von 16+75 bp sequenziert. Die Zuordnung der Sequenzdaten erfolgte mittels molekularer Barcodes innerhalb der Cell Ranger Software (10X Genomics). Die Datenauswertung erfolgte mit R und

den R Programmierweiterungen MAGIC, Seurat, pheatmap und singleR (Tabelle 11).

2.2.18 Immunhistochemie

Humane Milzbiopsate wurden mit einem Skalpell in Gewebskeile geschnitten und in Tissue Tek O.C.T. compound (Sakura GmbH) in Einweg-Formen eingebettet. Eingebettete Gewebskeile wurde in der Gasphase von flüssigem Stickstoff eingefroren. Gewebsschnitte (5 µm) wurden bei -15°C mit einem Kryostaten (CM1850 UV, Leica Biosystems) geschnitten, auf SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträgern (Thermo Scientific) platziert und für 5 min in eisgekühltem Aceton fixiert. Endogene Peroxidasen in den Gewebsschnitten wurden durch Inkubation mit 3 %-igem H₂O₂ (Carl Roth) für 10 min inaktiviert. Im Anschluss daran wurden die Gewebsschnitte für 1 Stunde in 2 %igem normalem Ziegenserum (engl. *normal goat serum*) inkubiert. Primärantikörper (Tabelle 7) wurden in 2 %igem normalem Ziegenserum verdünnt, zu den Gewebsschnitten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden HRP- konjugierte (engl. *horseradish peroxidase*, Abk. HRP) Sekundärantikörper (Tabelle 7) zu den Gewebsschnitten gegeben und für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Zugabe von DAB+ Substrat (Agilent Dako). Die HRP-Reaktion wurde nach 30 min durch Waschen in H₂O beendet und die Zellkerne durch Gegenfärbung mit Hämalaun angefärbt. Gewebsschnitte wurden mit ROTI-Mount unter Deckgläsern eingedeckt und an einem Axioscope 5 Mikroskop mit Axiocam 305 color Kamera (Zeiss AG) und Verwendung der ZEN blue Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH) aufgenommen.

2.2.19 Ultra high content imaging mittels MACSima Imaging System

Das MACSima Imaging System (Miltenyi Biotec) basiert auf der MACSima Image Cyclic Staining Technologie (Miltenyi Biotec) und umfasst Zyklen von Immunfluoreszenz-Färbung, Bildaufnahme und Ausbleichen des Fluorochroms mit einem weißen LED-Licht. Diese Technologie erlaubt den Nachweis multipler Antigene (in dieser Arbeit wurden 45 Antigene immungefärbt) auf einem einzelnen Gewebsschnitt.

Humane Milzbiopsate wurden wie in Kapitel 2.2.18 beschrieben ist, eingebettet und eingefroren. Gewebsschnitte mit 8 μm Schichtdicke wurden hergestellt auf einer Gewebsplatte platziert und 20 min in eis-gekühltem Aceton fixiert. Gewebsplatten wurden mit Rahmen von 24-Well-Platten verklebt. Eine Immunfärbung mit anti-CD21 (Miltenyi Biotec) und Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) wurde durchgeführt. Antikörper (Tabelle 6) wurden mit den entsprechenden Titern in AutoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) in einer 96-Well-Platte verdünnt und mit Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) sowie FcR Block (Miltenyi Biotec) supplementiert. 24-Well-Platten mit Gewebsschnitten und 96-Well-Platten mit Antikörpern wurden in das MACSima Instrument (Miltenyi Biotec) eingesetzt. Basierend auf der anti-CD21-Immunfärbung und der Hoechst 33342 Zellkern-Färbung wurden Regionen ausgewählt, die B-Zell-Follikel, Marginalzonen und T-Zell-Zonen umfassten und die Expression von 45 Antigenen mittels MACSima-Image-Cyclic-Staining-Verfahrens detektiert und aufgenommen. Mikroskopische Bildaufnahmen wurden mit dem MICS processing tool (Miltenyi Biotec) prozessiert. Korrekturen für ungleichmäßige Ausleuchtung im Strahlengang wurden durchgeführt. Rest-Fluoreszenz, die nach dem Ausbleichen detektierbar war, wurde bei einer darauffolgenden Immunfärbung von den mikroskopischen Bildaufnahmen subtrahiert. Die Durchführung der Experimente am MACSima Instrument erfolgte in Kooperation mit Dr. Aparajita Singh in den Laboren von Miltenyi Biotec GmbH. Änderungen der Helligkeit und des Kontrastes und farbkodierte Überlagerung der Expression mehrerer Antigene wurden mit ImageJ durchgeführt. Bildsegmentierung in Zellkerne (Hoechst 33342) und Zellplasma (Voronoi Teilung) und Bestimmung der medianen Expressionsstärke in einzelnen Bildregionen wurden mit den R Programmierweiterungen EBIImage und GGally durchgeführt.

2.2.20 RNA-Hochdurchsatz-Sequenzierung und Analyse von Genexpressionsprofilen humaner B-Zell-Populationen

Humane PB-Naive-, PB-MD27- und PB-CSW- sowie sMZ-B-Zell-Populationen wurden isoliert, zelluläre RNA mittels RNeasy Micro Kit (Qiagen) extrahiert, die Sequenzierbibliotheken (engl. *sequencing libraries*) mittels Trio RNA-Seq Library Preparation Kit und die die Transkriptionsprofile mittels RNA-Hochdurchsatz-

Sequenzierung auf einem MiSeq (Illumina) mit einer Leselänge von 2x75 bp bestimmt. Die Transkripthäufigkeit wurde mit der R Programmerweiterung DESeq2 bestimmt und mit Varianz stabilisierender Transformation normalisiert. Hauptkomponentenanalysen wurden mit der R Programmerweiterung pcaExplorer durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene wurden mit DESeq2 mit Hilfe statistischer Filter (*log₂ fold change* und *adjusted p-value*) für paarweise Vergleiche zwischen den B-Zell-Populationen bestimmt. *Heatmaps* der Genexpressionsmuster wurden mit der R Programmerweiterung pheatmap erstellt. Eine Anreicherung differenziell exprimierter Gene in publizierten Gengruppen wurde mit der Software GSEA 4.1.0 (Broad Institute) in den *Gene set databases* Hallmarks, C2 (*Curated*), C5 (*Gene ontology*) und C7 (*Immunologic signatures*) der Molecular Signatures Database v7.2 berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrische Bestimmung und Etablierung einer Sortierstrategie für naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen aus humanem PB und Milz

Humanes PB und Milz enthalten naive und Gedächtnis-B-Zell-Populationen, die sich anhand ihrer Immunphänotypen unterscheiden lassen (Klein *et al.*, 1998; Seifert und Küppers, 2016; Seifert *et al.*, 2015; Weisel und Shlomchik, 2017). Im Folgenden wird vorgestellt, wie diese B-Zell-Populationen in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch identifiziert wurden. Die durchflusszytometrische Messung diente der Bestimmung des relativen Anteils der B-Zell-Populationen sowie der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting*, kurz „Zellsortierung“) für nachfolgende *in vitro* Untersuchungen und molekulare Analysen.

Für die Etablierung der durchflusszytometrischen Messungen und die Sortierstrategie wurden verschiedene Zelloberflächenmoleküle (CD21, CD23, CD27 sowie IgM, IgD, IgG und IgA) auf B-Lymphozyten-Suspensionen aus Milzen und PB von Individuen im Alter zwischen 18 und 65 Jahren (Erwachsene, Tabelle 12) markiert (Abb. 1 und Abb. 2).

Die Gewebsherkunft von B-Zell-Populationen aus der Milz wird durch das Präfix „s“ (für engl. *spleen*) und von B-Zell-Populationen des Blutes wird durch das Präfix „PB“ (für peripheres Blut) kenntlich gemacht. In der Milz erfolgte eine Unterteilung in CD21⁺ und CD21^{high} B-Zellen. CD21⁺ B-Zellen der Milz wurden in naive B-Zellen (sNaive, CD23⁺CD27⁻), IgM-Gedächtnis B-Zellen (sMD27, CD23-CD27⁺IgM⁺) und klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (sCSW, CD23-CD27⁺ und IgG⁺ oder IgA⁺) unterteilt (Abb. 1). CD21^{high} B-Zellen sind eine Besonderheit der Milz und dort in der histologisch definierten Marginalzone lokalisiert (Steiniger *et al.*, 2005). Unter CD21^{high} B-Zellen wurden IgM⁺ sMZ und klassengewechselte (IgG⁺ oder IgA⁺) sMZ-B-Zellen (sMZ-CSW) unterschieden (Abb. 1).

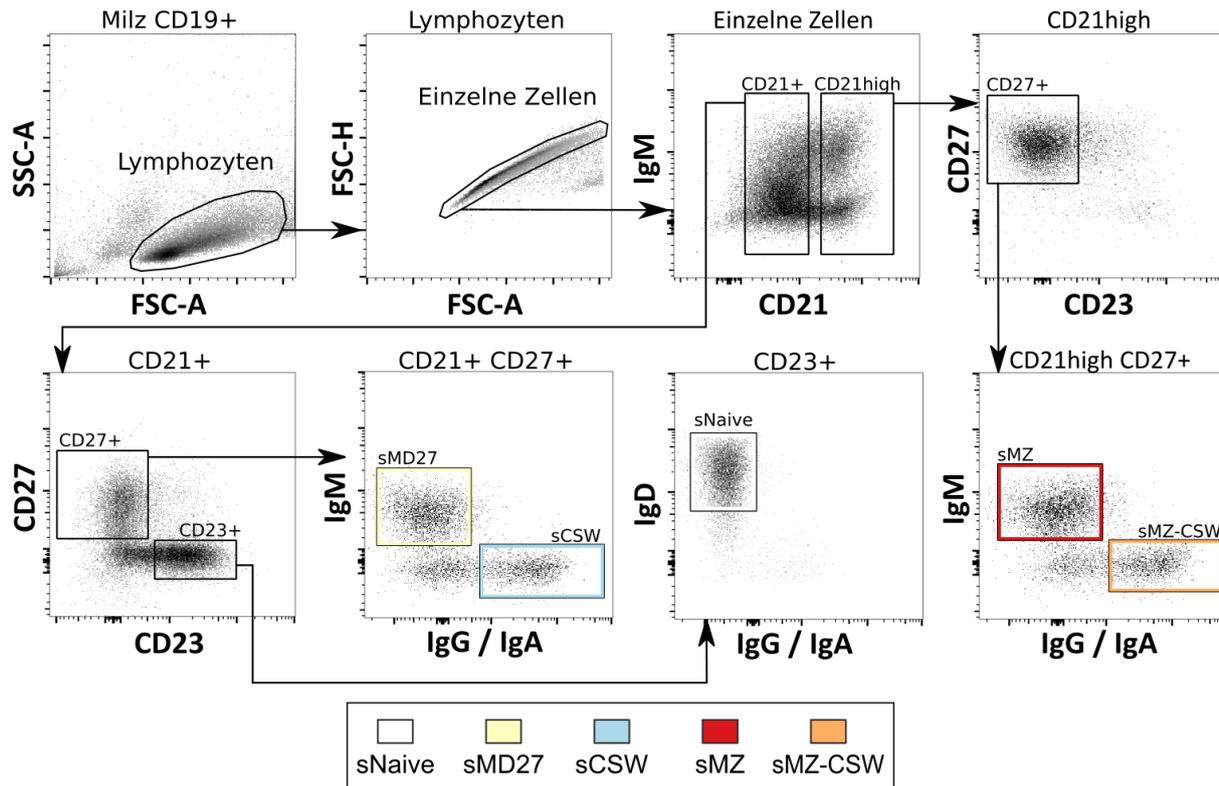


Abb. 1: Strategie für die Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen aus Milzbiopsaten

Splenische CD19⁺ B-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von CD21, CD23, CD27, IgM, IgD und IgG/IgA getestet. Naive-B-Zellen (sNaive, CD21⁺CD23⁺CD27⁻IgM⁺IgD^{high}IgG/IgA⁻), IgM-Gedächtnis-B-Zellen (sMD27, CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD^{+/-}IgG/IgA⁻), klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (sCSW, CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁻IgD⁻IgG/IgA⁺), sMZ-B-Zellen (CD21^{high}CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD^{+/-}IgG/IgA⁻) und klassengewechselte sMZ-B-Zellen (sMZ-CSW, CD21^{high}CD23⁻CD27⁺IgM⁻IgD⁻IgG/IgA⁺) wurden phänotypisch unterschieden und ggf. sortiert. Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Messung und Sortierstrategie von B-Lymphozyten aus der Milz eines Individuums im Alter von 47 Jahren. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Splenische GC-B-Zellen waren in den meisten Individuen nicht detektierbar und wurden daher von der Analyse ausgeschlossen.

Analog zu den CD21⁺ B-Zellen in der Milz wurden unter den B-Zellen aus PB naive-B-Zellen (PB-Naive), IgM-Gedächtnis B-Zellen (PB-MD27) und klassengewechselte-Gedächtnis-B-Zellen (PB-CSW) unterschieden (Abb. 2).

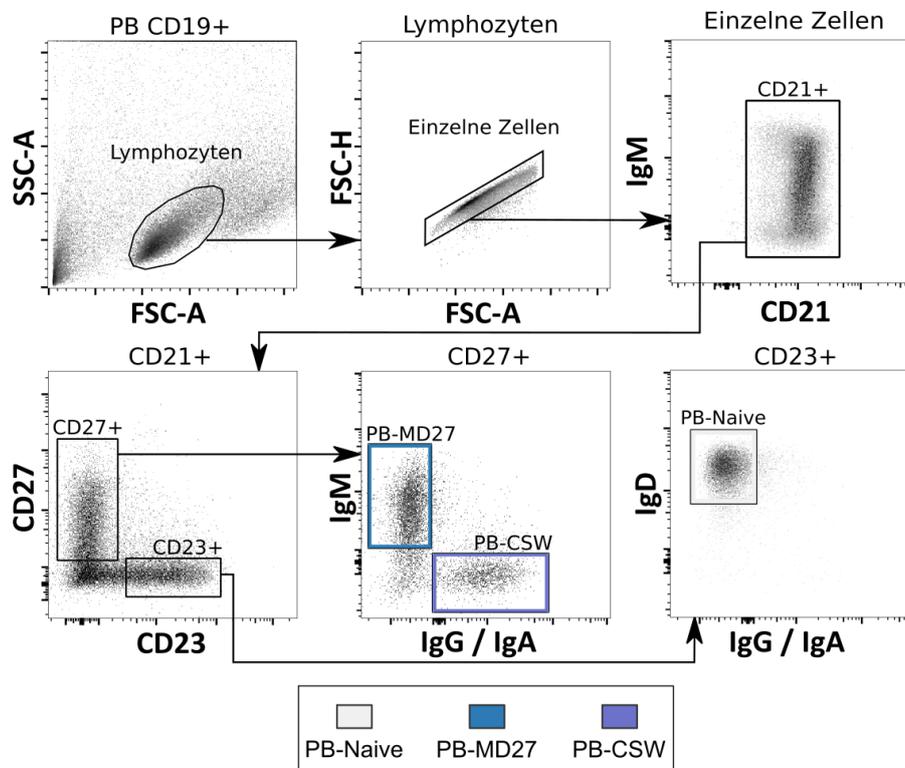


Abb. 2: Strategie für die Zellsortierung humaner B-Zell-Populationen aus PB

CD19⁺ B-Zellen aus PB wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von CD21, CD23, CD27, IgM, IgD und IgG/IgA untersucht. Naive B-Zellen (PB-Naive, CD21⁺CD23⁺CD27⁻IgM⁺IgD^{high}IgG/IgA⁻), IgM-Gedächtnis-B-Zellen (PB-MD27, CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD^{+/-}IgG/IgA⁻) und klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (PB-CSW, CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁻IgD⁻IgG/IgA⁺) wurden phänotypisch unterschieden und ggf. sortiert. Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse von B-Zellen aus dem PB eines Individuums im Alter von 47 Jahren. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Eine Unterscheidung von B-Zell-Populationen aus PB basierend auf einer differenziellen Expressionsstärke von CD21 – vergleichbar zu den B-Zell-Populationen aus Milz – ist nicht möglich (Abb. 2 und Abb. 3). CD21^{low}-B-Zellen waren selten und wurden nicht untersucht. Die Expression von IgE wurde ebenfalls nicht untersucht.

3.2 Der relative Anteil von sMZ-B-Zellen ist konstant mit dem Alter, wobei der Anteil von sMZ-CSW-B-Zellen zunimmt

Epidemiologischen Studien zufolge haben Neugeborene, Kleinkinder und Senioren (Tabelle 12) ein erhöhtes Risiko für schwere Krankheitsverläufe bei Infektionen, vor allem mit kapselbildenden Bakterien (Klein, 1981; Sims *et al.*, 1992).

Ein Hauptgrund für die Verwundbarkeit von Neugeborenen und Kleinkindern gegenüber o.g. Infektionen ist mit der Abwesenheit von sMZ-B-Zellen und fehlender Expression von CD21 von B-Zellen in Kindern unter 2 Jahren assoziiert (Kruschinski *et al.*, 2004; Timens *et al.*, 1989; Zandvoort *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, ab welchem Zeitpunkt humane sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen detektierbar sind und ob altersbedingte Änderungen messbar sind. Hierfür wurde der relative Anteil von sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen im Milz-Kompartiment von insgesamt 104 Individuen mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Wie in Abb. 1 dargestellt ist, werden sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen von den restlichen B-Zell-Populationen der Milz anhand der Oberflächenmoleküle CD21 und IgM unterschieden (Abb. 3).

Eine Auswahl repräsentativer Daten zeigt altersabhängig den relativen Anteil von sMZ und sMZ-CSW-B-Zellen vom Kleinkind bis zu Senioren und verdeutlicht die altersbedingten Änderungen der sMZ-B-Zell-Zusammensetzung (Abb. 3).

In allen untersuchten Individuen unter 2 Jahren ($n = 8$) ist bereits ein beträchtlicher Anteil von sMZ-B-Zellen vorhanden, wohingegen sMZ-CSW-B-Zellen im Vergleich zu Erwachsenen deutlich seltener auftreten (Abb. 3, 2 Monate und 2 Jahre). Die Expression von CD21 unter kindlichen B-Zellen der Milz ist nicht vermindert (Abb. 3, 2 Monate und 2 Jahre). In Milzen älterer Kinder (Abb. 3, 11 Jahre) ist der relative Anteil von sMZ-CSW-B-Zellen ähnlich hoch, wie in den Milzen erwachsener Individuen (Abb. 3, 47 Jahre). In der Altersgruppe ab 65 Jahren ist der relative Anteil von sMZ-CSW an splenischen B-Zellen stark erhöht (Abb. 3, 74 Jahre).

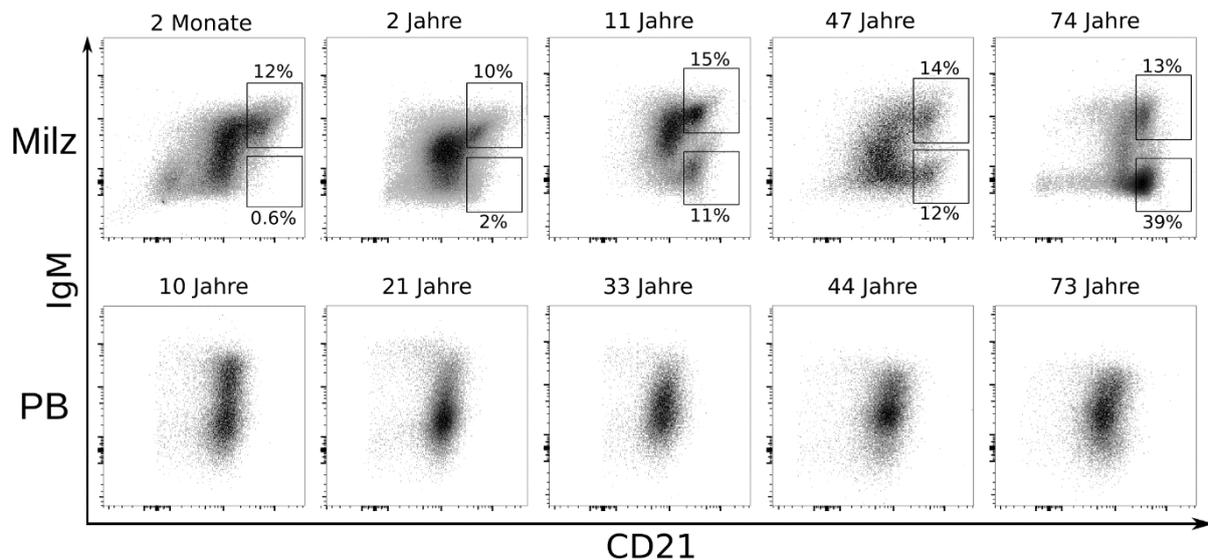


Abb. 3: Anteil von sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen in der Milz in Abhängigkeit vom Lebensalter

Oberflächenexpression von CD21 und IgM wurde auf CD19⁺ B-Lymphozyten aus Milz und PB detektiert. Der relative Anteil von sMZ- (IgM⁺CD21^{high}) und sMZ-CSW- (IgM⁻CD21^{high}) B-Zellen ist für fünf Individuen der Altersgruppen Kleinkinder, Kinder, Erwachsene und Senioren dargestellt. (obere Reihe). Die untere Reihe zeigt eine analoge, Analyse von B-Zellen aus dem PB. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

In allen untersuchten Individuen und unabhängig vom Alter ist der relative Anteil der sMZ-B-Zellen im B-Zell-Kompartiment der Milz nahezu konstant (Abb. 3). Der Anteil von sMZ-CSW-B-Zellen dagegen ändert sich deutlich mit dem Lebensalter und reicht von unterhalb der Nachweisgrenze in Neugeborenen und Kleinkindern bis hin zum überwiegenden Anteil aller B-Zellen im hohen Alter (Abb. 3). Abb. 3 ist ebenfalls zu entnehmen, dass CD21^{high} B-Zellen eine Besonderheit des splenischen B-Zell-Kompartiments darstellen und im PB durchflusszytometrisch nicht nachweisbar sind (Abb. 3).

3.3 Die Zusammensetzung der B-Zell-Kompartimente des PB und der Milz unterliegt einer altersabhängigen Dynamik im Menschen

Der relative Anteil der B-Zell-Populationen aus PB und Milz (Abb. 1 und Abb. 2) wurde in insgesamt 141 Individuen untersucht (104 Milzbiopsate, davon 30 mit gepaartem Blut, zusätzlich 37 Blutproben mit gleicher Altersverteilung wie bei den Milzbiopsaten). Ein Großteil der B-Zellen in Neugeborenen und Kleinkindern entspricht dem Phänotyp naiver B-Zellen (> 60 % in der Milz und > 80 % im PB, Abb. 4 und Abb. 5). Der Anteil splenischer transitioneller B-Zellen beträgt in Kindern < 2 Jahren ca. 10 % (nicht gezeigt). Gedächtnis-B-Zellen (CD27⁺) sind

bereits im B-Zell-Kompartiment von Neugeborenen und Kleinkindern nachweisbar, aber sehr selten im Vergleich zu Erwachsenen (< 20 % in der Milz und < 10 % im PB von Kleinkindern, Abb. 4 und Abb. 5). Die Mehrheit der B-Zellen aus PB und Milz von Neugeborenen und Kleinkindern exprimiert IgM und IgD auf der Zelloberfläche, wohingegen der Anteil von sMZ-CSW-, sCSW- und PB-CSW-B-Zellen in dieser Altersgruppe gering ist (jeweils < 3 %, Abb. 4 und Abb. 5).

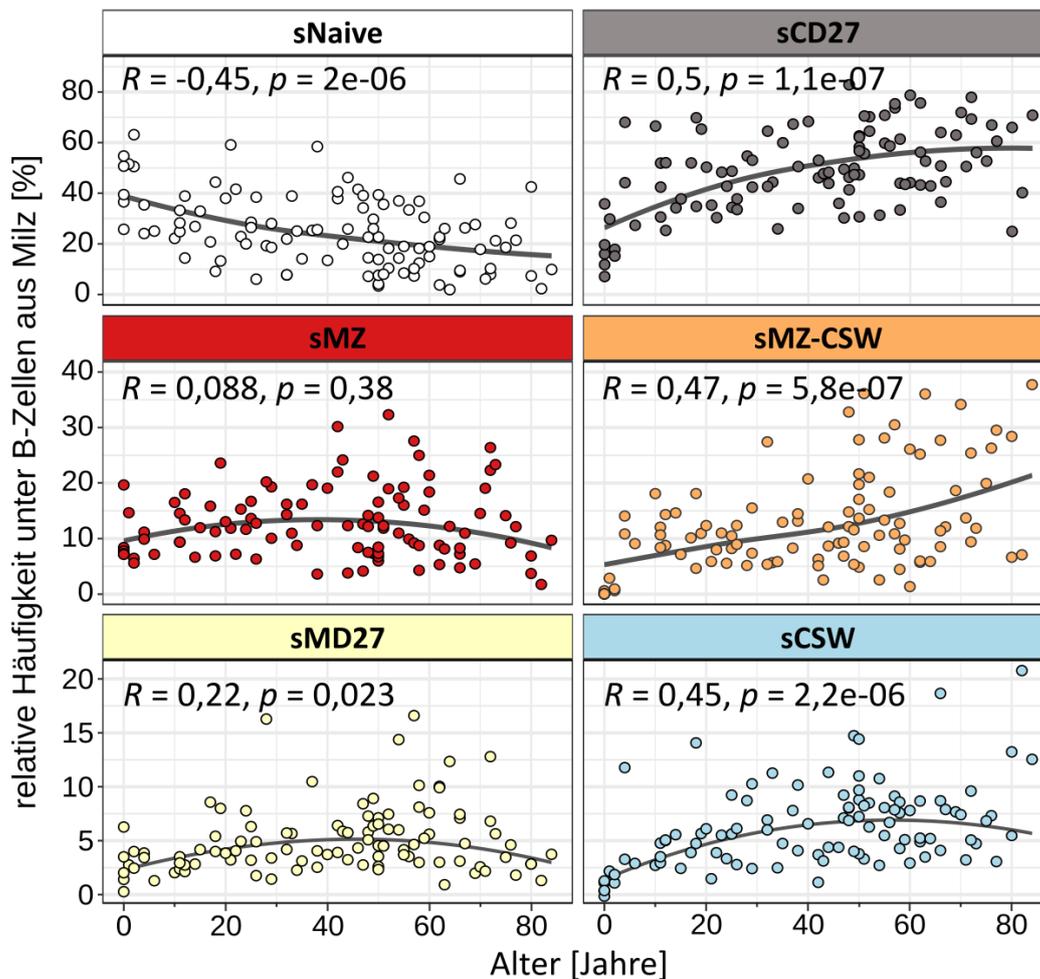


Abb. 4: Relativer Anteil der B-Zell-Populationen aus den Milzen von 104 Individuen im Alter von 0 Monaten bis 89 Jahren

Immunphänotypisierung erfolgte anhand der Expression von CD21, CD23, CD27, IgD und IgM (Abb. 1) unter $CD19^+CD20^+$ B-Zellen aus Milz. Dargestellt ist der relative Anteil von sNaive ($CD21^+CD23^+CD27-IgM^+IgD^{high}$), sCD27 ($CD23^+CD27^+$), sMZ ($CD21^{high}CD23^+CD27^+IgM^+IgD^{+/-}$), sMZ-CSW ($CD21^{high}CD23^+CD27^+IgM-IgD^-$), sMD27 ($CD21^+CD23^+CD27^+IgM^+IgD^{+/-}$) und sCSW ($CD21^+CD23^+CD27^+IgM-IgD^-$) B-Zell-Populationen unter splenischen B-Lymphozyten ($n = 104$). Der Pearson Korrelationskoeffizient und die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine lineare Regression sind angegeben. Die Ausgleichskurven bilden eine lokale Regression nach dem LOESS-Verfahren ab. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Zwischen früher Kindheit und dem Erwachsenenalter ist eine deutliche Zunahme von Gedächtnis-B-Zellen (CD27⁺, auf ca. 40 % der B-Zellen in der Milz, bzw. 20 % der B-Zellen im PB) und sCSW- und PB-CSW-B-Zellen erkennbar (jeweils 10 % der B-Zellen aus Blut und Milz, Abb. 4 und Abb. 5). Im Gegenzug sinkt mit dem Alter der Anteil naiver B-Zellen aus PB (von ca. 80 % in Kleinkindern auf ca. 40 % in Senioren) und Milz (von ca. 50 % auf ca. 20 % im gleichen Zeitraum, Abb. 4 und Abb. 5).

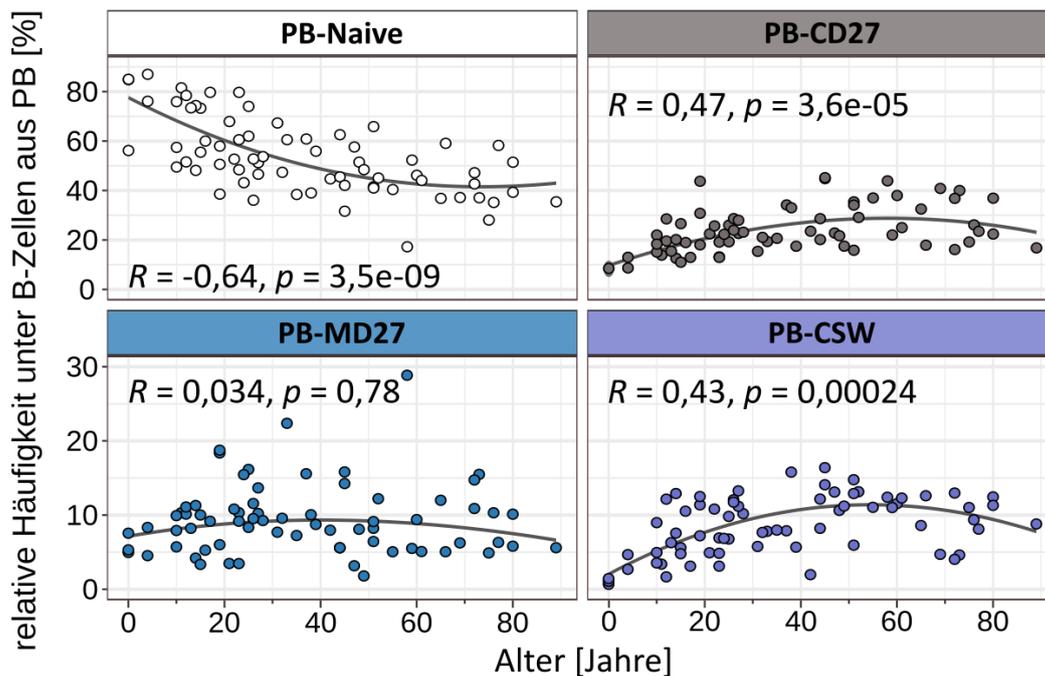


Abb. 5: Relativer Anteil der B-Zell-Populationen aus dem PB von 67 Individuen im Alter von 0 Monaten bis 89 Jahren

Immunphänotypisierung erfolgte anhand der Expression von CD21, CD23, CD27, IgD und IgM (Abb. 2) unter CD19⁺CD20⁺ B-Zellen aus PB. Dargestellt ist der relative Anteil von PB-Naiven- (CD21⁺CD23⁺CD27⁻IgM⁺IgD^{high}), PB-CD27- (CD23⁻CD27⁺), PB-MD27- (CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁺IgD^{+/−}) und PB-CSW- (CD21⁺CD23⁻CD27⁺IgM⁻IgD⁻) B-Zell-Populationen unter B-Lymphozyten aus PB (n = 67). Der Pearson Korrelationskoeffizient und die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine lineare Regression sind angegeben. Die Ausgleichskurven bilden eine lokale Regression nach dem LOESS-Verfahren ab. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Wie in Kapitel 3.2 an durchflusszytometrischen Daten gezeigt ist, sind in den untersuchten Milzen von Kleinkindern zwischen 2 und 24 Monaten nach Geburt sMZ-B-Zellen, jedoch praktisch keine sMZ-CSW-B-Zellen nachweisbar (Abb. 3 und Abb. 4).

PB-MD27- und sMD27-B-Zellen sind ebenfalls bereits in Kleinkindern detektierbar und ihr relativer Anteil ändert sich kaum mit dem Alter, ähnlich dem relativen Anteil von sMZ-B-Zellen. Der relative Anteil von PB-CSW und sCSW-B-Zellen ist in Kleinkindern unter 2 Jahren vermindert, erreicht aber bereits während der Kindheit das Niveau erwachsener Individuen (Abb. 4 und Abb. 5).

In Senioren (> 65 Jahre) akkumulieren deutliche Änderungen in der splenischen B-Zell-Zusammensetzung: Splenische naive B-Zellen sind selten (bis ca. 25 % der splenischen B-Zellen), wohingegen sMZ-CSW-B-Zellen in Individuen über 65 Jahren mehr als 30 % der splenischen B-Zellen ausmachen.

Die Zusammensetzung der B-Zellen aus PB und Milz wandelt sich mit dem Alter. Dieser Wandel erfolgt rapide während der Kindheit und graduell oder schleichend im gehobenen Alter. Beobachtet wurde ein Wandel von einer weitgehend Antigen-naiven (IgM⁺IgD^{high}CD27⁻) B-Zell-Population in Neugeborenen und Kleinkindern, über eine ausgewogene Zusammensetzung aus diversen Gedächtnis-B-Zell-Populationen und naiven B-Zellen in jungen Erwachsenen, bis zu einer Dominanz klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen (sCSW und sMZ-CSW) im hohen Alter (> 65 Jahre).

3.4 Splenische CD21⁺ und CD21^{high} B-Zellen unterscheiden sich phänotypisch und funktionell

Im hohen Alter steigen die Morbidität und Mortalität durch Infektionskrankheiten an (Yoshikawa, 1997, 2000). Altersabhängige Veränderungen im humanen B-Zell-System werden häufig als sekundäre Auswirkungen der Veränderungen im T-Zell-System betrachtet (Kapitel 1.10). Jedoch sind auch einige intrinsische phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen humanen B-Zell-Populationen beschrieben (Seifert *et al.*, 2015; Tangye *et al.*, 1998) und zahlreiche Arbeiten deuten auf ein gesteigertes Reaktionsvermögen humaner sMZ-B-Zellen (Cerutti *et al.*, 2013). Funktionelle Unterschiede zwischen B-Zell-Populationen könnten einen Einfluss auf den Verlauf von Immunantworten haben, wenn sich die B-Zell-Zusammensetzung im Altersverlauf ändert.

Untersuchungen des Phänotyps und der Dynamik nach Aktivierung erfolgten an isolierten B-Zell-Populationen aus Milz und PB (Abb. 1 und Abb. 2). Die Expressionsstärke von Zelloberflächenmolekülen, die von sMZ-B-Zellen exprimiert werden (Cerutti *et al.*, 2013), wurde untersucht.

Zwischen sMZ- (CD21^{high}) und Gedächtnis-B-Zell-Populationen (CD21⁺) der Milz sind signifikant unterschiedliche Expressionsmuster für die sMZ-assoziierten Moleküle CD1c, CD35, CD148 und CD300a sowie für CD27 und CD79b detektierbar (Abb. 6). Die B-Zell-Populationen sMZ und sMD27 einerseits sowie sMZ-CSW und sCSW andererseits, unterscheiden sich paarweise jeweils in der Expression von CD21, CD27, CD35, CD148 und CD300a. Darüber hinaus sind sMD27 und sCSW-B-Zellen von den jeweils korrespondierenden PB-MD27 und PB-CSW Populationen anhand der Oberflächenexpression von CD27, CD35, CD79b und CD148 unterscheidbar (Abb. 6). PB-Naive- und sNaive-B-Zellen unterscheiden sich in der Expressionshöhe von CD35, CD79b und CD148 (Abb. 6), ein Hinweis auf gewebsassoziierte Phänotypen. Diese Daten zeigen, dass splenische B-Zellen anhand ihrer CD21-Expression in distinkte Populationen aufgetrennt werden können.

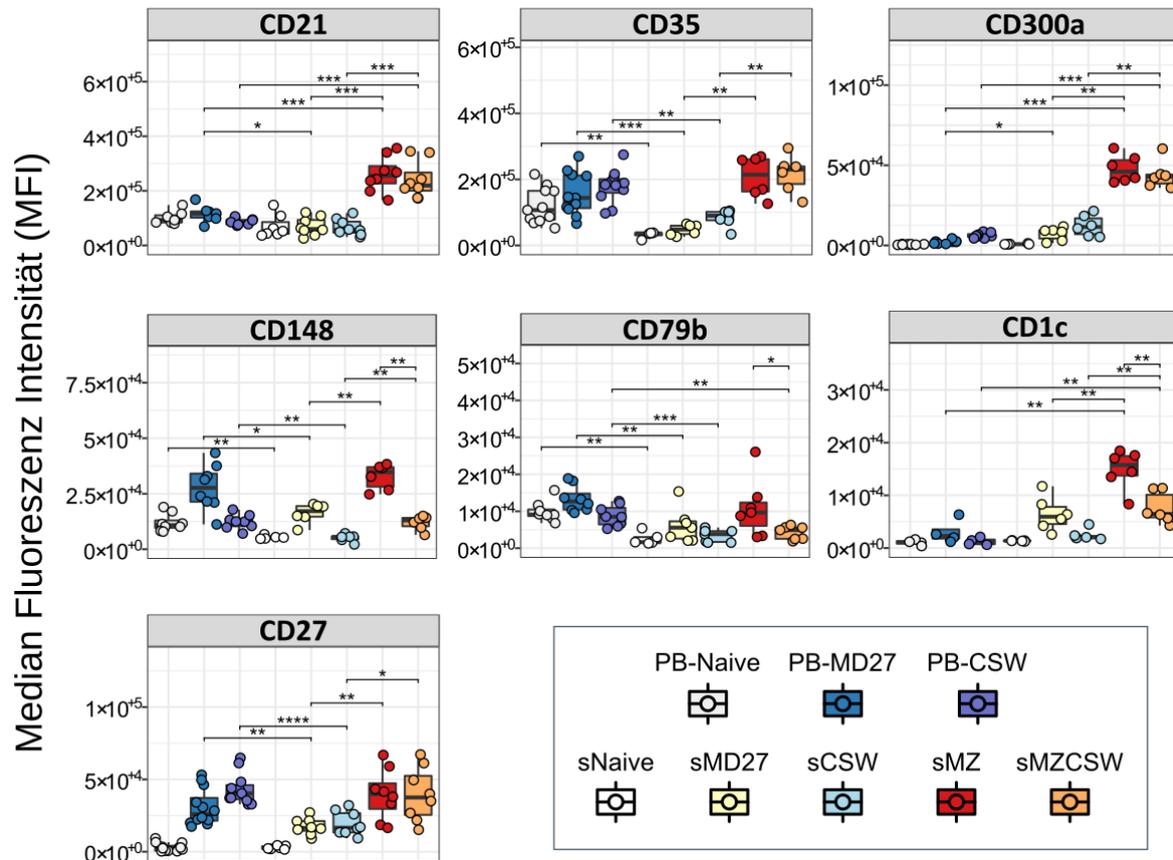


Abb. 6: Expression von Zelloberflächenmolekülen auf ruhenden B-Zell-Populationen aus PB und Milz

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expressionsstärke (MFI) von Zelloberflächenmolekülen auf den B-Zell-Populationen aus PB und Milz unmittelbar nach der Zellsortierung (Milz $n = 2-6$; PB $n = 8-11$). Reihenfolge der B-Zell-Populationen in den Einzelbildern: PB-Naive-, PB-MD27-, PB-CSW-, sNaive-, sMD27-, sCSW-, sMZ- und sMZCSW-B-Zellen. Statistische Signifikanz nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit $*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Funktionelle Untersuchungen an isolierten sMZ-, sMZ-CSW-, sMD27-, sCSW- und sNaive- sowie PB-MD27-, PB-CSW- und PB-Naive-B-Zellen erfolgten *in vitro* unter TD- bzw. TI-I-Stimulierungsbedingungen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde Zellaktivierung und die Expression von B-Zell-T-Zell-Interaktionsmolekülen (Abb. 7) untersucht und weiterhin wurde Zellproliferation nach 48, 72 und 96 Stunden Inkubationszeit bestimmt (Abb. 8). Proliferation wurde durch Verdünnung eines Membranfarbstoffs (eFluor 670) im Sinne eines *pulse-chase*-Verfahrens gemessen.

Anzeichen von frühem Reaktionsvermögen der B-Zellen (Induktion von CD25 oder CD69) sind unmittelbar nach der Zellsortierung in keiner B-Zell-Populationen aus PB oder Milz nachweisbar (Abb. 7). Frisch isolierte, unstimulierte sMZ und sMZ-CSW-B-Zellen zeigen signifikant höhere Oberflächenexpression von CD80 verglichen mit den splenischen Gedächtnis-B-Zell-Populationen sMD27 und sCSW.

In Folge der TD- oder TI-I-Stimulation regulieren die untersuchten B-Zell-Populationen aus PB und Milz die Oberflächenmoleküle CD25 und CD69 deutlich herauf, was auf ein frühes Reaktionsvermögen schließen lässt (Abb. 7).

CD27⁺ B-Zell-Populationen (PB-MD27, PB-CSW, sMD27, sCSW, sMZ, sMZ-CSW) induzieren im gleichen Zeitraum CD25, CD80 und CD54 in Folge von TI-I- und TD-Stimulation stärker als die korrespondierenden naiven B-Zellen aus PB und Milz (Abb. 7). Die Induktion von CD69 und CD25 ist innerhalb von 24 Stunden unter TI-I- und TD-Stimulation auf splenischen B-Zell-Populationen höher als auf den B-Zell-Populationen aus PB (Abb. 7).

CD21^{high} B-Zellen exprimieren im gleichen Zeitraum CD25 und CD80 in Folge von TD-Stimulation signifikant höher als splenische CD21⁺ B-Zellen des gleichen Isotyps (paarweise Vergleiche zwischen sMZ und sMD27 sowie sMZ-CSW und sCSW, Abb. 7). Eine ähnliche Tendenz ist für CD54 erkennbar, erreicht jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p > 0,05$).

Die Expression von CD86 ist nach 24 Stunden auf sMZ-CSW-B-Zellen unter TI-I- und TD-Stimulation signifikant höher im Vergleich zu sMZ-B-Zellen. In der Tendenz ($p > 0,05$) ist das gleiche Muster für sCSW im Vergleich zu sMD27 sowie PB-CSW im Vergleich zu PB-MD27 erkennbar (Abb. 7).

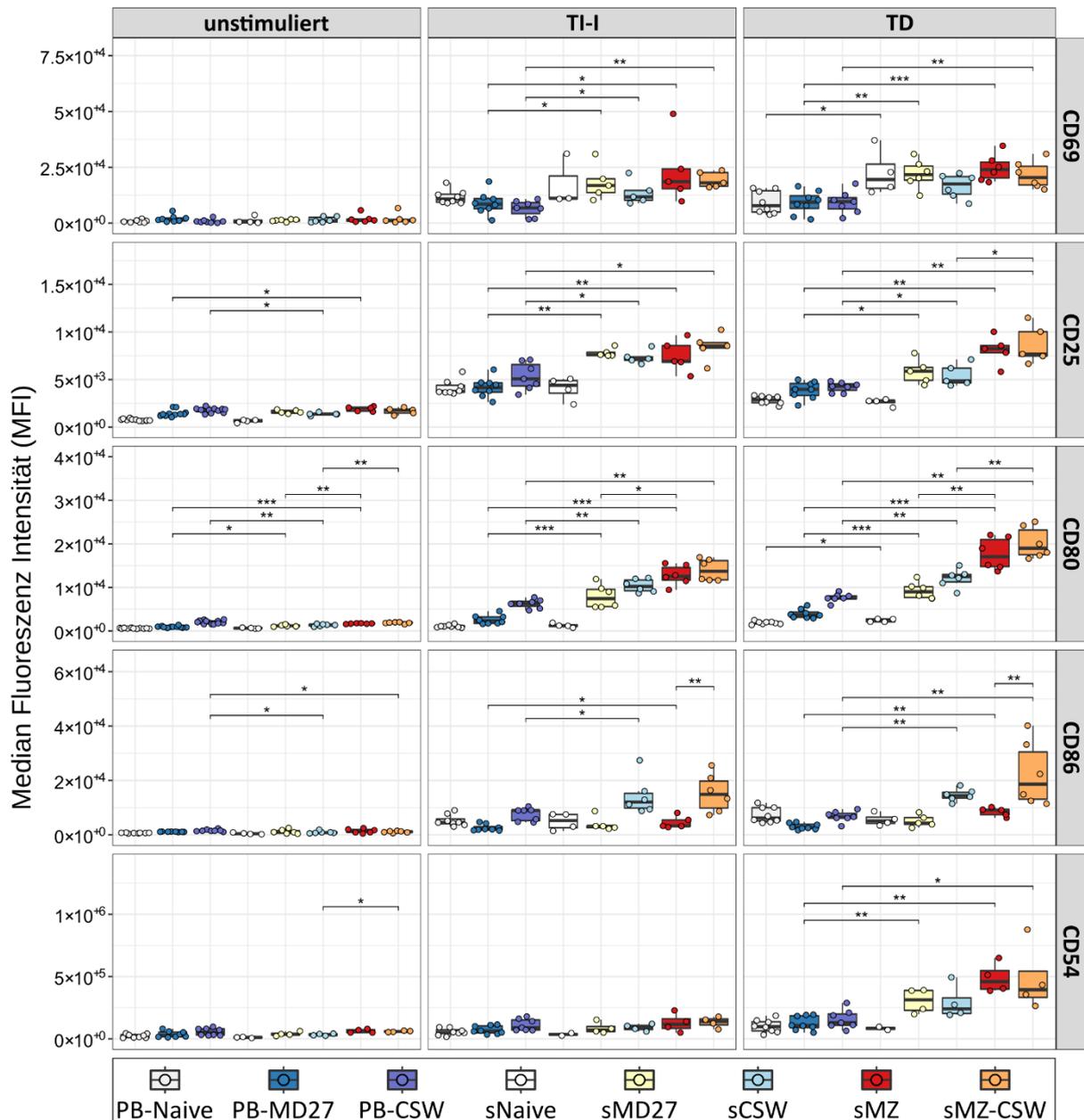


Abb. 7: Oberflächenexpression ausgewählter Moleküle von ruhenden-, TD- bzw. TI-I-aktivierten B-Zell-Populationen aus PB und Milz

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expressionsstärke (MFI) von Zelloberflächenmolekülen (CD69, CD25, CD80, CD86 und CD54) auf B-Zell-Populationen aus PB und Milz unmittelbar nach der Zellsortierung sowie nach 24 h Inkubation *in vitro* nach Zugabe von TI-I- bzw. TD-Stimulanzen. Reihenfolge der B-Zell-Populationen in den Einzelbildern: PB-Naive-, PB-MD27-, PB-CSW-, sNaive-, sMD27-, sCSW-, sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen. Statistische Signifikanz nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Proliferation wurde in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch durch Verdünnung eines Membranfarbstoffs untersucht. Hierfür werden sortierte B-Zell-Populationen aus PB und Milz mit eFluor670 markiert, aktiviert und nach 48, 72 und 96 h der Anteil proliferierter Zellen (eFluor670^{low}) bestimmt (Abb. 8 A). In Folge von TD- oder TI-I-Stimulation schließen nahezu alle sMZ und sMZ-CSW-B-Zellen innerhalb von 72 Stunden mindestens eine Zellteilung ab (Abb. 8 B). Ebenfalls proliferiert ein Teil der sCSW-B-Zellen unter TD-Stimulationsbedingungen innerhalb dieser drei Tage.

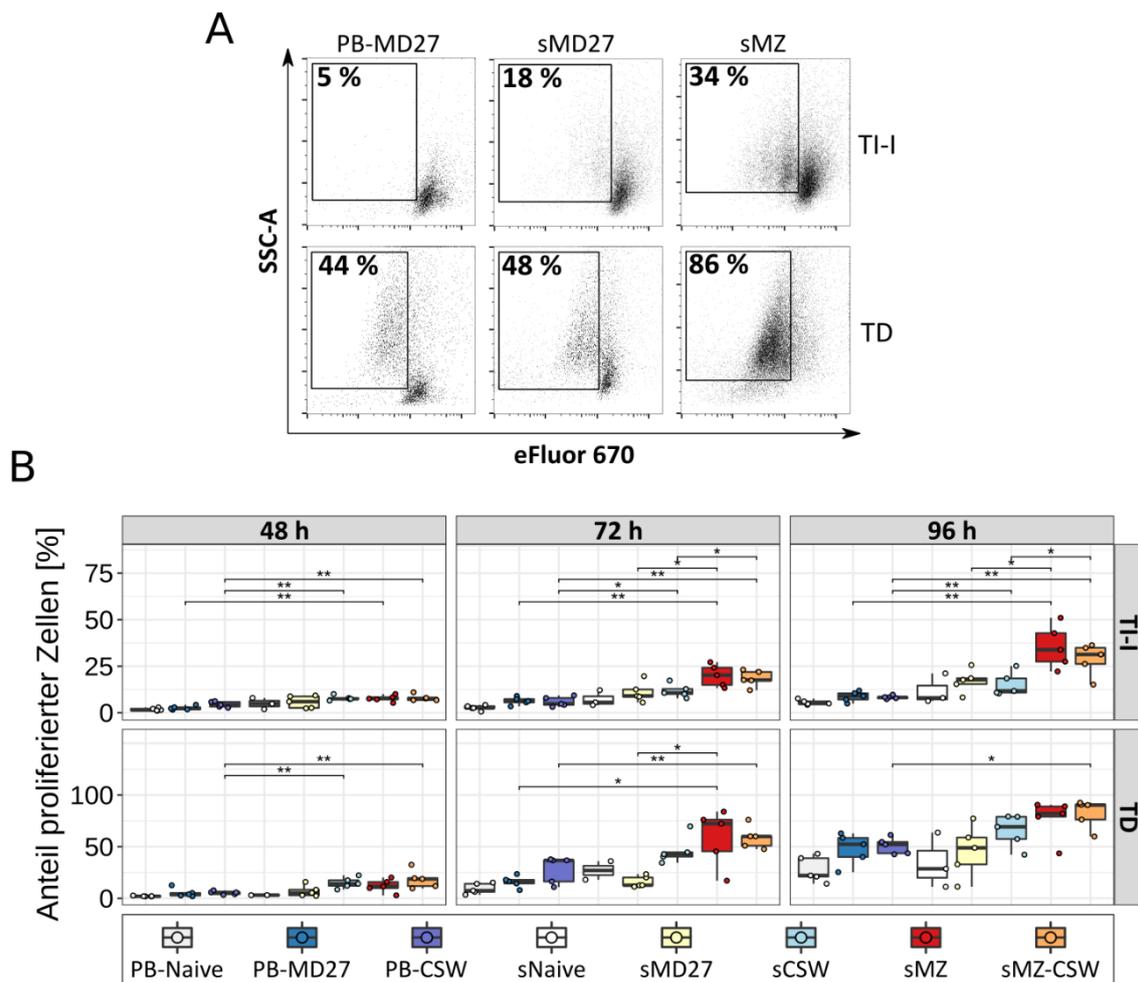


Abb. 8: Zellproliferation nach TD- bzw. TI-I-Stimulation von B-Zell-Populationen aus PB und Milz

(A) Repräsentative Daten für die durchflusszytometrische Messung des Anteils proliferierter PB-MD27, sMD27 und sMZ-B-Zellen nach 96 h *in vitro* Kultur unter TD- oder TI-I-Stimulationsbedingungen. (B) Zusammenfassung gleicher Experimente (n = 2-5) von B-Zell-Populationen aus PB und Milz nach 48 h, 72 h und 96 h *in vitro* Inkubation nach Zugabe von TI-I- bzw. TD-Stimulanzen. Reihenfolge der B-Zell-Populationen in den Einzelbildern: PB-Naive-, PB-MD27-, PB-CSW-, sNaive-, sMD27-, sCSW-, sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen. Statistische Signifikanz nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit *p<0,05; **p<0,005). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Proliferation von sNaive und sMD27-B-Zellen ist durchschnittlich erst nach 96 h in Folge von TD- bzw. TI-I-Stimulation nachweisbar. Die PB-B-Zell Populationen zeigen innerhalb von 96 Stunden nach TI-I-Stimulation keine Anzeichen von Zellteilung, obwohl Anzeichen frühen Reaktionsvermögens nachweisbar sind (Abb. 7). Nach vier Tagen TD-Stimulation *in vitro* ist Zellteilung in Teilen der PB-B-Zell-Populationen detektierbar (Abb. 8). Die erste Zellteilung ist bei CD27⁺ B-Zellen aus PB und Milz ca. 24 h früher detektierbar als bei naiven B-Zellen beider Gewebe.

Eine durchflusszytometrische Unterscheidung anhand ihrer CD21-Expression, Zellsortierung und Charakterisierung splenischer B-Zell-Populationen zeigt, dass vier phänotypisch und funktionell distinkte Gedächtnis-B-Zell-Populationen in der menschlichen Milz existieren. Splenische Gedächtnis-B-Zellen (CD21⁺) unterscheiden sich von ihren Gegenstücken im PB durch unterschiedliche Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen, die mit schnellem Reaktionsvermögen assoziiert sind (siehe Abb. 6 und Abb. 7), einer unterschiedlich langen Latenzzeit bis zur ersten Zellteilung und ihrer Proliferationskapazität (Abb. 8) unter *in vitro* Stimulation. CD21^{high} B-Zell-Populationen proliferieren unter TI-I- und TD-Stimulation nach kürzerer Zeit und mit einem größeren Anteil der B-Zell-Population als CD21⁺ B-Zellen aus PB und Milz.

PB-Gedächtnis-, splenische CD21⁺ Gedächtnis- und sMZ-B-Zell-Populationen unterscheiden sich phänotypisch, exprimieren unterschiedliche Aktivierungsmuster und folgen unterschiedlichen Proliferationsdynamiken unter TI-I- und TD-Stimulation *in vitro*.

3.5 Genexpressionsanalyse humaner B-Zell-Populationen aus PB und Milz

Genexpressionsanalysen sind eine Möglichkeit funktionelle Unterschiede zwischen B-Zell-Populationen zu identifizieren. Zur Bestimmung gemeinsamer und distinkter Eigenschaften von sMZ-, PB-Naive-, PB-MD27- und PB-CSW-B-Zellen aus Proben erwachsener Individuen (19 - 64 Jahre) wurden diese mittels Zellsortierung isoliert, ihre RNA extrahiert und die Transkriptionsprofile mittels RNA-Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt.

Eine *unsupervised* Hauptkomponenten-Analyse (engl. *principal component analysis*, Abk. PCA) zeigt, dass die Replikate bestimmter B-Zell-Populationen jeweils distinkte Gruppen bilden (Abb. 9). Diese distinkten Gruppen unterscheiden sich anhand von ca. 30 % der Gesamtvarianz unter den 10.000 am höchsten differenziell exprimierten Transkripten (Standardabweichung > 0,5) in den ersten beiden Hauptkomponenten (Abb. 9). Die ausreichend hohe Qualität der Datensätze erlaubt sowohl gemeinsame als auch distinkte Expressionsmuster zwischen den untersuchten B-Zell-Populationen verlässlich zu bestimmen. Die erste Hauptkomponente (PC1) differenziert überwiegend die Herkunft der betroffenen B-Zell-Populationen aus PB und Milz. Die zweite Hauptkomponente (PC2) erklärt die Reifung und GC-Erfahrung von PB-Naiven- und PB-CSW-B-Zell-Populationen.

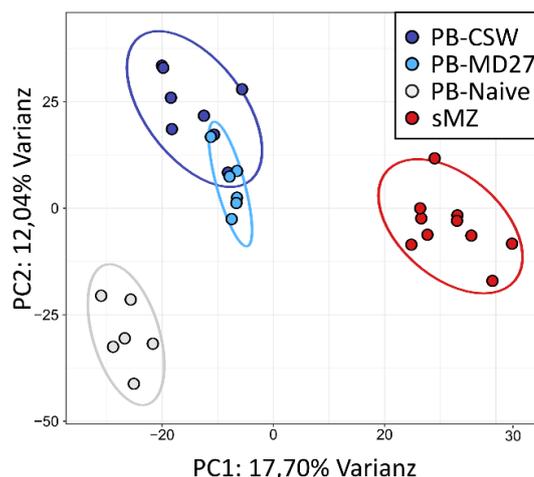


Abb. 9: PCA humaner B-Zell-Populationen aus PB und Milz

Unsupervised PCA von PB-CSW- (lila), PB-MD27- (blau), PB-Naive- (grau) und sMZ-B-Zell-Populationen (rot) über die 10.000 am höchsten differenziell exprimierten Gene (SD > 0,5) zwischen allen Genexpressionsprofilen (sMZ n = 10; PB-CSW n = 8; PB-MD27 n = 6; PB-Naive n = 6). Farbige Kreise um die Populationen geben das 95 %-Konfidenz-Intervall der Verteilung der Datenpunkte an. Konfidenz-Intervalle wurden ausgehend von einer mehrdimensionalen Normalverteilung der Genexpression berechnet.

Anhand dieser beiden Achsen repräsentieren sMZ-B-Zelle eine eigenständige Population, die jedoch im Vergleich zu naiven und IgM-/CSW-B-Zellen eine deutliche Ähnlichkeit zu IgM-Gedächtnis-B-Zellen aufweisen.

Als nächstes wurden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen sMZ-B-Zellen und B-Zell-Populationen aus PB untersucht. Paarweise Vergleiche (*unsupervised, adjusted p-value* < 0,05 und *log2 fold change* > 2) der Genexpression zwischen PB-Naive-, PB-MD27- und PB-CSW-B-Zell-Populationen wurden durchgeführt. Die Genexpressionsmuster in den beteiligten Populationen ist dargestellt (Abb. 10). Diese Analyse bestätigt eine hohe Ähnlichkeit der Replikate der untersuchten B-Zell-Populationen untereinander.

Humane sMZ-B-Zellen exprimieren in der vorliegenden Analyse gemeinsame Expressionsmuster mit PB-MD27-B-Zellen (Abb. 10 A und C). Expressionsmuster, die charakteristisch für PB-CSW-B-Zellen sind, finden sich kaum unter sMZ-B-Zellen (Abb. 10 B). Gemeinsame Gengruppen zwischen sMZ- und PB-Naiven-B-Zellen finden sich aber auch unter PB-MD27-B-Zellen (Abb. 10 B und C). Humane sMZ-B-Zellen sind in ihrer Genexpression untereinander homogen jedoch im Vergleich zu B-Zell-Populationen aus PB distinkt (Abb. 10).

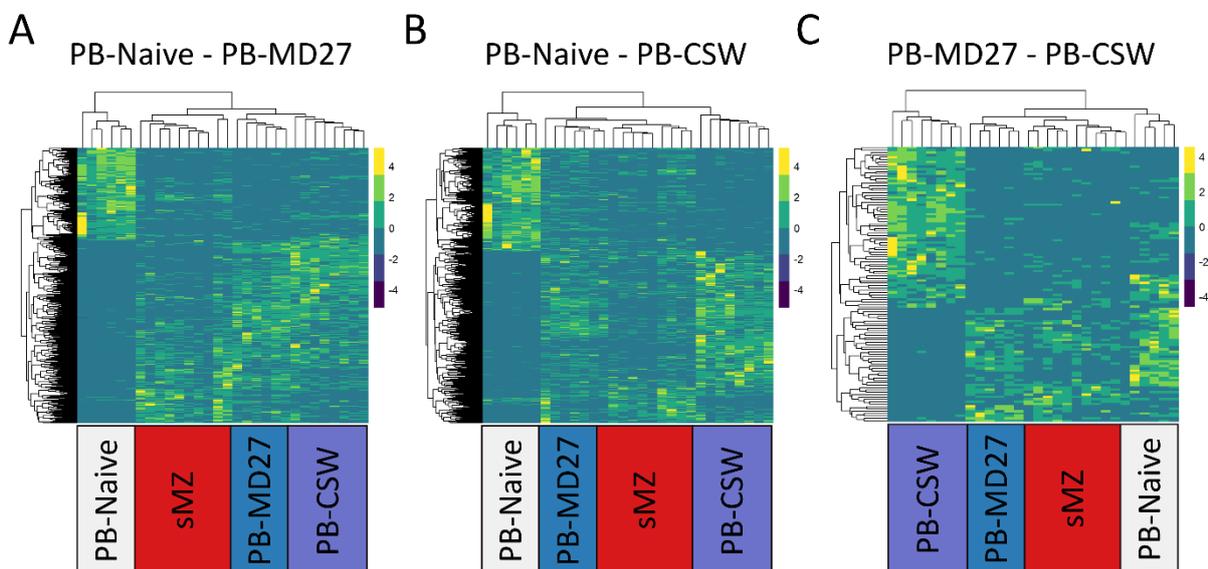


Abb. 10: Hierarchisches Clustering von differenziell exprimierten Genen aus paarweisen Vergleichen zwischen B-Zell-Populationen aus PB

Differenzielle Genexpression wurde anhand von *adjusted p-value* < 0,05 und *log2 fold change* > 2 bestimmt. (A) Differenziell exprimierte Gene (n = 452) zwischen PB-Naive- und PB-MD27-B-Zellen. (B) Differenziell exprimierte Gene (n = 756) zwischen PB-Naive- und PB-CSW-B-Zellen. (C) Differenziell exprimierte Gene (n = 116) zwischen PB-MD27- und PB-CSW-B-Zellen.

Paarweise Vergleiche der Genexpressionsmuster humaner B-Zell-Populationen aus PB zeigen stets eine hohe Ähnlichkeit zwischen sMZ und PB-MD27-B-Zellen (Abb. 10). Solche gemeinsamen Expressionsmuster suggerieren eine gemeinsame Herkunft aus GC-Reaktionen.

Neben gemeinsamen Expressionsmustern sind zum Verständnis der Funktion humaner sMZ-B-Zellen die Expression distinkter Gengruppen wichtig. Eine differentielle Genexpression humaner sMZ-B-Zellen wurde in paarweisen Vergleichen mit B-Zell-Populationen aus PB bestimmt und auf eine Anreicherung in bekannten Gengruppen mittels *gene set enrichment analysis* (Abk. GSEA) untersucht (eine Auswahl statistisch signifikant in Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen an- bzw. abgereicherter Gengruppen ist in Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 im Anhang).

In den paarweisen Vergleichen von sMZ-B-Zellen mit B-Zell-Populationen aus PB zeigt sich eine starke Anreicherung für NOTCH-, WNT-, EGF-, Interleukin-,

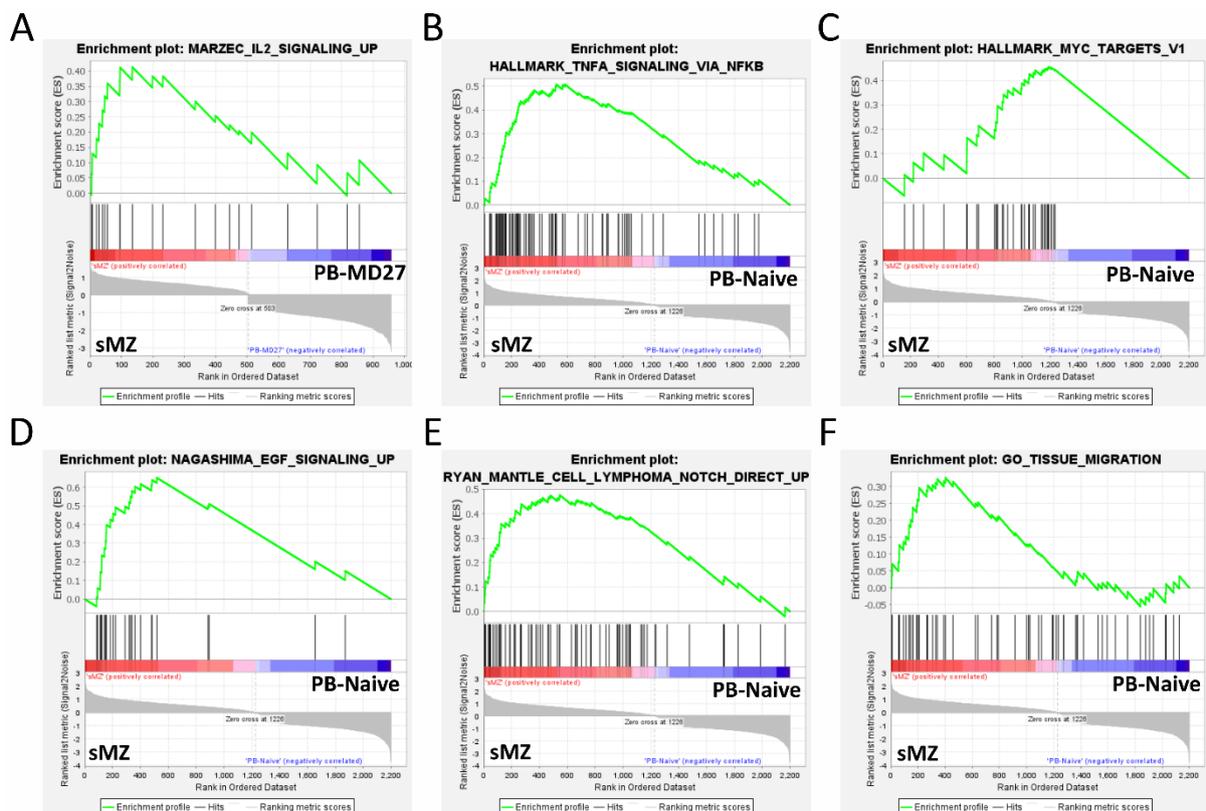


Abb. 11: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen angereicherte Gengruppen

(A) Marzec IL-2 signaling up, (B) Hallmark TNFA signaling via NFKB, (C) Hallmark MYC targets V1, (D) Nagashima EGF signaling up, (E) Ryan mantle cell lymphoma NOTCH direct up, (F) GO tissue migration. Auswahl aus Tabelle 15.

JAK/STAT-, NF- κ B- und MYC-Signalwege bzw. -Zielgene unter sMZ-B-Zellen (Abb. 11, Tabelle 15, Tabelle 16).

Einige Gengruppen sind in den B-Zell-Populationen aus PB angereichert im Vergleich zu sMZ-B-Zellen: Gensignaturen von klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen sowie Regulation des BCR-Signalwegs waren in Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen abgereichert (Abb. 12 und Tabelle 16).

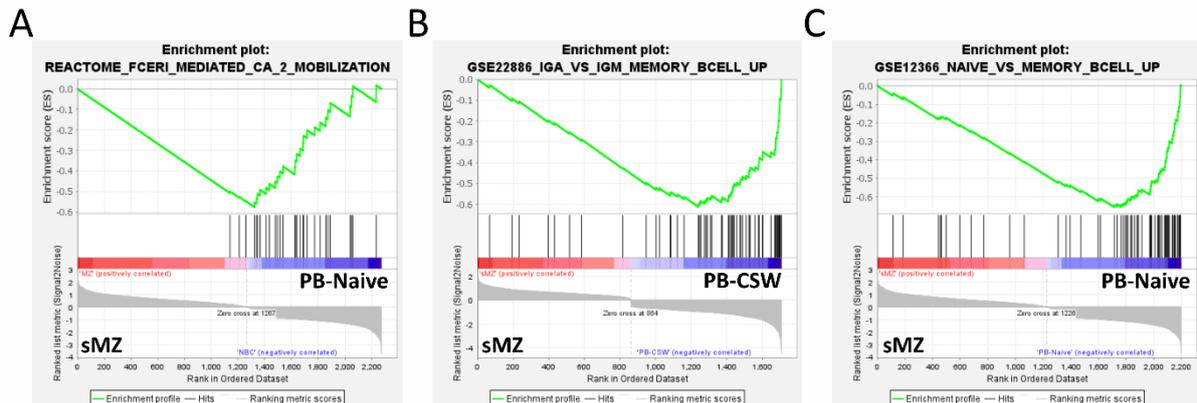


Abb. 12: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen abgereicherte Gengruppen

(A) Reactome FCERI mediated Ca^{2+} mobilization, (B) GSE22886 IgA vs IgM memory B cell up, (C) GSE12366 Naive vs memory B cell up. Auswahl aus Tabelle 16.

Genexpressionsprofile humaner adulter sMZ-B-Zellen sind angereichert für Signaturen, die von Gedächtnis-B-Zellen exprimiert werden, Signaltransduktion via unterschiedlicher Signalwege (trotz Untersuchung ruhender sMZ-B-Zellen) und Zielgene der NOTCH-Signaltransduktion. Humane adulte sMZ-B-Zellen sind mit ca. 430 – 1050 differenziell exprimierten Transkripten (*unsupervised, adjusted p-value* < 0,05 und *log2 fold change* > 2) distinkt von B-Zell-Populationen aus PB. Humane sMZ-B-Zellen haben aber ebenso gewisse Gemeinsamkeiten mit (und am wenigsten differenziell exprimierte Transkripte gegenüber) PB-MD27-B-Zellen, die eine GC-erfahrene Gedächtnis-B-Zell-Population mit hoher Geneigtheit zur Rückkehr ins GC sind (Seifert *et al.*, 2015).

3.6 Hochdurchsatz-Sequenzierung der IGHV-Gene von B-Lymphozyten-Populationen aus gepaarten Milzbiopsaten und PB

Während adaptiver Immunreaktionen entstehen Gedächtnis-B-Zellen und diversifizieren durch die Mechanismen der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels ihre Ig-Gene (Rajewsky, 1996). In der vorliegenden Arbeit erfolgt erstmals die Untersuchung altersabhängiger Änderungen des IGHV-Repertoires in gepaarten PB- und Milz-Gedächtnis-B-Zell-Populationen. Untersuchungen des IGHV-Repertoires können Hinweise auf Reifung und Umfang der Ig-Diversifizierung einzelner B-Zell-Populationen, klonale Verwandtschaft (d.h. Herkunft aus gemeinsamen GC-Reaktionen), Selektion und (Re-)Zirkulation zwischen den anatomischen Kompartimenten und Gedächtnis-B-Zell-Populationen geben (Boyd und Crowe, 2016).

Für eine Untersuchung des humanen IGHV-Repertoires wurden 17 Individuen zwischen 0 und 77 Jahren ausgewählt. IGHV-Repertoire humaner CD21⁺ Gedächtnis- und sMZ-B-Zellen wurden mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt. Hierfür wurden aus PB und Milzgewebe (16 Individuen mit gepaartem PB und Milzbiopsat, zusätzlich ein Individuum ohne PB) CD27⁺ B-Zell-Populationen (siehe Kapitel 3.1) mittels Zellsortierung isoliert. CD27⁻ B-Zellen (darunter v.a. naive und transitionelle B-Zellen) wurden aus der Analyse ausgeschlossen. GC-B-Zellen waren kaum detektierbar und wurden daher ebenfalls aus der Analyse des IGHV-Repertoires ausgeschlossen.

Es wurden pro Individuum und B-Zell-Population durchschnittlich ca. 485.000 B-Zellen aus Milz und ca. 30.000 B-Zellen aus PB isoliert. Insgesamt wurde genomische DNA aus ca. 34 Millionen B-Lymphozyten isoliert und mit dem LymphoTrackDx IGH FR1 assay prozessiert. Identische IGHV-Sequenzen innerhalb einer B-Zell-Population wurden jeweils auf die längste detektierte IGHV-Sequenz zusammengefasst („Kollaps“). Nach einer Qualitätskontrolle und dem Kollaps identischer IGHV-Sequenzen wurden insgesamt 3.660.797 einzigartige IGHV-Sequenzen gewonnen und liegen den nachfolgenden Untersuchungen zugrunde.

Die Mutationsfrequenz von IGHV-Genen kann als Maß für die Intensität einer GC-Erfahrung verwendet werden (Rajewsky, 1996). Die mittlere (Median) IGHV-Mutationsfrequenz in den untersuchten B-Zell-Populationen aus PB und Milz nimmt mit dem Lebensalter zu (Abb. 13).

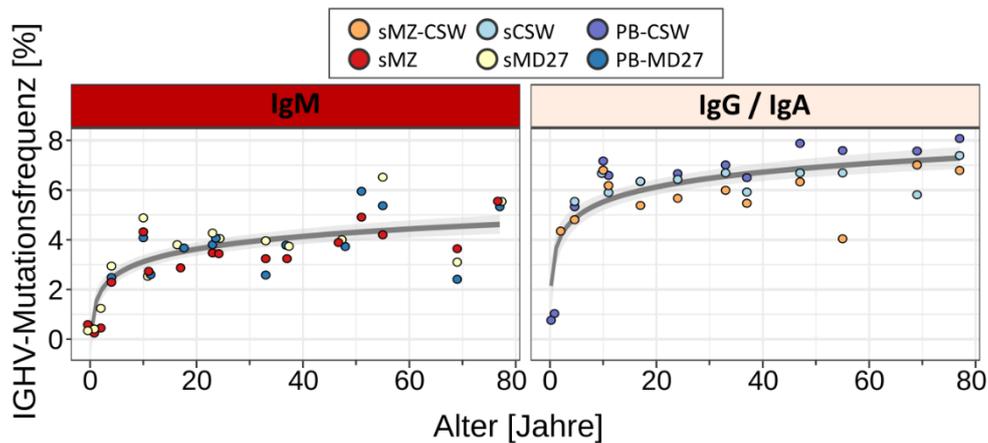


Abb. 13: Mittlere IGHV-Mutationsfrequenz (Median) der B-Zell-Populationen aus Milz und PB von 17 Individuen zwischen 0 und 77 Jahren

Links: IgM-exprimierende PB-MD27-, sMD27- und sMZ-B-Zellen. Rechts: IgG- oder IgA-exprimierende PB-CSW-, sCSW- und sMZ-CSW-B-Zellen. Ausgleichskurven mit 95 % Konfidenzintervall wurden nach LOESS-Verfahren ermittelt. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

In früher Kindheit beträgt die mittlere IGHV-Mutationsfrequenz aller B-Zell-Populationen < 1 %, obwohl die untersuchten B-Zell-Populationen den Gedächtnis-B-Zell-Marker CD27 exprimieren. Bis zu 50 % der IGHV-Sequenzen der Gedächtnis-B-Zellen aus Individuen unter 2 Jahren sind unmutiert. Zwischen 2 und 4 Jahren ist ein sehr starker Anstieg und zwischen 4 und 77 Jahren ein moderater Anstieg der mittleren IGHV-Mutationsfrequenz aller untersuchten B-Zell-Populationen erkennbar.

Bei der Betrachtung der mittleren IGHV-Mutationsfrequenz zwischen B-Zell-Populationen gleichen Isotyps aus demselben Individuum sind häufig nur geringfügige Unterschiede zwischen den zirkulierenden, splenischen CD21⁺ Gedächtnis- und sMZ-B-Zellen erkennbar (Abb. 13, IgG/IgA: PB-CSW-, sCSW- und sMZ-CSW-B-Zellen, bzw. Abb. 13, IgM: PB-MD27-, sMD27- und sMZ-B-Zellen). Ab einem Alter von 4 Jahren sind die IGHV-Sequenzen der klassengewechselten B-Lymphozyten-Populationen altersabhängig zwischen 6 % und 8 % mutiert, die IGHV-Sequenzen der IgM⁺ B-Lymphozyten-Populationen zwischen 3 % und 5 %.

Die IGHV-Sequenzen der CD27⁺ B-Zellen der Kleinkinder dieser Kohorte (0, 1 und 2 Jahre) sind überwiegend unmutiert bis niedrig-frequent (< 1 %) mutiert. Während der Kindheit ist eine deutliche Zunahme mutierter IGHV-Sequenzen und der Mutationslast pro IGHV-Sequenz detektierbar. Diese Zunahme der Mutationsfrequenz deutet auf das Einsetzen von effizienten GC-Reaktionen, Antigen-Selektion und klonaler Expansion im B-Zell-System von Kleinkindern. Zwischen 4 Jahren und 77 Jahren erreicht die mittlere IGHV-Mutationsfrequenz ein Plateau. SMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen zeigen jeweils eine vergleichbare mittlere IGHV-Mutationsfrequenz wie zirkulierende und splenische CD21⁺ Gedächtnis-B-Zellen gleichen Isotyps.

3.7 Umfassende klonale Verwandtschaft zwischen B-Zell-Populationen aus PB und Milz

Zwei wichtige Parameter für die Komplexität und Flexibilität des IGHV-Repertoires sind Klonalität und VDJ-Diversität. Die Identifizierung klonal verwandter IGHV-Sequenzen aus Milz und PB liefert Hinweise auf eine Durchmischung und Rezirkulation von B-Zell-Populationen im Organismus. Die Klonalität, verhält sich reziprok zur VDJ-Diversität eines IGHV-Repertoires.

Die Definition von Klonen erfolgte bei identischem IGHV-Gen und > 97 % Ähnlichkeit der CDRIII-Nukleotidsequenz zwischen IGHV-Sequenzen aus mindestens zwei verschiedenen B-Zell-Populationen desselben Individuums. Mit Hilfe dieser Kriterien wurden Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit von PCR-Amplifikationen unterschieden, die während der Prozessierung von Sequenzierbibliotheken und während Sequenzierreaktionen entstehen können.

Die Klonalität unterliegt in den IGHV-Repertoiren der vorliegenden Kohorte altersabhängigen Änderungen (Abb. 14 A) und kann in drei Phasen eingeteilt werden: In Kleinkindern sind Klone selten (Abb. 14 A, blaue Fläche), d.h. die meisten IGHV-Sequenzen dieser Altersgruppe sind einzigartig (hohe VDJ-Diversität). Die wenigen identifizierten Klone weisen unmutierte bis gering mutierte IGHV-Sequenzen auf (nicht gezeigt, Abb. 13).

Ab der frühen Kindheit (> 4 Jahre) bis zum mittleren Erwachsenenalter (bis ca. 40 Jahren) gehören ca. 70 – 80 % der IGHV-Sequenzen aus PB-B-Zell-Populationen zu Klonen, jedoch gehören nur etwa 20 – 30 % der IGHV-Sequenzen der B-Zell-Populationen aus Milz zu Klonen (Abb. 14). Die VDJ-Diversität des IGHV-Repertoires der Individuen zwischen 4 und 40 Jahren ist im PB niedrig, aber in der Milz relativ hoch (Abb. 15 A). Ab ca. 40 – 50 Jahren gehören nahezu alle (bis zu ca. 90 %) IGHV-Sequenzen aus PB und Milz zu expandierten Klonen (Abb. 14 A). In diesem Altersstadium ist die VDJ-Diversität des IGHV-Repertoires in beiden anatomischen Kompartimenten am niedrigsten (Abb. 15 A). Ab 4 Jahren bis ins hohe Alter sind für nahezu alle Klone mit PB-IGHV-Sequenzen ebenfalls Klonmitglieder innerhalb der Milz detektierbar (Abb. 14 B).

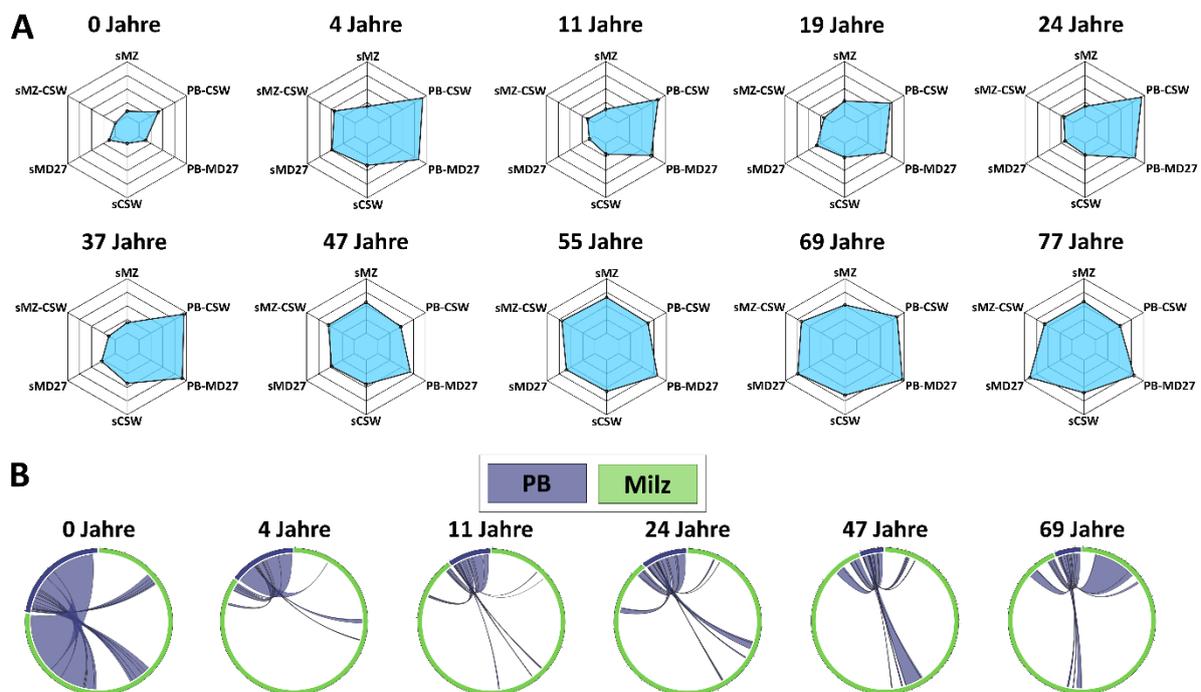


Abb. 14: Anteil klonal expandierter IGHV-Sequenzen aus PB und Milz im Altersverlauf

(A) Relativer Anteil klonal expandierter IGHV-Sequenzen (blaue Fläche) von B-Zell-Populationen aus PB und Milz von 10 Individuen. Der Anteil klonaler Sequenzen wurde für jede B-Zell-Population auf einer eigenen Achse dargestellt, die von innen (0 % klonaler Sequenzen) nach außen (100 % klonaler Sequenzen) in 25 % Schritten eingeteilt ist. (B) Darstellung klonaler IGHV-Sequenzen (blaue Fläche aus A) für sechs Individuen auf dem äußeren Ring. Der Farbcode schlüsselt die IGHV-Sequenzen nach PB- (lila) und Milz-Ursprung (grün) auf. Bänder im inneren des Rings kennzeichnen den Anteil der klonal verwandten IGHV-Sequenzen zwischen PB- und Milz-B-Zellen. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Ab 4 Jahren sind für lediglich $< 5\%$ der B-Zell-Klone aus PB keine Klonmitglieder in der Milz detektierbar. Klone zwischen PB- und Milz-B-Zell-Populationen werden ab dieser Stelle „gemeinsame Klone“ genannt. Eine tiefergehende Untersuchung dieser umfassenden klonalen Verwandtschaft zwischen PB- und Milz-Sequenzen erfolgt in Kapitel 3.8.

Eine höhere Klonalität in älteren Individuen könnte durch die Anwesenheit weniger herausragend großer Klone bedingt sein, was z.B. auf prä-maligne B-Zell-Klone hinweisen würde. Ebenso könnte eine regelmäßige (ggf. polyklonale) Reaktivierung über einen längeren Zeitraum zu einer hohen Klonalität führen. In letztgenanntem Szenario wäre eine hohe klonale Diversität im IGHV-Repertoire von Senioren zu erwarten. Aus der mittleren Klongröße (nach dem Kollaps identischer IGHV-Sequenzen) und der Anzahl der Klone ergibt sich ein Maß für die klonale Diversität des IGHV-Repertoires eines Individuums (Abb. 15 B).

In Individuen unter 20 Jahren weisen Klone im Mittel ca. 2 bis 4 Klonmitglieder auf. In Individuen über 50 Jahren steigt die mittlere Klongröße auf ca. 5 bis 15 Klonmitglieder (Abb. 15 B). Die absolute Anzahl der untersuchten IGHV-Sequenzen ist mit dem Alter konstant, wobei die Anzahl der detektierten Klone mit dem Alter abnimmt (nicht gezeigt). In Senioren ist die Anzahl unterschiedlicher Klone niedriger, jedoch enthalten diese Klone jeweils mehr Mitglieder. Die klonale Diversität nimmt mit dem Alter ab und ist in Senioren am niedrigsten.

Die VDJ-Diversität von B-Zell-Populationen aus PB ist bereits ab 4 Jahren gering. Im Gegensatz dazu ist die VDJ-Diversität splenischer B-Zell-Populationen erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter verringert (Abb. 14). Die Ursache für eine Abnahme der VDJ-Diversität unter splenischen B-Zellen ab ca. 40 Jahren könnte entweder durch einen größeren Anteil splenischer IGHV-Sequenzen in gemeinsamen Klonen (d.h. zwischen PB- und Milz-B-Zell-Populationen) oder durch vermehrte klonale Verwandtschaften zwischen splenischen B-Zell-Populationen erklärt werden. Zur Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten wurde der Anteil gemeinsamer Klone und splenischer Klone bestimmt (Abb. 15 C). Der Anteil gemeinsamer Klone (in Milz und PB) ist mit Ausnahme des jüngsten Individuums über die gesamte Kohorte konstant bei ca. 10-20 % (Abb. 15 C). Eine Erhöhung der Klonalität auf Kosten der VDJ-Diversität ab ca. 40 Jahren ist vor

allem auf einen gesteigerten Anteil splenischer Klone ohne PB-Mitglieder zurückzuführen (Abb. 15 und Abb. 14 D). Der Anteil gemeinsamer Klone und der Anteil von IGHV-Sequenzen zwischen PB und Milz bleiben zwischen Kindheit und hohem Alter stabil (Abb. 15 C und D graue Linien). Eine Abnahme der VDJ-Diversität ab ca. 40 Jahren findet unabhängig vom PB statt (Abb. 15 D). Altersbedingte Veränderungen der VDJ-Diversität und Klonalität von B-Zellen aus PB und Milz sowie innerhalb der Milz wurden schematisch zusammengefasst (Abb. 15 E).

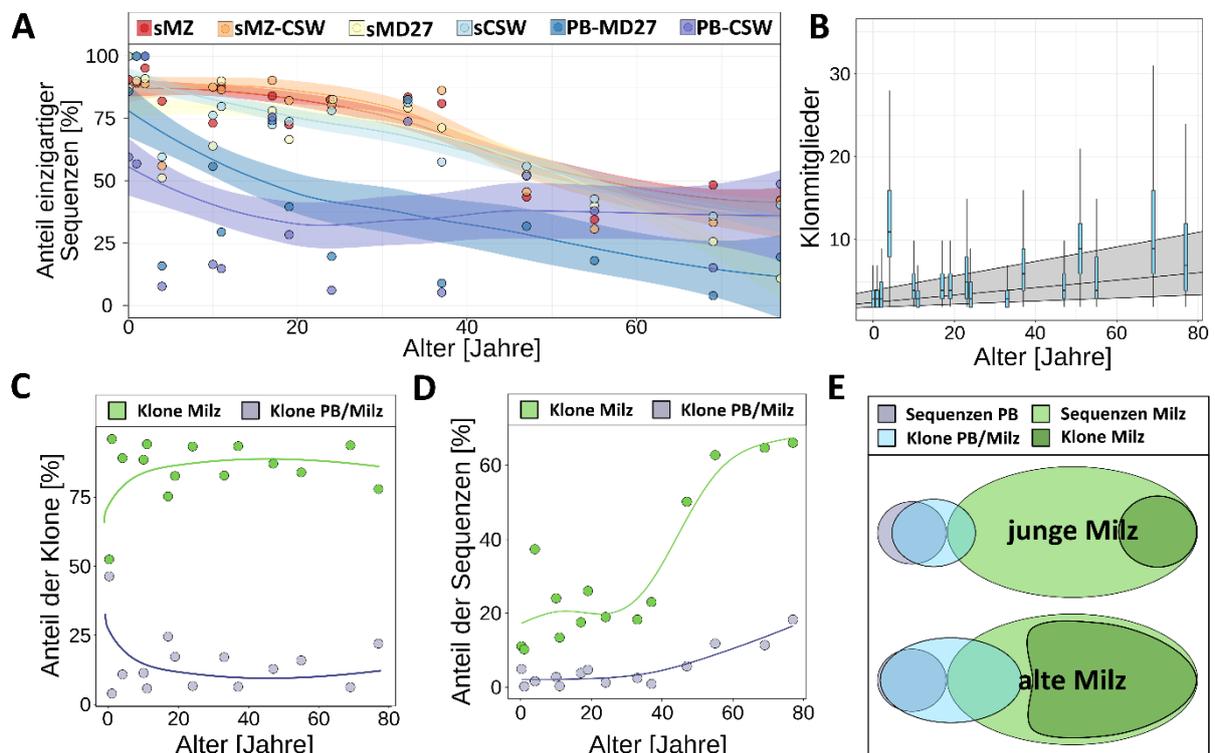


Abb. 15: VDJ-Diversität, Klongröße und Lokalisation expandierter Klone im Altersverlauf

(A) Relativer Anteil einzigartiger IGHV-Sequenzen (d.h. nicht zu expandierten Klonen zugehörig) aufgeschlüsselt nach B-Zell-Populationen aus PB und Milz ($n = 15$). (B) Anzahl von Klonmitgliedern dargestellt als Box-Plot pro Individuum ($n = 17$). Die graue Fläche wurde mittels Quantilenregression berechnet. (C) Anteil von Klonen ohne PB-Mitgliedern (grün) oder mit PB-Mitgliedern (grau; $n = 14$). (D) Anteil splenischer IGHV-Sequenzen, die zu Milz-Klonen (grün) oder zu PB/Milz-Klonen (grau) gehören ($n = 14$). (E) Schematische Darstellung der klonalen Verwandtschaft innerhalb der Milz und zwischen Milz und PB für Individuen unter 40 Jahren (junge Milz) bzw. über 40 Jahren (alte Milz). Die Ausgleichskurven in A, C und D wurden mit dem LOESS-Verfahren berechnet (in A mit 95 % Konfidenzintervall). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Deutlichen Änderungen im IGHV-Repertoire von 17 ausgewählten Individuen sind während der frühen Kindheit und ca. ab dem 4. bis 5. Lebensjahrzehnt erkennbar: Expandierte Klone sind in Kleinkindern kaum detektierbar, ein Hinweis auf hohe VDJ-Diversität kindlicher CD27⁺ B-Zellen. Während der Kindheit ist ein Anstieg der Klonalität unter zirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen detektierbar. Nahezu jeder PB-Klon hat Mitglieder in der Milz. Die Veränderungen des IGHV-Repertoires ca. ab dem 4. bis 5. Lebensjahrzehnt umfassen eine Steigerung der splenischen Klonalität auf Kosten der VDJ-Diversität, eine Abnahme der Anzahl von Klonen und eine Zunahme der mittleren Klongröße. Diese altersabhängigen Veränderungen des IGHV-Repertoires spiegeln die Reifung und Alterung des B-Zell-Immunsystems mit dem Alter wider.

3.8 Klonmitglieder segregieren in separate PB- und Milz-Äste

Die erhebliche klonale Verwandtschaft zwischen Gedächtnis-B-Zellen aus PB und Milz wirft die Frage auf, welche Dynamik dieser zu Grunde liegt, d.h. in welchem Maß die Milz Gedächtnis-B-Zellen in die Peripherie ausschüttet, bzw. Gedächtnis-B-Zellen aus GC-Reaktionen z.B. in Lymphknoten in die Milz einwandern.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden die Verteilungsmuster von IGHV-Sequenzen aus PB bzw. Milz in Ig-Mutationsdendrogrammen (kurz: „Dendrogramme“) geprüft.

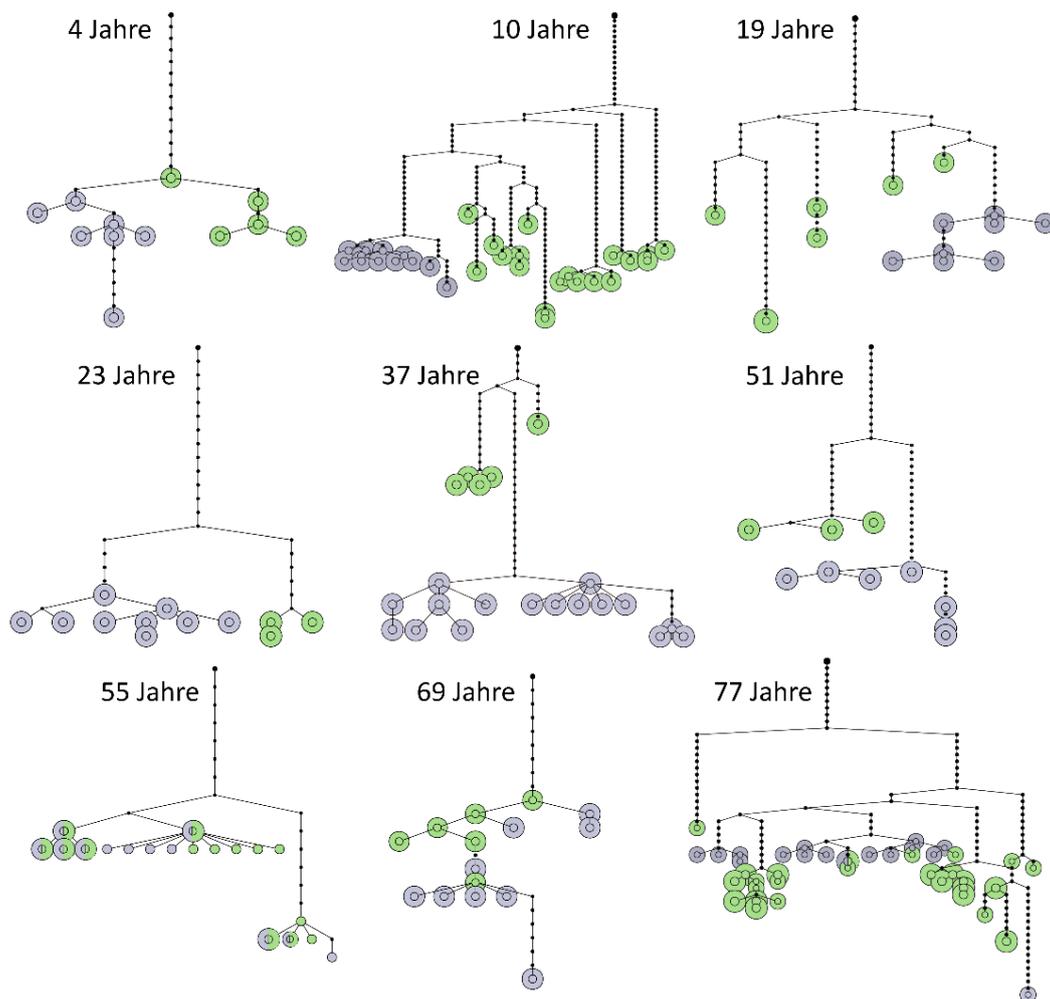


Abb. 16: PB-Klonmitglieder bilden häufig phylogenetisch distinkte Äste.

Repräsentative Dendrogramme zeigen häufige Verteilungsmuster von IGHV-Sequenzen aus PB (grau) und Milz (grün). Sechs Dendrogramme zeigen eine Auftrennung von PB- und Milz-IGHV-Sequenzen in separate Äste (4, 10, 19, 23, 37 und 51 Jahre). Drei Dendrogramme zeigen eine Durchmischung von PB- und Milz-IGHV-Sequenzen (55, 69 und 77 Jahre). Ein großer schwarzer Punkt kennzeichnet die Keimbahnsequenz eines V-Gens. Kleine schwarze Punkte kennzeichnen putative Intermediate. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Ein besonders hervorstechendes Verteilungsmuster zeigt, dass PB-stämmige Klonmitglieder autark auftreten. Das bedeutet alle PB-Klonmitglieder segregieren auf einen separaten Ast im Dendrogramm, der neben ihnen keine Milz-Klonmitglieder enthält („PB-Ast“). Diese distinkten PB-Äste sind häufig Ig-diversifiziert und zeigen sowohl parallele als auch konsekutive IGHV-Mutationen, ein Hinweis auf unabhängige Selektionsmechanismen (Abb. 16).

Eine Quantifizierung der Dendrogramme mit distinktem PB-Ast zeigt, dass mit höherem Alter des Individuums PB-Äste graduell abnehmen: während in Kindern und jungen Erwachsenen (4 – 20 Jahre) noch über 60 % der gemeinsamen Klone distinkte PB-Äste aufweisen, zeigen ältere Individuen (> 50 Jahre) mehrheitlich Klone mit durchmischten PB- und Milz-Klonmitgliedern (Abb. 17 und Abb. 16, 55 – 77 Jahre).

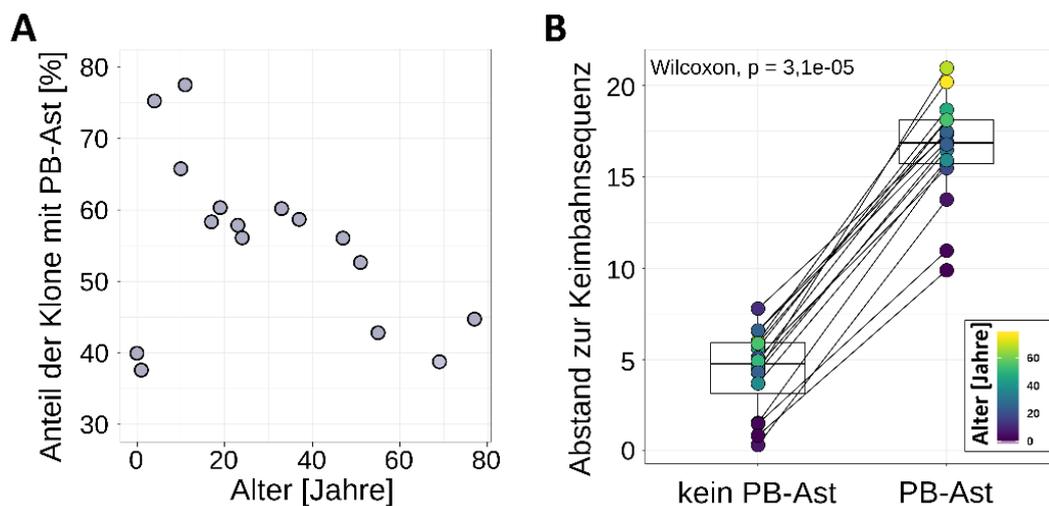


Abb. 17: Anteil von Klonen mit distinktem PB-Ast im Altersverlauf

(A) Relativer Anteil der Dendrogramme mit distinktem PB-Ast unter Klonen mit Mitgliedern aus PB (≥ 5 PB-IGHV-Sequenzen) und Milz ($n = 16$). (B) Relativer Abstand zwischen Keimbahnsequenz und der ersten detektierten IGHV-Sequenz aus PB in gemischten Klonen (kein PB-Ast) oder in Klonen, deren PB- und Milz-Sequenzen aufgetrennt waren (PB-Ast; $n = 16$). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Eine Durchmischung von PB- und Milz-Klonmitgliedern in Dendrogrammen ist ein Indiz für Rezirkulation bzw. anschließende Re-Integration ins Milz-B-Zell-Kompartiment.

Die Anzahl der PB-Klonmitglieder und die starke Auffächerung von PB-Ästen (Abb. 16) könnten Hinweise auf IGHV-Diversifizierung sein, die möglicherweise in Folge von Gedächtnis-B-Zell-Reaktivierung stattgefunden hat. Der relative Abstand einer IGHV-Sequenz zu ihrer Keimbahnsequenz ist ein Maß für GC-Reifung und Selektion der betroffenen B-Zelle (Barak *et al.*, 2008). Klone, deren PB-IGHV-Sequenzen einen separaten Ast im Dendrogramm bilden, haben einen signifikant höheren Abstand zur Keimbahnsequenz ihres IGHV-Gens verglichen mit Klonen, deren PB-Sequenzen keinen separaten Ast im Dendrogramm bilden (Abb. 17 B). Somit haben Klone mit separatem PB-Ast durchschnittlich mehr zurückliegende GC-Erfahrung als Klone mit durchmischten PB- und Milz-Mitgliedern.

Das spezifische, nicht-zufällige Verteilungsmuster der PB-Klonmitglieder in Dendrogrammen weist auf eine systematische Integration peripherer MBC in die Milz, und weiterhin einen intensiven Austausch (Rezirkulieren) zwischen der Milz und dem PB.

3.9 CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen sind stark klonal verwandt

Der Umfang und die Komplexität der klonalen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen B-Zell-Populationen aus PB und Milz wurden untersucht. Die dominanten klonalen Beziehungen sind ab der frühen Kindheit zwischen sMZ und sMD27 sowie sMZ-CSW und sCSW-B-Zell-Populationen detektierbar und beide klonale Beziehungen umfassen altersabhängig ca. 60 % bis 90 % aller Klone eines Individuums (Abb. 18).

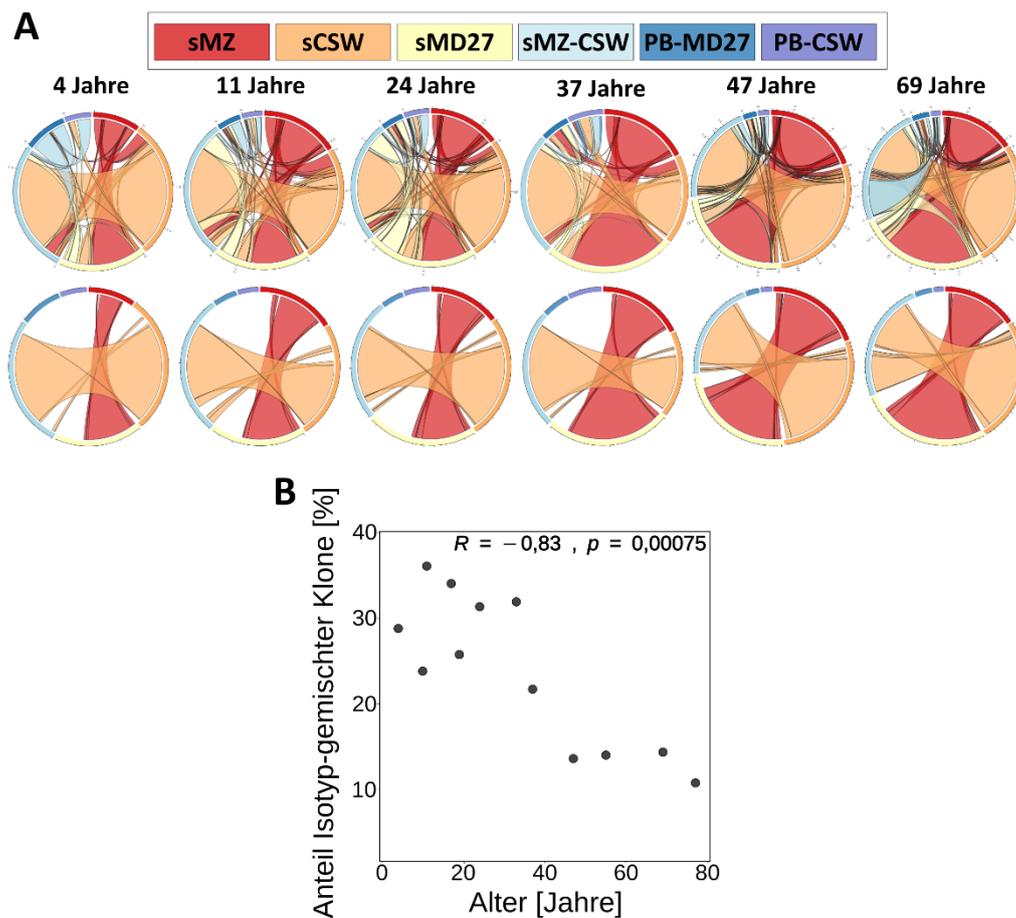


Abb. 18: Klonale Verwandtschaft von IGHV-Sequenzen aufgeschlüsselt nach B-Zell-Populationen aus PB und Milz

(A) Klonale Verwandtschaft von B-Zell-Populationen aus PB und Milz wurde für sechs Individuen dargestellt. Der äußere Ring repräsentiert die Gesamtheit klonaler Sequenzen eines Individuums. B-Zell-Populationen aus PB oder Milz sind farblich gekennzeichnet. Farbige Bänder im Inneren der Ringe kennzeichnen den Anteil klonaler Sequenzen zwischen bestimmten B-Zell-Populationen (z.B. sind Klone mit sMZ-B-Zell-Mitgliedern durch rote Bänder verbunden). Obere Reihe: Darstellung aller klonalen Beziehungen. Untere Reihe: Darstellung klonaler Beziehungen zwischen sMZ und sMD27 (rot) sowie sMZ-CSW und sCSW (orange). (B) Anteil der Klone, die sowohl Mitglieder in IgM- als auch IgG/IgA-exprimierenden B-Zell-Populationen aufweisen (Isotypen-gemischte Klone). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Isotypen-gemischte (IgM⁺ und IgG/IgA⁺ Mitglieder) Klone haben einen Anteil von bis zu 35 % in Kindern und Jugendlichen und der relative Anteil sinkt auf unter 15 % im fortgeschrittenen Erwachsenenalter (> 50 Jahre) und Senioren (Abb. 18 B). In Senioren haben bis zu 90 % der Klone entweder Mitglieder aus IgM⁺ oder IgG/IgA⁺ B-Zell-Populationen. Diese Daten deuten auf eine zunehmende Entkopplung von IgM- und klassengewechselten B-Zell-Klonen mit dem Alter hin.

Der Zusammenhang zwischen Klongröße und dem Anteil klassengewechselter Klonmitglieder unterscheidet sich in Klonen mit PB-Mitgliedern (Milz und Blut) von Klonen ohne detektierte PB-Mitglieder (nur Milz, Abb. 19), ein Indiz für homöostatische Expansion splenischer Klone einerseits und Adaptation der Klone mit PB-Mitgliedern andererseits.

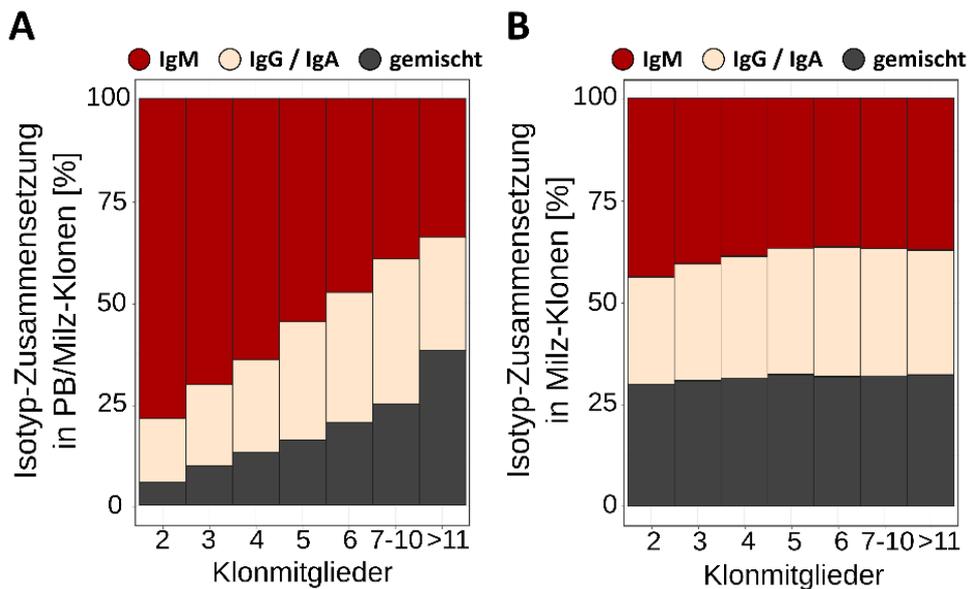


Abb. 19: Isotyp-Zusammensetzung splenischer und gemeinsamer Klone in Abhängigkeit von der Klongröße

Alle Klone wurden unabhängig vom Alter gleichmäßig nach der Anzahl der Klonmitglieder eingeteilt, sodass jede Gruppe die gleiche Anzahl von Klonen umfasst. (A) Größenabhängige Isotyp-Zusammensetzung von Klonen mit PB-Mitgliedern. (B) Größenabhängige Isotyp-Zusammensetzung von Klonen ohne PB-Mitglieder. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Eine altersabhängige Entkopplung splenischer IgM- und klassengewechselter Klone ist erkennbar und es gibt Hinweise auf eine homöostatische Expansion splenischer Klone. In Klonen mit PB-Mitgliedern gibt es Anzeichen von Adaptation, die mit Ig-Diversifizierung und Klassenwechsel einhergehen.

3.10 Humane splenische CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen unterscheiden sich nicht im IGHV-Repertoire

Humane sMZ-B-Zellen unterscheiden sich phänotypisch, funktionell und molekular (Kapitel 3.4 und 3.5) von „konventionellen“ Gedächtnis-B-Zellen (CD21⁺CD27⁺ B-Zellen aus PB und Milz), jedoch sind die Entstehung humaner sMZ-B-Zellen und ihre Verschiedenheit von anderen B-Zell-Populationen umstritten (Kapitel 1.6 und 1.8).

Eine Untersuchung der klonalen Verwandtschaft zwischen CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen zeigt bereits in Kleinkindern eine hohe Durchmischung dieser beiden Kompartimente in mindestens 75 % der Klone und eine altersabhängige Steigerung dieser Durchmischung (Abb. 20 A). Eine Durchmischung tritt sowohl zwischen sMD27- und sMZ-B-Zellen als auch zwischen sCSW- und sMZ-CSW-B-Zell-Populationen auf (Abb. 18 A).

Eine Analyse der Anordnung von CD21⁺ und CD21^{high} Mitgliedern von gemischten Klonen zeigt, dass keine spezifische hierarchische Ordnung zwischen CD21⁺ und CD21^{high} Klonmitgliedern besteht (Abb. 20 C). In fast allen Dendrogrammen wechseln die IGHV-Sequenzen aus CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen entlang der Äste - in einigen Dendrogrammen sogar mehrfach- an konsekutiven Positionen (Abb. 20 B). Es gibt keine erkennbaren Hinweise darauf, dass eine B-Zell-Population früher gebildet wird, bzw. den Ursprung der anderen darstellt, sondern beide Populationen gehen in den Dendrogrammen wechselnd ineinander über.

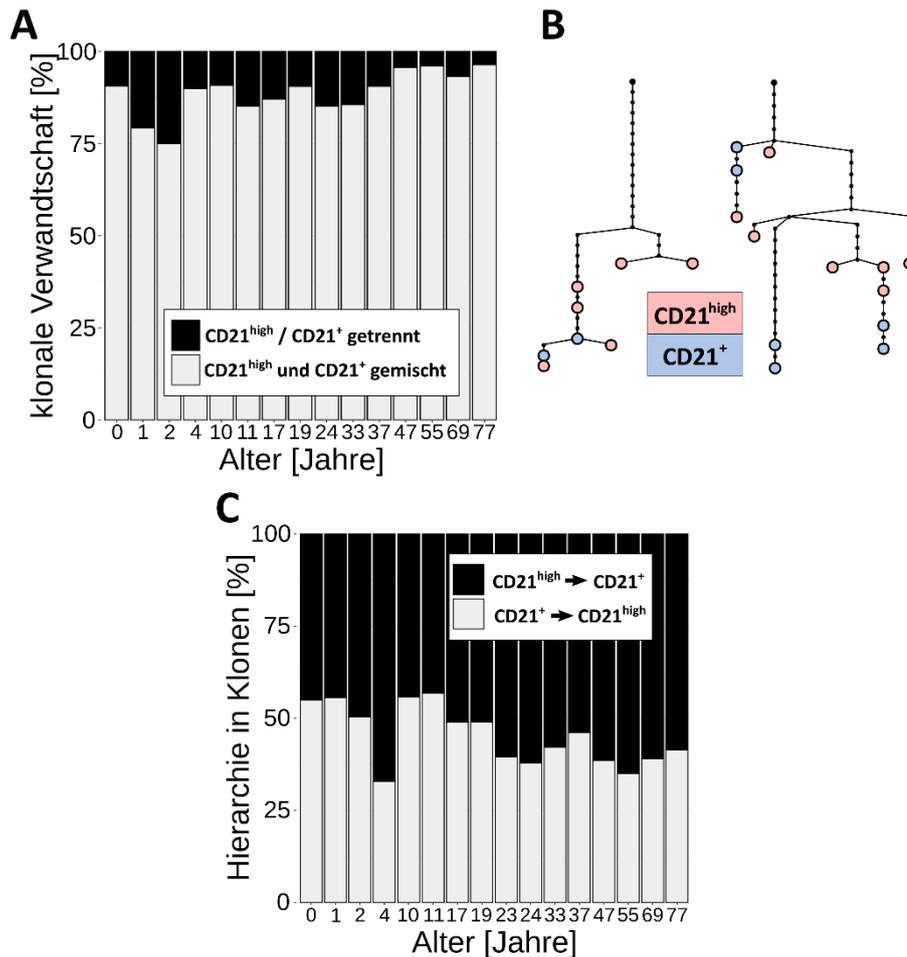


Abb. 20: Durchmischung und Hierarchie von CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen

(A) Anteil von Klonen mit Mitgliedern sowohl aus CD21⁺ als auch aus CD21^{high} B-Zell-Populationen (grau), bzw. mit Mitgliedern ausschließlich aus CD21⁺ oder CD21^{high} B-Zell-Populationen (schwarz; n = 15). (B) Repräsentative Dendrogramme für gemischte CD21⁺ und CD21^{high} Klone. Große farbige Kreise symbolisieren IGHV-Sequenzen aus CD21^{high} (rot) und CD21⁺ B-Zell-Populationen (blau). (C) Untersuchung der Anordnung von CD21⁺ und CD21^{high} Klonmitgliedern in Dendrogrammen. Dargestellt ist der Anteil von Klonen, in denen CD21^{high} (schwarz) bzw. CD21⁺ IGHV-Sequenzen (grau) hierarchisch übergeordnet waren (n = 16). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Weiterhin wurden die Eigenschaften des IGHV-Repertoires von CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen untersucht. Die B-Zell-Populationen sMZ und sMD27 einerseits sowie sMZ-CSW und sCSW andererseits weisen unter Ausschluss klonal expandierter IGHV-Sequenzen jeweils eine starke Ähnlichkeit in ihrer IGHV-Gen-Nutzung auf (Abb. 21 A). Ein unterschiedliches Muster der IGHV-Gen-Nutzung ist erst beim Vergleich zwischen IgM⁺ und IgG/IgA⁺ B-Zell-Populationen in vereinzelt Aspekten sichtbar (Abb. 21 A oben: IgM, unten: IgG/IgA).

Weiterhin weisen die CDRIII-Längenverteilung und die mittlere CDRIII-Länge der humanen splenischen B-Zell-Populationen unter einzigartigen IGHV-Sequenzen (Klone wurden von dieser Analyse ausgeschlossen) sehr geringe Unterschiede auf (Abb. 21 B).

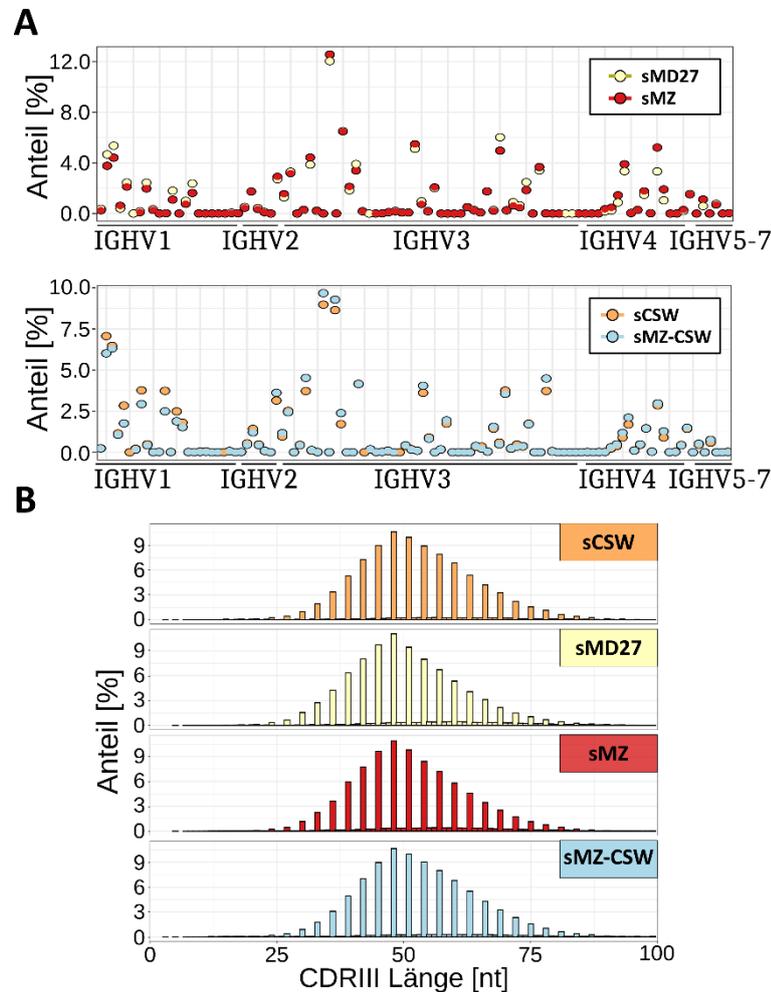


Abb. 21: IGHV-Gen-Nutzung und CDRIII-Längenverteilung splenischer CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen

(A) IGHV-Gen-Nutzung unter einzigartigen IGHV-Sequenzen (keinem Klon zugeordnet). Das obere Feld zeigt die IGHV-Gen-Nutzung von IgM⁺ B-Zell-Populationen sMD27 und sMZ. Das untere Feld zeigt die IGHV-Gen-Nutzung der IgG/IgA⁺ B-Zell-Populationen sCSW und sMZ-CSW. (B) CDRIII-Längenverteilung der splenischen B-Zell-Populationen unter einzigartigen IGHV-Sequenzen (keinem Klon zugeordnet). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

IGHV-Repertoire humaner splenischer CD21⁺ und CD21^{high} B-Zell-Populationen gleichen Isotyps zeigen eine hohe Ähnlichkeit zueinander. Die Ähnlichkeit in der IGHV-Gen-Nutzung und der CDRIII-Längenverteilung ist sowohl bei der Untersuchung klonaler IGHV-Sequenzen (nicht gezeigt) sowie unter „einzigartigen“ IGHV-Sequenzen vorhanden (Abb. 21).

3.11 DLL1-NOTCH2-abhängige Induktion der CD21-Expressionsstärke

Die hohe klonale Verwandtschaft zwischen splenischen CD21⁺ und CD21^{high} B-Zellen ohne spezifische Hierarchie könnte ein Hinweis auf einen Austausch von Zellen zwischen den beiden Kompartimenten sein. Demzufolge könnte ein großer Teil humaner sMZ-B-Zellen aus CD21⁺ Gedächtnis-B-Zellen entstehen. Der NOTCH2-Signalweg ist für die Entstehung muriner und humaner sMZ-B-Zellen wichtig (Descatoire *et al.*, 2014; Roundy *et al.*, 2010). Das *in vitro* Modell für die Entwicklung humaner sMZ-B-Zellen umfasst die Ko-Kultivierung humaner B-Zellen mit der murinen Knochenmarks-Stroma-Zelllinie OP9, die rekombinantes humanes DLL1 exprimiert, den Liganden für NOTCH2 (Descatoire *et al.*, 2014).

Dieses etablierte Modell für Zell-vermittelte DLL1-NOTCH2-Stimulation wurde mit B-Zell-Populationen aus PB und Milz von gesunden Erwachsenen durchgeführt (Abb. 22). Eine Ko-Kultur mit OP9-DLL1 induziert eine höhere Expression von CD21 und CD27 auf einer Mehrheit der B-Zellen der untersuchten B-Zell-Populationen (Abb. 22 A und B). Der Anteil der Zellen, die auf DLL1-Signal mit höherer Expression von CD21 und CD27 reagieren und die Expressionsstärke nach Induktion sind abhängig von der B-Zell-Population: PB-MD27- und PB-Naive-B-Zellen haben den höchsten Anteil an CD21^{high} Zellen und die die höchste Expressionsstärke nach OP9-DLL1-Interaktion (Abb. 22 A und B).

Da das Mikromilieu in der sMZ einen Einfluss auf die Zellantwort haben könnte (Kapitel 1.8), wurden sMD27-B-Zellen im gleichen Modell untersucht. Eine sehr starke und homogene Induktion von CD21 auf sMD27-B-Zellen ist detektierbar, welche die Induktion von CD21 auf PB-MD27-B-Zellen übertrifft (Abb. 22 B) und ungefähr der Expressionsstärke frisch isolierter humaner sMZ-B-Zellen entspricht (Abb. 6, Kapitel 3.4). Ko-Kultivierung mit der Zelllinie OP9-GFP verringert die CD21-Expression von B-Zell-Populationen verglichen mit frisch isolierten, ruhenden B-Zellen (Abb. 22 B).

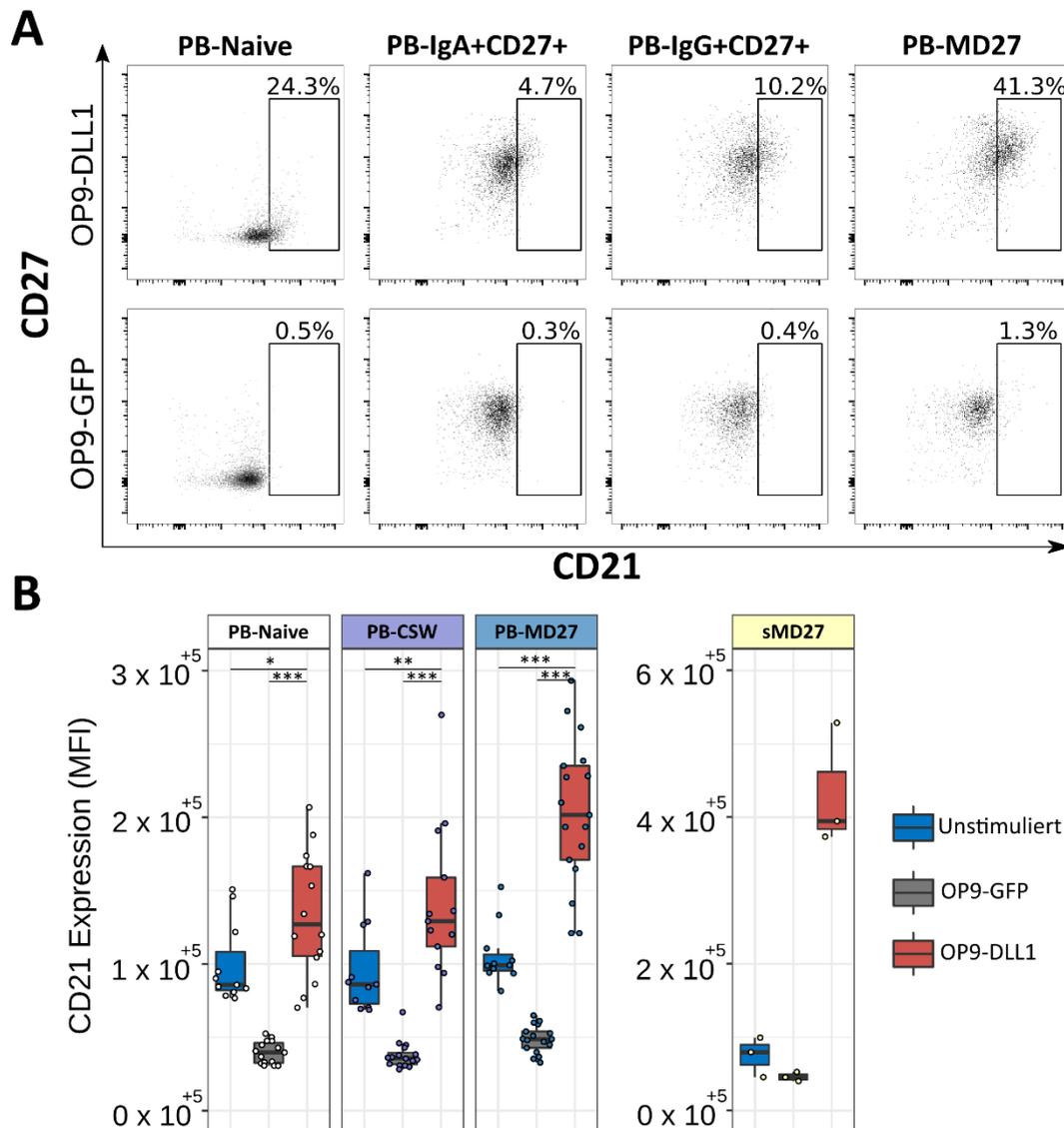


Abb. 22: CD21-Expressionsstärke von B-Zellen nach einer Ko-Kultur mit OP9-DLL1 Zellen

(A) Nach einer Zellsortierung wurden B-Zell-Populationen 5 Tage mit OP9-DLL1- (obere Reihe) bzw. OP9-GFP-Zellen (untere Reihe) ko-kultiviert und die Oberflächenexpression von CD21 und CD27 durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Boxplots der CD21-Expressionsstärke (MFI) humaner PB- bzw. Milz-B-Zell-Populationen nach *in vitro* Ko-Kultur mit OP9-DLL1- (rot), OP9-GFP-Zellen (grau) und unmittelbar nach der Zellsortierung (unstimuliert, blau) ist dargestellt (PB n = 10; sMD27 n = 3). Die y-Achsen für PB (links) und Milz (rechts) sind unterschiedlich skaliert. Statistische Signifikanz nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

B-Zell-Populationen aus PB haben eine unterschiedliche Kapazität auf DLL1-Signale mit Induktion eines CD21^{high} Phänotypen zu reagieren. IgM⁺ Gedächtnis-B-Zellen aus PB und Milz zeigen im gleichen Zeitraum die stärkste Reaktion auf NOTCH2-Stimulation.

3.12 IGHV-Klonotypen sind im kindlichen IGHV-Repertoire angereichert

Die IGHV-Gen-Nutzung unterscheidet sich nicht zwischen splenischen CD21^{high} und CD21⁺ B-Zell-Populationen (Abb. 21). Aus Mausmodellen ist bekannt, dass die Signalstärke des BCR eine Rolle bei der Festlegung des B-Zell-Schicksals haben kann (Graf *et al.*, 2019; Pillai und Cariappa, 2009). Der BCR bindet Antigen über die CDR der schweren und leichten Ketten, von denen die CDRIII erst durch V(D)J-Umlagerung gebildet werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit IGHV-Klonotypen untersucht, definiert über inter-individuell ≥ 95 % konservierte Aminosäuresequenzen der CDRIII der schweren Ig-Kette bei identischem IGHV-Gen. IGHV-Klonotypen können möglicherweise Hinweise auf eine vergleichbare Infektions- und Impfgeschichte unterschiedlicher Individuen geben (Kapitel 3.13).

Es wurden bis zu 1550 IGHV-Klonotypen (unter durchschnittlich ca. 200.000 IGHV-Sequenzen pro Individuum) pro Kompartiment (PB MBC, Milz MBC und sMZ) und Individuum identifiziert (Abb. 23 A). In Kleinkindern unter 2 Jahren sind die absolute Anzahl von IGHV-Klonotypen (Abb. 23 A) und der relative Anteil von IGHV-Klonotypen unter den jeweiligen IGHV-Sequenzen eines Individuums am höchsten (Abb. 23 B). Ab 4 Jahren sind IGHV-Klonotypen stark vermindert verglichen mit Kleinkindern. Zwischen ca. 4 und 40 Jahren sind Anzahl und relativer Anteil von IGHV-Klonotypen auf einem stabilen, niedrigen Niveau. Eine schleichende Abnahme von IGHV-Klonotypen ist ab ca. 50 Jahren zu beobachten.

IGHV-Klonotypen, die in B-Zellen aus humanem Nabelschnurblut abundant, aber in adulten naiven B-Zellen aus PB nicht nachweisbar sind, werden „UCB-Klonotypen“ (engl. *umbilical cord blood*, Abk. UCB) genannt (Budeus *et al.*, 2020). Ein Großteil der IGHV-Klonotypen in Kleinkindern ist Ig-unmutiert und weitestgehend unter IGHV-Sequenzen von Kleinkindern detektierbar (Abb. 23). UCB-Klonotypen sind unter den IGHV-Klonotypen von Kleinkindern, jedoch kaum in Erwachsenen detektierbar (Abb. 23 B, neonatale-B-Zell-Klonotypen). Kindliche splenische IGHV-Klonotypen, die nicht zu den UCB-Klonotypen gehören, sind in älteren Individuen ebenfalls nicht nachweisbar. IGHV-Klonotypen aus Milz-B-Zell-Populationen ab ca. 4 Jahren sind überwiegend Ig-mutiert, was auf GC-Erfahrung hinweist (Abb. 23 B, Gedächtnis-B-Zell-Klonotypen).

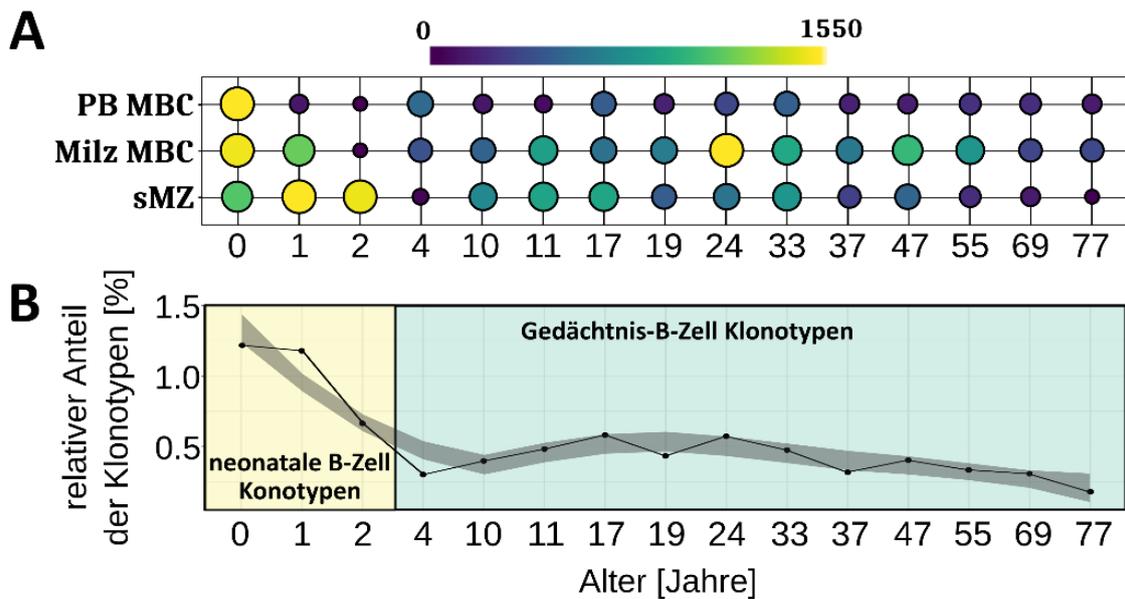


Abb. 23: Anzahl und relativer Anteil von IGHV-Klonotypen im Altersverlauf

(A) Absolute Anzahl von IGHV-Klonotypen pro Gruppe (PB MBC, Milz MBC und sMZ) und Individuum ist farbig codiert (Skala oberhalb). PB MBC (PB-MD27 und PB-CSW), Milz MBC (sMD27 und sCSW) und sMZ (sMZ und sMZ-CSW) B-Zellen ($n = 15$). (B) Die absolute Anzahl der klonotypischen IGHV-Sequenzen aller Gruppen normalisiert auf die jeweilige Gesamtzahl der IGHV-Sequenzen eines Individuums. Unmutierte IGHV-Klonotypen sowie bekannte UCB-Klonotypen (Budeus et al 2020) werden als „neonatale B-Zell-Klonotypen“ bezeichnet (gelber Hintergrund). Mutierte IGHV-Klonotypen werden als „Gedächtnis-B-Zell Klonotypen“ bezeichnet (grüner Hintergrund; $n = 15$). ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

Eine Häufung von IGHV-Klonotypen im sMZ-Kompartiment findet sich vor allem im IGHV-Repertoire von Kleinkindern. Die Spezifität des BCR könnte zur Selektion kindlicher sMZ-B-Zellen beitragen.

3.13 Antigen-spezifische Klonotypen im IGHV-Repertoire humaner B-Zellen aus PB und Milz

Ig-Repertoire Analysen sind dazu geeignet, die Klonalität und Diversität von B-Zellen zu untersuchen. Eine Untersuchung der Antigen-Spezifität ist indirekt möglich, durch den Vergleich mit publizierten Ig-Sequenzen, deren Spezifität untersucht wurde.

Ca. 2300 Antigen-spezifische V(D)J-Sequenzen wurden durch die Literaturrecherche in einer Datenbank erfasst (Kapitel 2.2.15). Die erstellte Datenbank umfasst IGHV-Sequenzen von Antikörpern, die spezifisch sind für Tetanus Toxoid und Pathogene wie *Streptococcus pneumoniae*, HiB, Influenzaviren und Rotaviren.

Diese Datenbank mit Antigen-spezifischen IGHV-Klonotypen wurde mit den IGHV-Repertoiren von siebzehn Individuen abgeglichen (Abb. 24 A). Klonotypen gegen HiB (25 erfasste Klonotypen), Tetanus Toxoid (156 erfasste Klonotypen) und *S. pneumoniae* (328 erfasste Klonotypen) finden sich im IGHV-Repertoire aller untersuchten Individuen.

Die Häufigkeit von IGHV-Klonotypen gegen Rotaviren (201 erfasste Klonotypen) ist in Kleinkindern höher als in Individuen > 4 Jahre. Klonotypen gegen Influenzaviren (812 erfasste Klonotypen) sind in Kleinkindern kaum detektierbar, jedoch ab 4 Jahren bis zu Senioren durchgehend detektierbar (Abb. 24 A).

Die Diversität von IGHV-Klonotypen ist das Produkt aus der Anzahl Antigen-spezifischer VDJ-Umlagerungen und der Anzahl Antigen-spezifischer Klone. Die Diversität wurde anschließend auf die individuelle Anzahl der IGHV-Sequenzen normalisiert (Diversitätsfaktor, Abb. 24 B). Der Diversitätsfaktor schwankt erheblich, jedoch sind zwei Tendenzen erkennbar: Klonotypen gegen Tetanus Toxoid, Rotaviren und HiB sind in Kleinkindern sehr divers, Klonotypen gegen Influenzaviren und *S. pneumoniae* hingegen sind weniger divers verglichen mit erwachsenen Individuen. In den ältesten Individuen (51 – 77 Jahre) ist die Diversität von IGHV-Klonotypen gegen alle untersuchten Antigene im Mittel am niedrigsten (Abb. 24 B).

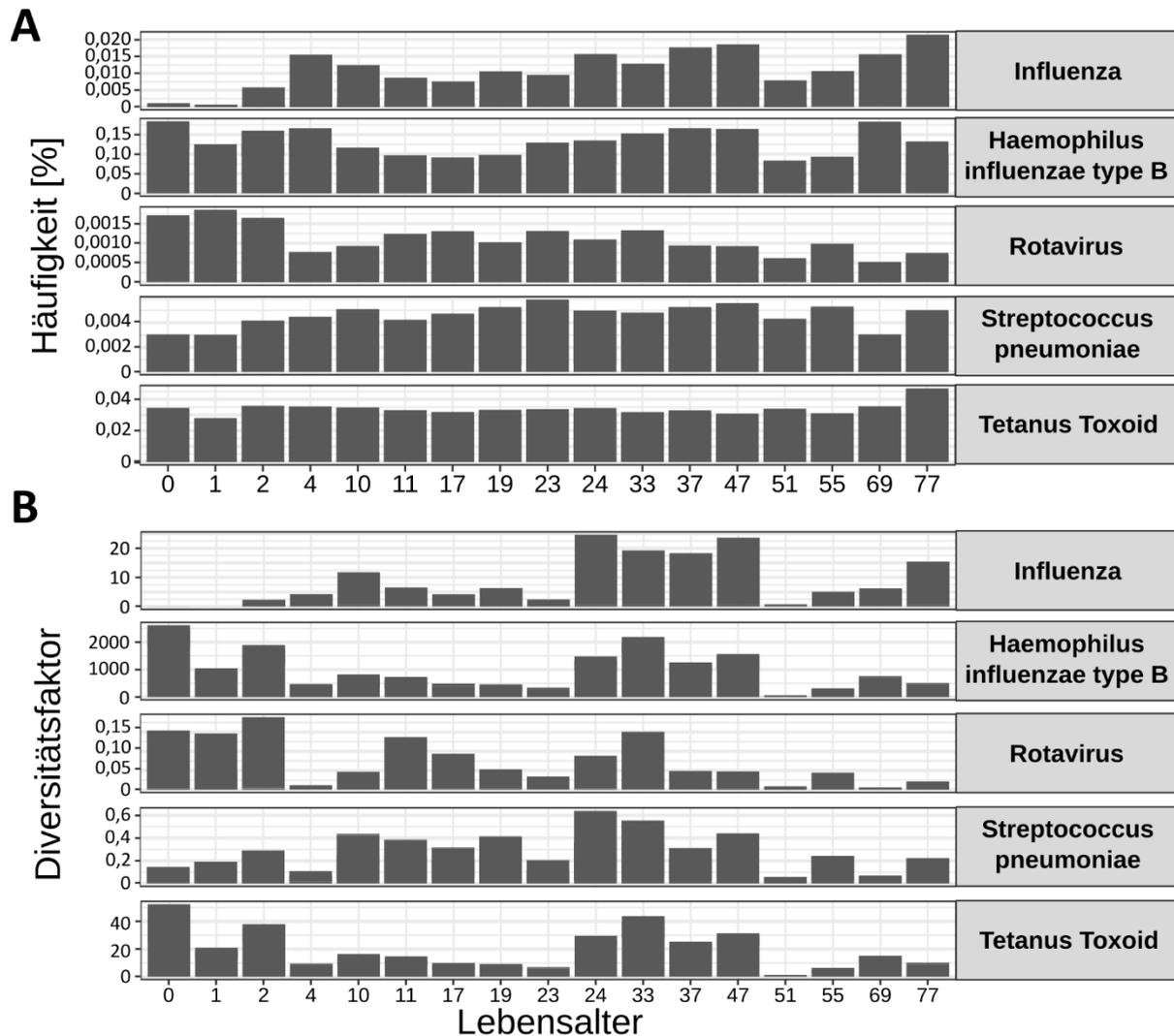


Abb. 24: Häufigkeit und Diversität Antigen-spezifischer Klonotypen im Altersverlauf

(A) Bestimmung der Anzahl von Übereinstimmungen zwischen VDJ-Genumlagerungen humaner PB- und Milz-B-Zellen ($n = 17$) mit einer Datenbank von IGHV-CDRIII-Sequenzen mit bekannter Antigen-Spezifität. Es wurde bis zu ein Aminosäureaustausch in der CDRIII bei gleichem IGHV-Gen toleriert. Die Anzahl der Übereinstimmungen wurde auf die individuelle Anzahl der IGHV-Sequenzen normalisiert. Dargestellt ist die relative Häufigkeit Antigen-spezifischer IGHV-CDRIII-Sequenzen für Influenzaviren, HiB, Rotaviren, *S. pneumoniae* und Tetanus Toxoid. (B) Die Anzahl der Übereinstimmungen aus A) wurde multipliziert mit der Anzahl Antigen-spezifischer Klone und normalisiert auf die individuelle Anzahl der IGHV-Sequenzen (Diversitätsfaktor). Dargestellt ist der Diversitätsfaktor von IGHV-CDRIII-Sequenzen mit bekannter Antigen-spezifität für Influenzaviren, HiB, Rotaviren, *S. pneumoniae* und Tetanus Toxoid.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass es möglich ist anhand von V(D)J-Sequenzen mit bekannter Antigen-spezifität die Häufigkeit und Diversität von Gedächtnis-B-Zellen im Ig-Repertoire zu quantifizieren.

3.14 Einzel-Zell-basierte Genexpressionsanalyse humaner sMZ-B-Zellen

Die Zusammensetzung humaner sMZ-B-Zellen ist ungeklärt. Es gibt Hinweise auf GC-erfahrene und -unerfahrene Subpopulationen, und es ist nicht geklärt, ob in Kleinkindern – wie in Mausmodellen – eine distinkte sMZ-B-Zell-Population mit besonderen Eigenschaften existiert und sich daher die Zusammensetzung der sMZ-B-Zellen mit dem Alter ändert (Garraud *et al.*, 2012; Hendricks *et al.*, 2018).

Zur Klärung dieser Frage wurden Einzel-Zell-basierte Analysen der Genexpression an 5 Individuen zwischen 3 und 48 Jahren durchgeführt. Splenische B-Zellen wurden über Zellsortierung einzeln isoliert und anschließend die relative Genexpression von 96 ausgewählten Genen in jeweils 96 Zellen mittels Fluidigm 96.96 *dynamic array* durchgeführt. Für jedes Individuum wurden 96 splenische B-Zellen untersucht (88 sMZ-, 4 sMD27-, 4 sNaive-B-Zellen). Die Auswahl der untersuchten Gene basierte auf einer statistisch signifikant differentiellen Expression zwischen sMZ- und PB-Naiven-, PB-MD27- sowie PB-CSW-B-Zellen (Tabelle 4, Kapitel 3.5).

Die ausgewählten Gene kodieren u.a. Zelloberflächenmoleküle, die typischerweise von GC-erfahrenen Gedächtnis-B-Lymphozyten bzw. naiven B-Zell-Populationen exprimiert werden, NOTCH2 und Zielgene der NOTCH2-Signaltransduktion sowie Moleküle, deren Expression durch humane sMZ-B-Zellen beschrieben ist (Descatoire *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2004). Die Expression dieser 96 Gene wurde mittels Multiplex-Einzel-Zell-qRT-PCR (Fluidigm 96.96 *dynamic arrays*) bestimmt und bioinformatisch ausgewertet.

Die Varianz der Genexpression über alle Altersstadien hinweg führt zu keiner Auftrennung in distinkte Gruppen (Abb. 25 A). Eine solche Auftrennung ist erst bei der Untersuchung von *supervised* zusammengestellten Genlisten erkennbar, zum Beispiel bei einer Analyse von Transkripten, deren Expression von sMZ-B-Zellen beschrieben ist (Abb. 25 B) (Descatoire *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2004).

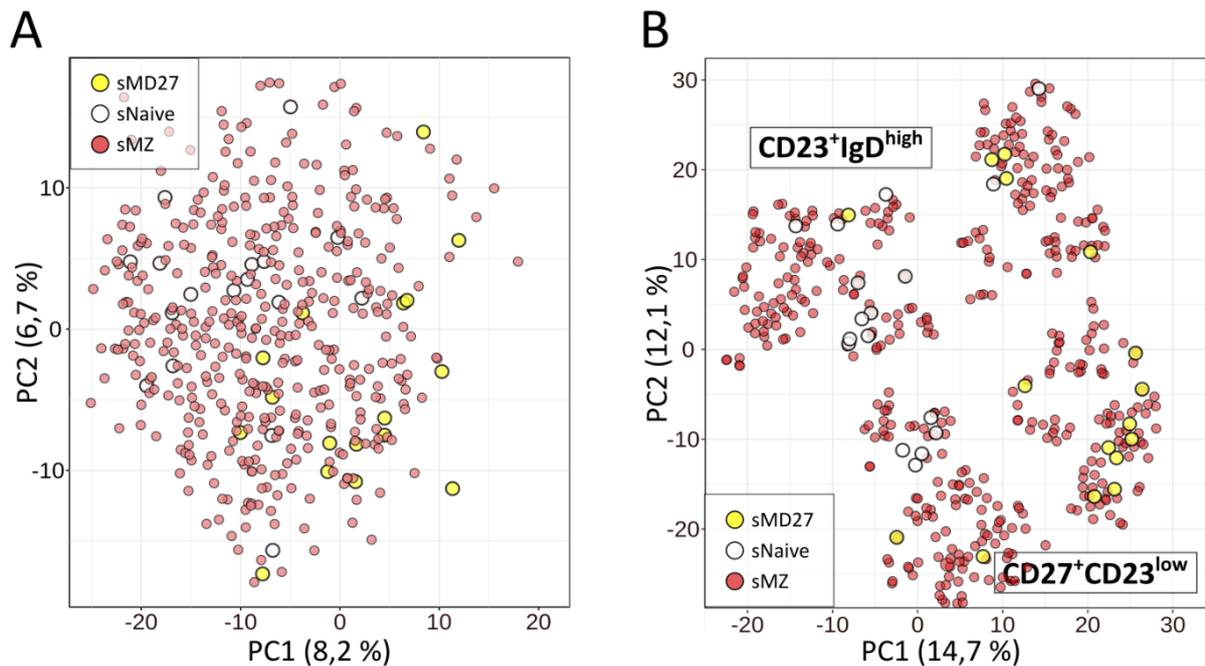


Abb. 25 PCA der Genexpression humaner sMZ-B-Zellen

(A) *Unsupervised* PCA über alle Zellen und Transkripte von fünf Individuen. (B) *Supervised* PCA über Transkripte, deren Expression von sMZ-B-Zellen beschrieben wurde ($p < 0,01$) (Descatoire *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2004).

Eine Auftrennung in distinkte Gruppen ist auch anhand des Lebensalters der Individuen möglich (Abb. 26 A). In jedem Altersstadium sind alle sMZ-B-Zell-Subpopulationen vertreten, jedoch der relative Anteil dieser Subpopulationen änderte sich. Eine Untersuchung der Varianz der Transkripte, die für Zelloberflächenmoleküle kodieren zeigt eine hohe Varianz und zahlreiche Subpopulationen (Abb. 25 B).

Die Analyse humaner sMZ-B-Zellen mittels Fluidigm 96.96 *dynamic arrays* weist darauf hin, dass sMZ-B-Zellen mehrere Subpopulationen enthalten, die sich anhand ihrer Genexpression unterscheiden lassen (Abb. 25 B und Abb. 26 B).

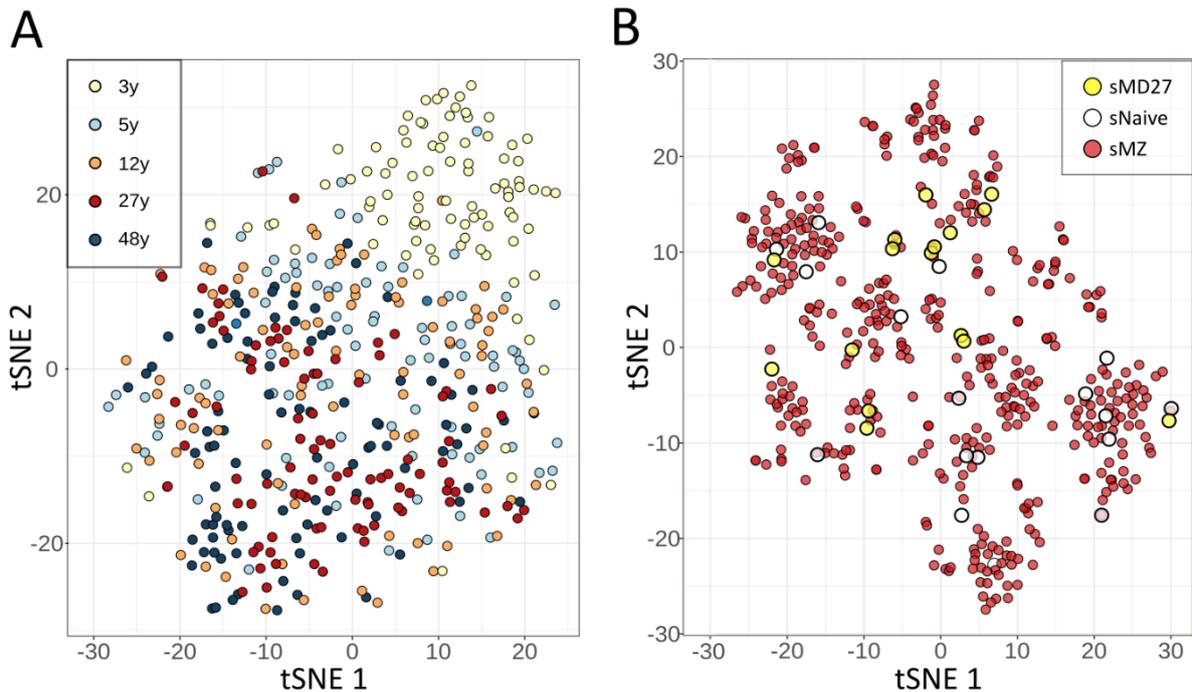


Abb. 26 Altersabhängigkeit und Heterogenität der Genexpression humaner sMZ-B-Zellen

(A) Altersabhängige tSNE-Analyse der Genexpression humaner sMZ-B-Zellen von fünf Individuen. (B) Darstellung der Heterogenität humaner sMZ-B-Zellen nach tSNE-Analyse von ausgewählten Genen, die für Zelloberflächenmoleküle kodieren.

Eine durchflusszytometrische Validierung dieser Daten wurde durchgeführt. Unter den 96 ausgewählten Genen wurden die Gene bestimmt, die am stärksten zu einer Auftrennung in sMZ-B-Zell-Subpopulationen beitragen und für Zelloberflächenmoleküle kodieren. Diese Gene umfassen u.a. CD1c, CD5, CD21, CD27, CD29, CD50 und CD184.

Die Expression von CD27 trennt unter $CD21^{\text{high}}$ B-Zellen distinkte Subpopulationen (Abb. 27 A und B). Die Häufigkeit der $CD27^-$ sMZ-B-Zell-Subpopulation ändert sich mit dem Alter (Abb. 27 A und B) $CD27^-$ sMZ-B-Zellen sind in Neugeborenen und Kleinkindern am häufigsten und nehmen in Senioren auf ca. 1 % der splenischen B-Zellen ab (Abb. 27 C).

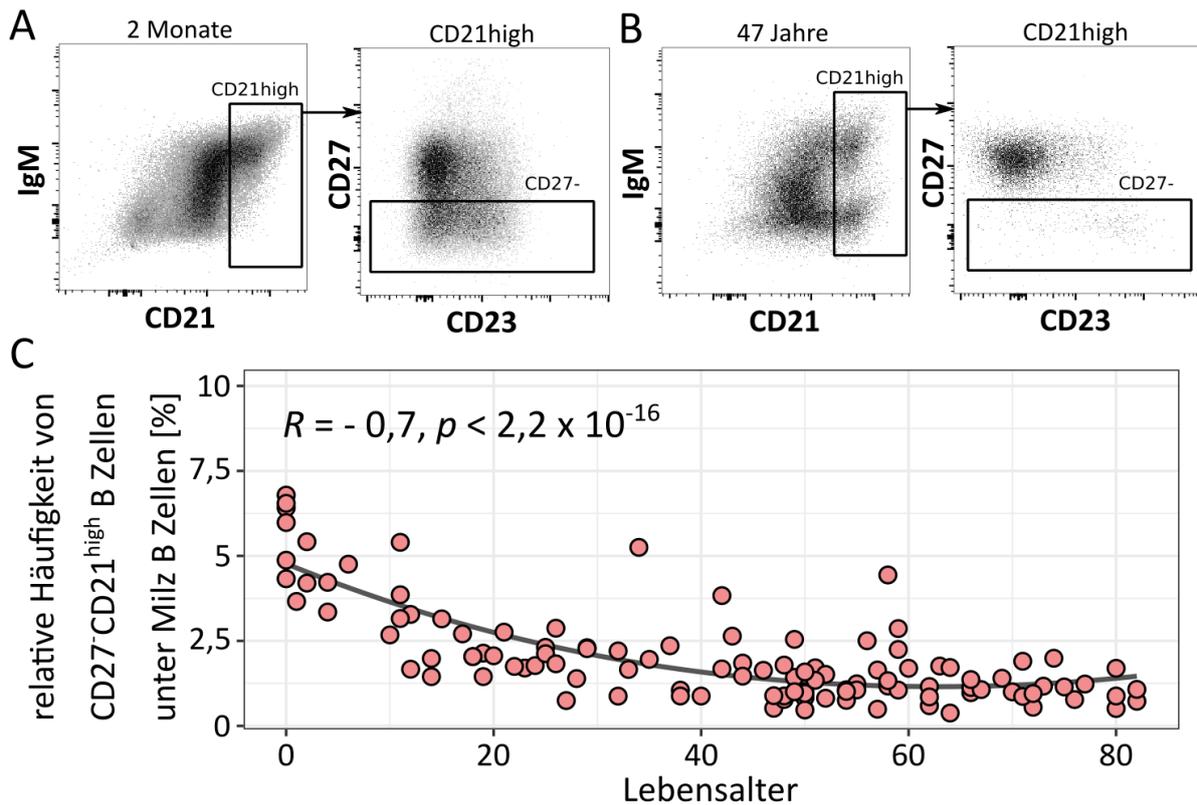


Abb. 27: Durchflusszytometrische Bestimmung des altersabhängigen Anteils CD27-negativer sMZ-B-Zellen

Oberflächenexpression von CD23 und CD27 unter CD21^{high} B-Zellen aus der Milz eines zwei Monate (A) bzw. 47 Jahre (B) alten Individuums. (C) Relativer Anteil der CD27-CD21^{high} B-Zellen unter splenischen B-Zellen im Altersverlauf (n = 104).

Die Untersuchung von sMZ-B-Zellen mittels Einzel-Zell-Analyse deutet auf eine heterogene Zusammensetzung. Jedoch ist die Fluidigm 96.96 Technologie auf die Untersuchung von 96 Transkripten in 96 Zellen beschränkt. Eine vertiefte Analyse humaner sMZ-B-Zell-Subpopulationen ist durch umfangreichere Einzelzell-Genexpressions-Analysen möglich.

Die 10X-Chromium-Technologie (10X Genomics) basiert auf einer Kopplung von molekularen Barcodes (engl. *unique molecular identifiers*) an die zelluläre RNA durch eine Fusion von Zellen mit Gel-Emulsions-Beads. Dadurch ist eine parallele Prozessierung der Einzelzell-Information über mehrere Tausend Zellen eines Individuums möglich. Mit diesem Verfahren wurden angereicherte splenische B-Zellen aus vier ausgewählten Individuen zwischen 0 und 80 Jahren analysiert, und ihre Genexpression, V(D)J-Umlagerung (schwere und leichte Ig-Ketten) sowie die Expression von sieben ausgewählten Zelloberflächenmolekülen (CITE-Seq) bestimmt.

Für diesen Ansatz wurden sMZ-B-Zellen mittels Zellsortierung auf ca. 60-70 % angereichert. Der Einbezug weiterer B-Zell-Populationen ist notwendig für eine relative Einordnung der zu erwartenden sMZ-B-Zell-Subpopulationen in ein bekanntes Umfeld von naiven und GC-erfahrenen B-Zell-Populationen (*analytical root*). Die Oberflächenexpression von anti-CD5, anti-CD23, anti-CD27, anti-CD29, anti-CD35, anti-CD38 und anti-CD49d Antikörpern wurde parallel mittels CITE-Seq bestimmt (TotalSeq-Antikörper von BioLegend).

Die Einzel-Zell-Informationen (VDJ-Umlagerung, Genexpressionsprofil und CITE-Seq) für alle Zellen der vier untersuchten Individuen wurden mit Hilfe einer *Uniform Manifold Approximation and Projection* (Abk. UMAP) auf globale Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Varianz untersucht (Abb. 28 A). Bei Integration aller Datensätze in eine einzelne UMAP-Berechnung (jedoch separat voneinander präsentiert) ist erkennbar, dass die Zusammensetzung der B-Zellen in den beiden Kleinkindern (Abb. 28 A, 8 Monate und 2 Jahre), aber auch in den beiden erwachsenen Individuen (Abb. 28 A, 22 und 80 Jahre) jeweils ähnliche Muster teilen (Abb. 28 A). Die Schwerpunkte der splenischen B-Zellen aus Erwachsenen und Kleinkindern nehmen verschiedene Bereiche in der UMAP ein und es ist eine Auftrennung in distinkte Gruppen (d.h. Zell-Populationen, deren Mitglieder sehr ähnliche Eigenschaften haben) erkennbar. Die relative Häufigkeit der Isotypen-Nutzung im Altersverlauf deckt sich mit den durchflusszytometrischen Daten (nicht gezeigt) der vier untersuchten Individuen (Abb. 28 B). Klassengewechselte B-Zellen sind unter splenischen B-Zellen der beiden Kleinkinder sehr selten (Abb. 28 B, 8 Monate und 2 Jahre) und nehmen im Altersverlauf zu (Abb. 28 B, 22 und 80 Jahre).

Bei der Betrachtung der Gesamtvarianz des Datensatzes, der auf der 10X-Chromium-Technologie basiert, sind bereits Unterscheidungen in Subpopulationen möglich. Im Unterschied zu den Einzel-Zell-Experimenten mittels Fluidigm 96.96 *dynamic arrays* sind mit 10X-Chromium durchschnittlich ca. 2000 Transkripte pro Zelle erfasst worden. Eine hohe Qualität der Daten erlaubt Analysen der B-Zell-Zusammensetzung verlässlich durchzuführen.

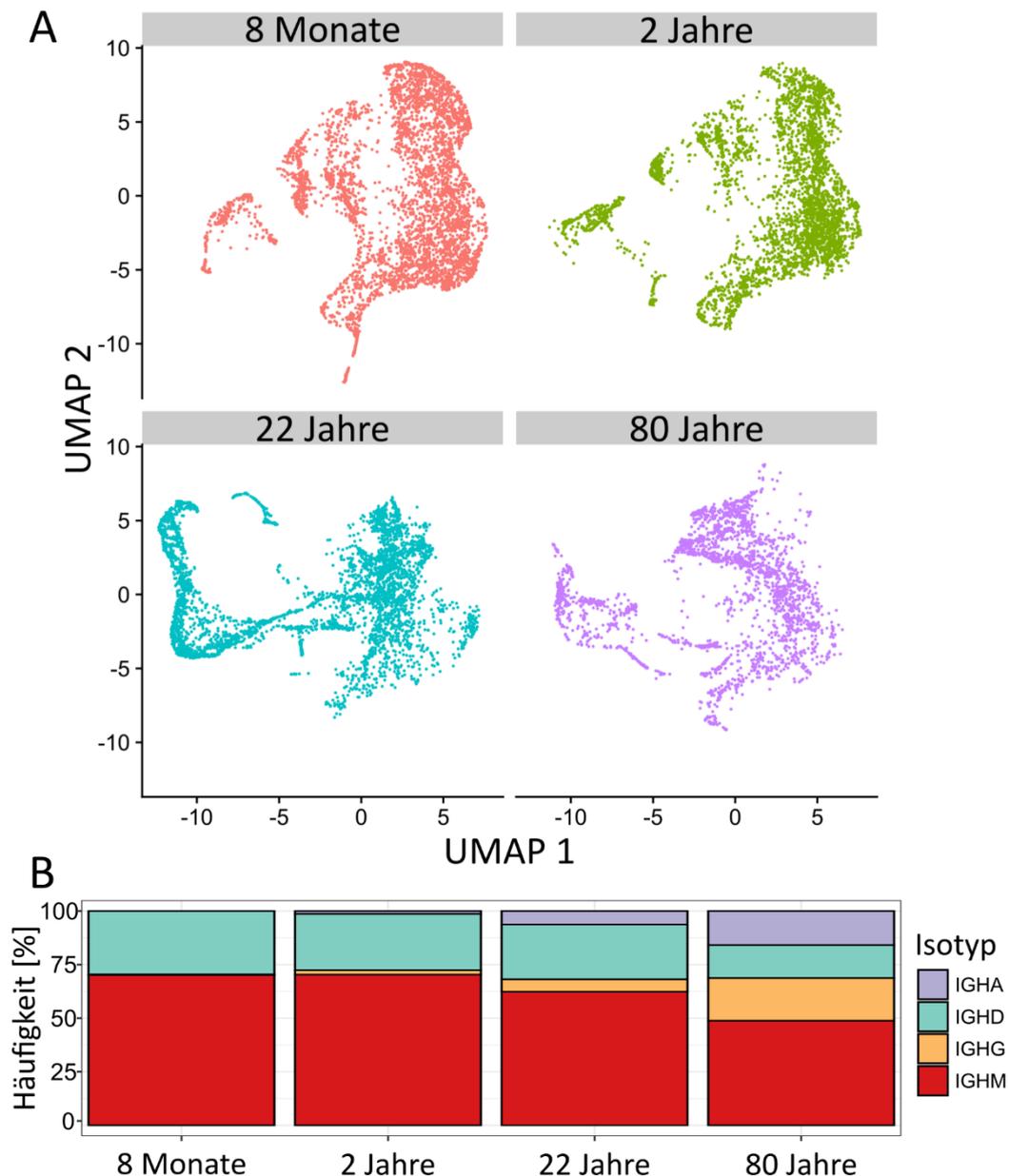


Abb. 28: UMAP der globalen Gemeinsamkeiten und Unterschiede humaner splenischer B-Zellen im Altersverlauf

(A) Die Einzel-Zell-Informationen von vier Individuen (8 Monate sowie 2, 22 und 80 Jahre) aus jeweils drei verschiedenen Sequenzierbibliotheken (RNA-Seq, VDJ-Seq und CITE-Seq) wurden mittels UMAP auf globale Gemeinsamkeiten und Unterschiede untersucht. Alle Datensätze der vier Individuen wurden in eine UMAP-Berechnung integriert und anschließend die vier Individuen separat dargestellt. (B) Der relative Anteil der Isotypen unter Zellen mit eindeutiger Isotyp-Information basierend auf der VDJ-Sequenzierung ist dargestellt.

Die Zusammensetzung splenischer B-Zellen wurde mittels R Programm-erweiterung Seurat *unsupervised* untersucht. Die Seurat-basierte Analyse der B-Zell-Zusammensetzung erlaubt die Auftrennung in zehn unterschiedliche Gruppen (Abb. 29 A). Sieben Gruppen sind unter B-Zellen aus mindestens zwei,

meistens vier untersuchten Individuen detektierbar (Abb. 29 B). Die Gruppen 0, 3, 4 und 6 sind unter B-Zellen aus Kleinkindern (< 2 Jahre) häufig, in Erwachsenen jedoch stark reduziert. Die Gruppen 1, 2 und 5 sind bereits in Kleinkindern detektierbar und ihr Anteil nimmt im Altersverlauf weiter zu. Die Gruppen 7 und 9 sind ausschließlich unter B-Zellen des 22-Jährigen und die Gruppe 8 unter B-

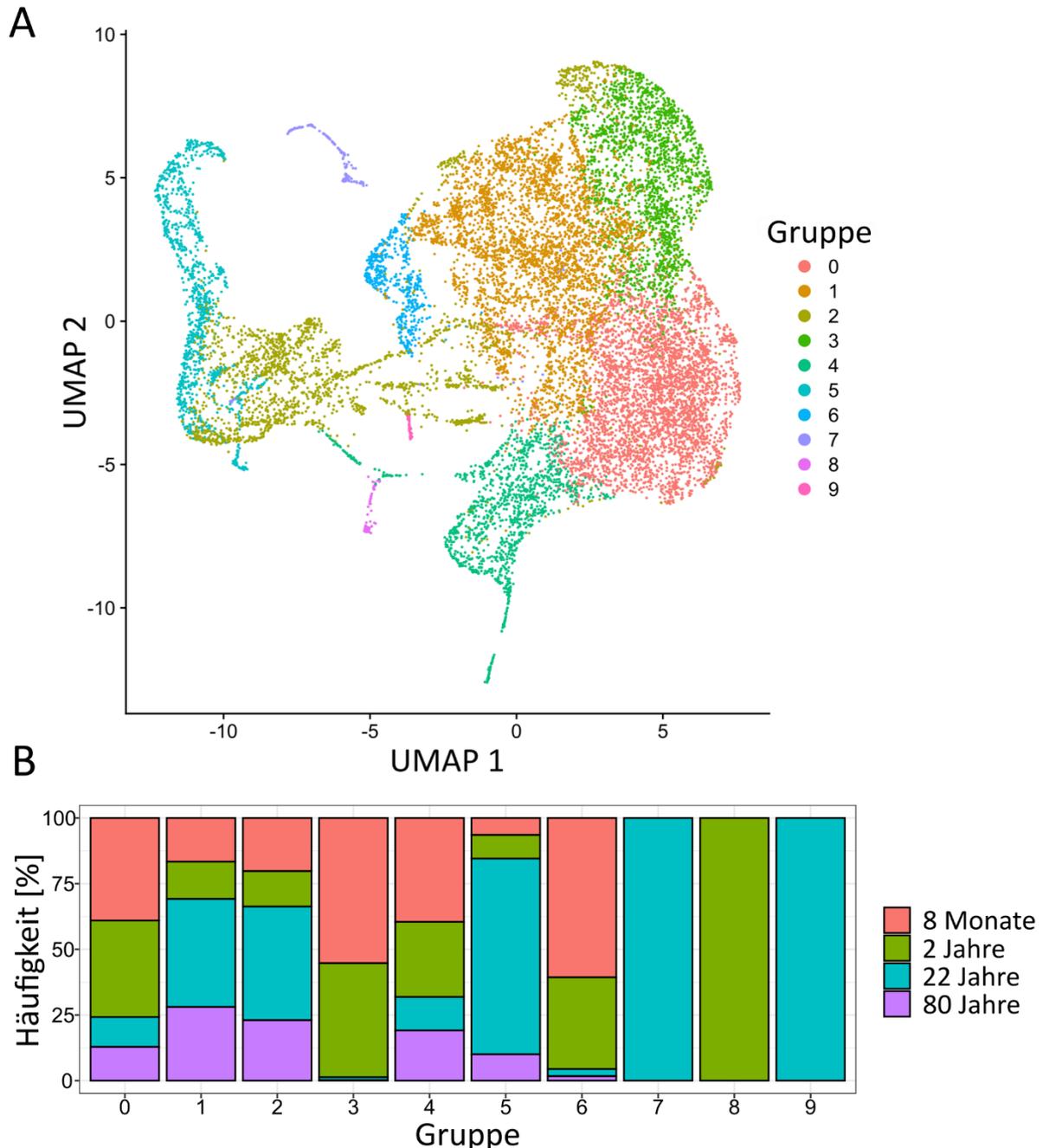


Abb. 29: Auftrennung splenischer B-Zellen in molekular distinkte Gruppen

(A) *Unsupervised* Untersuchung der Zusammensetzung humaner splenischer B-Zellen wurden mittels R Programmiererweiterung Seurat durchgeführt. Die Unterteilung in Gruppen basiert auf der relativen Ähnlichkeit bestimmter Zellen zueinander. (B) Der relative Anteil der Zellen aus den vier Individuen (8 Monate sowie 2, 22 und 80 Jahre) in den Gruppen aus A ist dargestellt.

Zellen des 2-Jährigen detektierbar (Abb. 29 B). Eine Untersuchung der Oberflächenexpression von CD27 und CD38 (CITE-Seq) zeigte, dass Gruppe 8 einen Immunphänotypen exprimiert, der auf Plasmazellen hindeutet (nicht gezeigt) (Ellyard *et al.*, 2005). Die Gruppen 7 und 9 exprimieren Gengruppen, die mit der S- oder G2/M-Phase des Zellzyklus assoziiert sind (nicht gezeigt). Die relative Häufigkeit dieser zehn Gruppen im Altersverlauf unterstützt eine altersabhängige Entwicklung der Zusammensetzung splenischer B-Zellen (Kapitel 3.3, Abb. 26 und Abb. 27).

Humane sMZ-B-Zellen sind keine homogene Population, sondern viele Hinweise deuten auf ein heterogenes Gemisch aus mehreren distinkten Subpopulationen. Die relative Häufigkeit splenischer B-Zell-(Sub-)Populationen ändert sich mit dem Alter. Kindliche splenische B-Zell-Subpopulationen sind in älteren Individuen stark vermindert. Altersabhängige Änderungen der splenischen B-Zell-Zusammensetzung könnten eine Rolle bei der Anfälligkeit für bestimmte Infektionen spielen. Eine weitere Analyse, z.B. eine Untersuchung auf Expressionsmuster bekannter B-Zell-Populationen (naive-, IgM-Gedächtnis-, IgG-Gedächtnis-, sMZ-B-Zellen etc.) steht derzeit noch aus.

3.15 Die Milz-Architektur unterliegt altersabhängigen Veränderungen

Die Morbidität und Mortalität durch Infektionskrankheiten ändert sich altersabhängig. Humane sMZ-B-Zellen sind bereits in Kleinkindern nachweisbar (Kapitel 3.2 und 3.3). Eine funktionelle Einschränkung humaner sMZ-B-Zellen könnte durch unzureichende Reifung der sMZ-Architektur oder falsche Lokalisation der B-Zellen hervorgerufen werden.

Die korrekte Positionierung humaner sMZ-B-Zellen in der splenischen Mikroanatomie in der Grenzregion zwischen B-Zell-Follikel und Roter Pulpa wurde histologisch untersucht. Es wurden konsekutive Gefrierschnitte von frisch-gefrorenen Milz-Gewebskeilen hergestellt. Die Expression von CD21, CD27 und IgM wurde mittels Immunfärbung und Nachweises durch HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in unterschiedlichen Altersstadien untersucht.

In der Milz-Histologie erwachsener Individuen sind CD27⁺ und IgM⁺ Zellen in follikulären Grenzregionen konsekutiver Gefrierschnitte detektierbar (Abb. 30). Eine starke CD21-Expression in B-Zell-Follikeln markiert follikuläre DZ, wohingegen eine schwächere CD21-Expression in der Randzone des B-Zell-Follikels humane sMZ-B-Zellen charakterisiert (Abb. 30).

Im Vergleich zwischen Kleinkindern und Erwachsenen ist kein deutlicher Unterschied in der räumlichen Verteilung des o.g. Expressionsmusters erkennbar (Abb. 30). CD27-, IgM- und CD21-exprimierende Zellen sind in splenischen follikulären Randzonen von Kleinkindern bereits ab 2 Monaten detektierbar. Es fällt auf, dass in Kleinkindern die Ausdehnung der B-Zell-Follikel und Marginalzonen geringer ist als in den Milzen erwachsener Individuen.

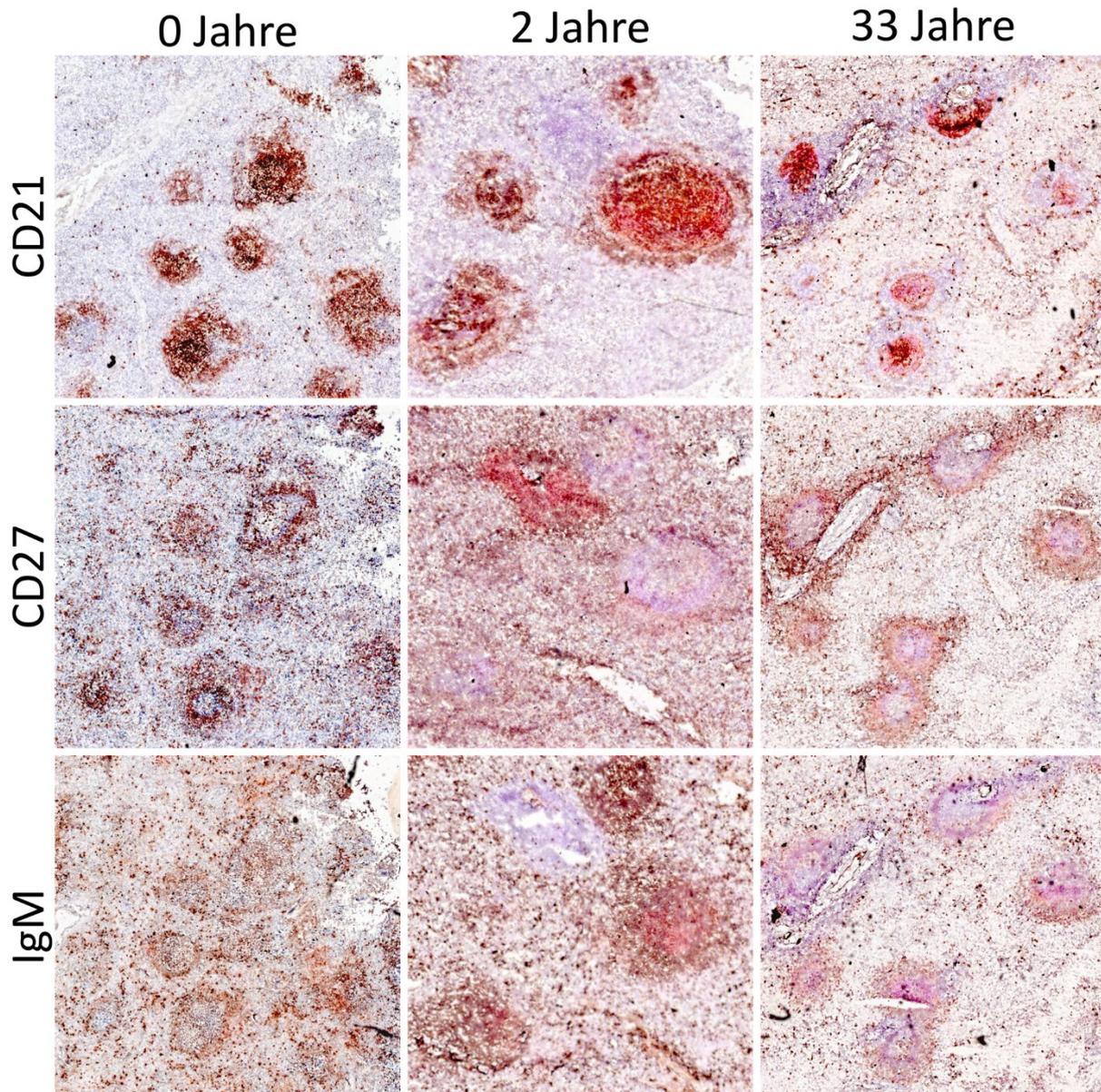


Abb. 30 Altersabhängige immunohistochemische Untersuchung humaner sMZ-B-Zellen

Konsequente Gefrierschnitte von Milzen aus Kleinkindern (0 und 2 Jahre) und eines Erwachsenen (33 Jahre) wurden auf die CD21-, CD27- und IgM-Expression untersucht. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Mikroskopische Aufnahmen eines Individuums zeigen jeweils die gleiche Region im Präparat.

Histologische Untersuchungen an konsekutiven Gewebsschnitten sind dadurch limitiert, dass eine Messung mehrerer Marker auf einer identischen Zelle kaum möglich ist.

Eine Analyse der Mikroarchitektur menschlicher Milzen in unterschiedlichen Altersstadien wurde mittels *ultra high content imaging* auf einem MACSima Imaging Cyclic Staining (Abk. MICS, Miltenyi Biotec GmbH) durchgeführt.

Gefrierschnitte humaner Milzen (2 Monate, 11 Monate, 2, 4, 22 und 26 Jahre) wurden erstellt und die Expressionsstärke von 45 Antigenen wurde mittels MICS sequenziell auf demselben Präparat untersucht. Die Messung der relativen Expressionsstärke mehrerer Oberflächenmoleküle auf derselben Zelle wird durch repetitive Zyklen von Fluoreszenz-gekoppelter Immunfärbung, Messung und Ausbleichen des Fluorochroms ermöglicht. Die Auswahl der untersuchten Antigene erlaubt die Differenzierung von B-Zell-Subpopulationen, T-Zell-Subpopulationen, natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, DZ, Stromazellen, Endothel- und Epithelzellen (Abb. 31). Pro Präparat wurden jeweils mindestens sechs definierte Regionen ausgewählt, die B-Zell-Follikel, Marginalzonen und T-Zell-Regionen und Rote Pulpa beinhalteten.

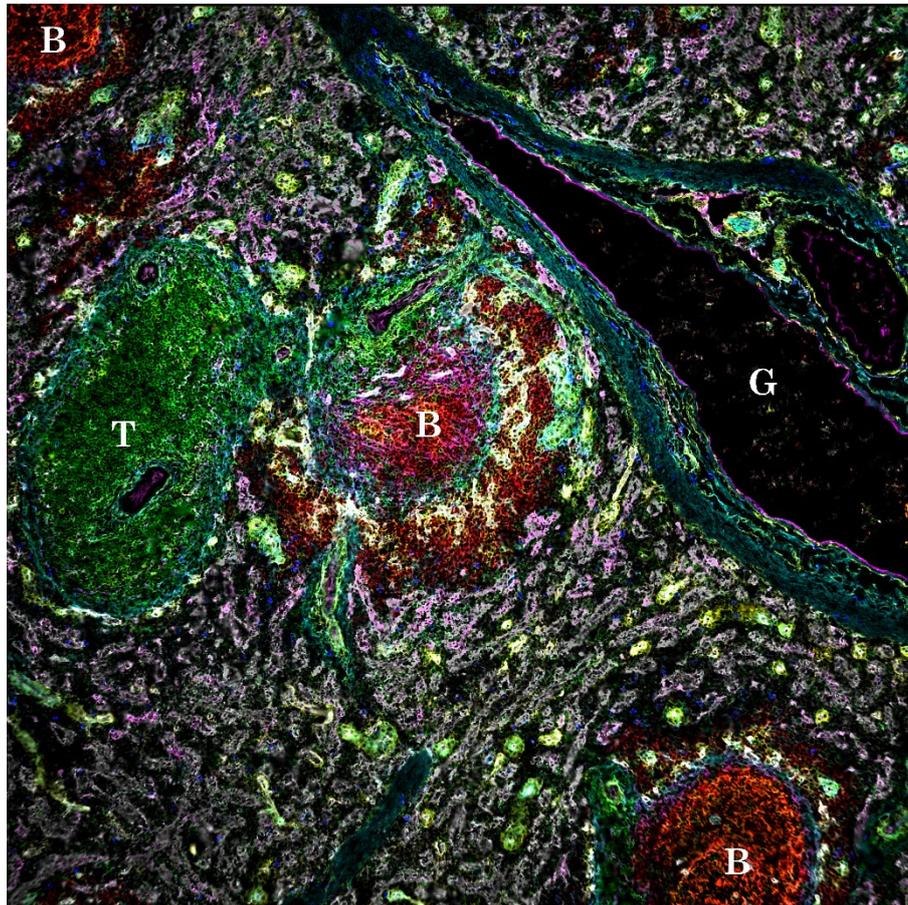


Abb. 31: Histologische Analyse ausgewählter Moleküle in der Milz eines Kleinkindes mittels MACSima

Sieben Einzelaufnahmen wurden farbkodiert übereinandergelagert (CD4: grün, CD14: blau, CD21: rot, CD36: grau, CD90: cyan, CD141: magenta, CD271: gelb). Oben links, unten rechts und in der Bildmitte sind B-Zell-Follikel (B) erkennbar. Rechts im Bild ist ein Blutgefäß (G) und links eine T-Zell-Zone (T) erkennbar. Die Aufnahmen stammen aus der Milz eines 2-jährigen Individuums.

Jedes quadratische Sichtfeld hat eine Kantenlänge von 750 μm und jede Aufnahme eine Auflösung von 2048 x 2048 Pixel. Dies entspricht einer mikroskopierten Fläche von mindestens 3,375 mm^2 pro Präparat und einer Auflösung von ca. 8,5 Pixel/ μm . Die Expressionsstärke jedes Antigens wurde mit vier unterschiedlichen Belichtungszeiten (0,2; 0,5; 1,5 und 4 s) erfasst.

Die Multiplex-Immunfluoreszenz-Messung mittels MICS bestätigt, dass bereits in Kleinkindern sMZ-B-Zellen existieren (Abb. 32). Einige bekannte phänotypische Unterschiede zwischen kindlichen und adulten sMZ-B-Zellen konnten anhand der Bilddaten validiert werden (IgD^{high} sMZ-B-Zellen in Kleinkindern, nicht gezeigt) (Timens *et al.*, 1987).

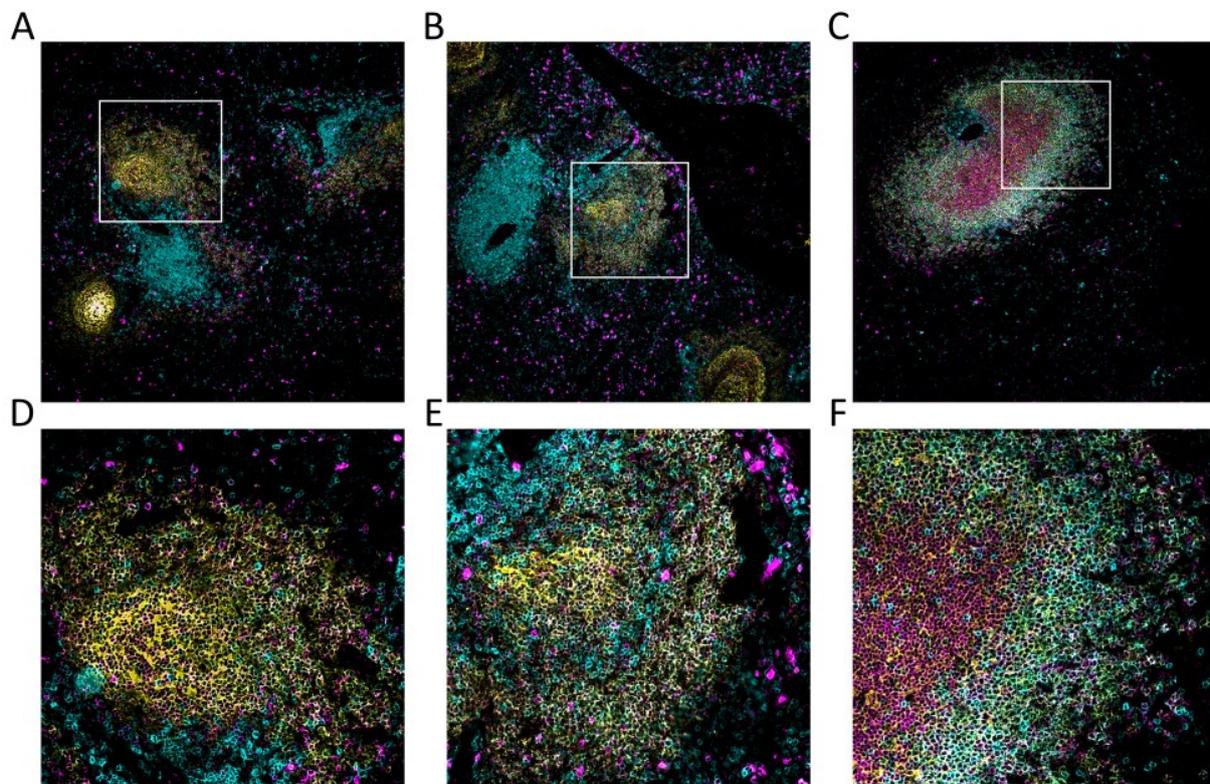


Abb. 32: Altersabhängige Multiplex-Immunfluoreszenz Untersuchung humaner sMZ-B-Zellen

Gefrierschnitte wurden auf die CD21-, CD27- und IgM-Ko-Expression untersucht. Die unterschiedlichen Färbungen wurden mittels MICS auf demselben Gefrierschnitt durchgeführt. (A) Gefrierschnitt aus der Milz eines 0-Jährigen mit Detailansicht (weißer Rahmen) in (D). (B) Gefrierschnitt aus der Milz eines 2-Jährigen mit Detailansicht in (E). (C) Gefrierschnitt aus der Milz eines 22-Jährigen mit Detailansicht in (F).

Eine bioinformatische Analyse der Multiplex-Immunfluoreszenz-basierten Expressionsstärke des untersuchten Panels auf splenischen B-Zellen wird gegenwärtig durchgeführt. In dieser Analyse wird die Expressionsstärke von 45

Molekülen im Zusammenhang mit der räumlichen Lokalisation der Zellen verknüpft. In jedem mikroskopischen Sichtfeld werden die Koordinaten der Zellkerne mittels einer Hoechst 33342-Färbung bestimmt und die Grenzen der Zellen mittels Voronoi-Teilung definiert. Durch dieses Verfahren werden Regionen des Zellkerns und des Zellplasmas definiert. Anschließend wird die mittlere Expressionsstärke (Median) der 45 Antigene in den zuvor definierten Regionen bestimmt. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Milzarchitektur in Kleinkindern sich von der in Erwachsenen in vielen räumlichen und quantitativen Aspekten unterscheidet.

Die sMZ-Architektur wird von Stroma- und Retikulumzellen gebildet (Steiniger *et al.*, 2014). Für die korrekte Lokalisation (und Motilität) der sMZ-B-Zellen sind Adhäsionsmoleküle wichtig (Lu und Cyster, 2002). In den Bereichen von sMZ und B-Zell-Follikel zeigen die Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 in Kleinkindern eine geringere Expressionsstärke bei gleicher Belichtungszeit (Abb. 33). Zudem ist die Expressionsstärke von CD90 und CD105 in Kleinkindern im Bereich der sMZ verringert (Abb. 33). CD90 und CD105 markieren Subpopulationen splenischer follikulärer Retikulumzellen, die wichtige Funktionen als Stromazellen z.B. bei der Bildung der extrazellulären Matrix und Produktion von Zytokinen und Chemokinen erfüllen (Steiniger *et al.*, 2014).

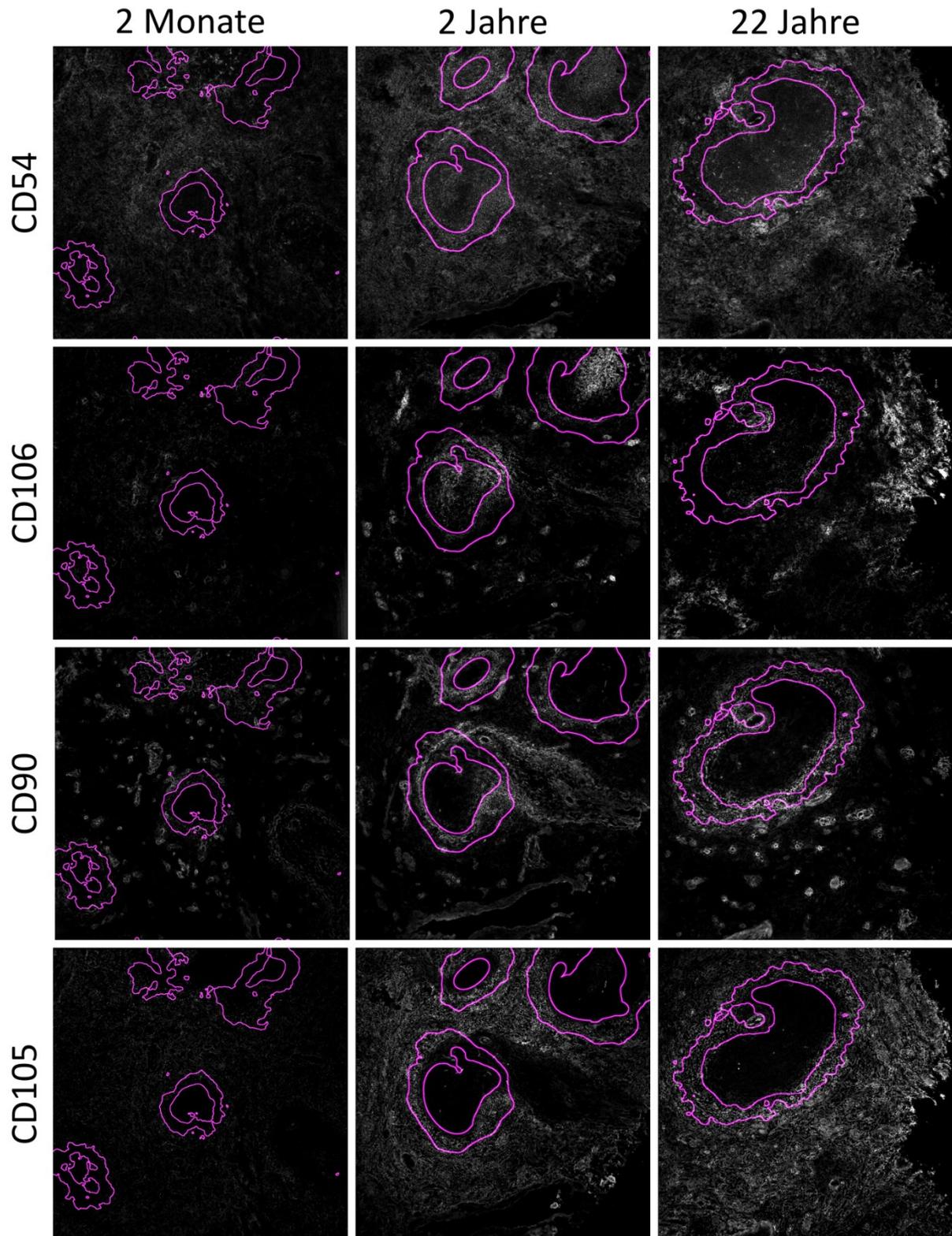


Abb. 33: Mikromilieu in splenischen Marginalzonen im Altersverlauf

Untersuchung des sMZ-Mikromilieus mittels Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung. Die Expressionsstärke von CD54, CD106, CD90 und CD105 (grau) wurde in Milzen aus 2 Monate und 2 Jahre alten Kleinkindern und einem 22-jährigen Erwachsenen untersucht. Follikelgrenzen und sMZ-Grenzen sind in magenta hervorgehoben. Die Belichtungszeit und Kontrasteinstellungen waren für den jeweiligen Marker in allen Altersstadien konstant.

Eine differenzielle Expression der Adhäsionsmoleküle CD106 (*Vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) und CD54 (*Intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) in den Milzen von Kleinkindern im Vergleich zu den Milzen Erwachsener könnte Einfluss auf die Lokalisation und Migration splenischer B-Zellen haben.

Es wurde weiterhin untersucht, inwiefern B-Zellen aus Kleinkindern und Erwachsenen auf die jeweilige Mikroarchitektur der Milz angepasst sind. Die Integrine CD11a/CD18 bzw. CD29/CD49d sind mögliche Liganden für ICAM-1 bzw. VCAM-1 (Springer, 1990). Neben Integrinen und weiteren Adhäsionsmolekülen spielen Chemokinrezeptoren und ihre Liganden eine Rolle bei der Lokalisation und Migration von Zellen (Cyster, 2005). Die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinrezeptoren und Molekülen deren Expression durch sMZ-B-Zellen beschrieben ist (Descatoire *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2004), wurde durchflusszytometrisch in Milz-B-Zell-Suspensionen von Kleinkindern und Erwachsenen untersucht. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Expressionsstärke von 22 unterschiedlichen Oberflächenmolekülen wurde zwecks besserer Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten B-Zell-Populationen als *heatmap* dargestellt (Abb. 34).

Es fällt auf, dass humane sMZ-B-Zellen aus Kleinkindern und Erwachsenen die Moleküle CD1c, CD21, CD35 und CD300a in ähnlichem Maße exprimieren. Es gibt jedoch auch essenzielle Unterschiede hinsichtlich der Expression einiger Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren (CD29, CD49d, CD184, CD185 und CD196, Abb. 32). Kindliche sMZ-B-Zellen exprimieren die Integrine CD29 und CD49d in deutlich vermindertem Maße, was zur niedrigeren Expression von CD106 im Bereich der sMZ passt (Abb. 34 und Abb. 33). Die Integrine CD11a und CD18 sowie die Adhäsionsmoleküle CD50 (*Intercellular adhesion molecule 3*, ICAM-3) und CD54 werden von kindlichen sMZ-B-Zellen im vergleichbaren Maß exprimiert, wie von sMZ-B-Zellen aus Erwachsenen (Abb. 34).

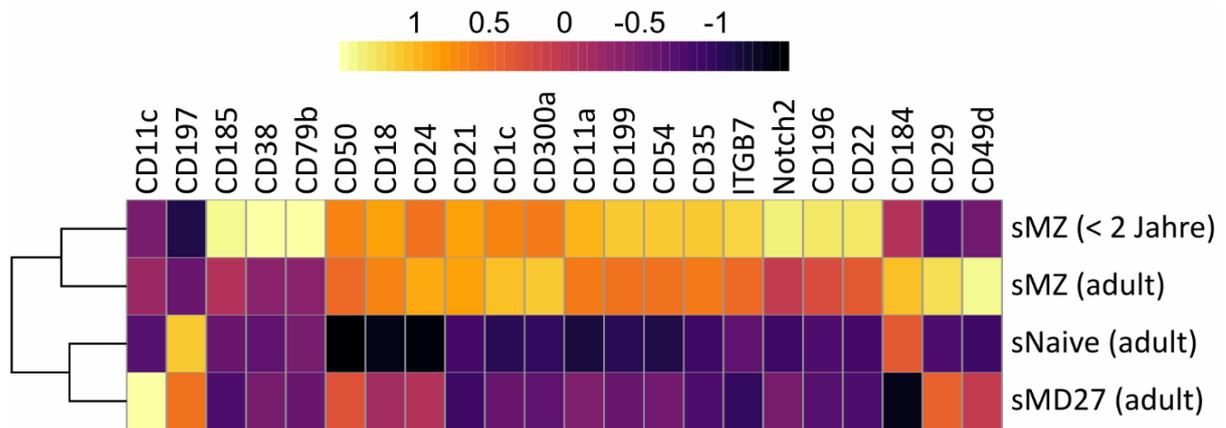


Abb. 34: Expressionsstärke ausgewählter Oberflächenmoleküle unter splenischen B-Zell-Populationen aus unterschiedlichen Altersstadien

Expressionsstärke von Zelloberflächenmolekülen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. *Heatmap* der relativen Oberflächenexpression (Normalisierung pro Molekül) für sMD27-, sNaive- und sMZ-B-Zellen aus Milzen von Erwachsenen im Vergleich zu sMZ-B-Zellen aus Milzen von Kleinkindern (< 2 Jahre).

Die Ergebnisse der Expressionsstärke von Adhäsionsmolekülen im kindlichen Milzstroma und die dazu korrespondierende Expression der Liganden auf kindlichen B-Zellen deuten auf eine entscheidende Rolle des Mikromilieus für die Funktionsweise kindlicher sMZ-B-Zellen hin.

4 Diskussion

Die altersabhängige Dynamik des Ig-Repertoires humaner Gedächtnis- und sMZ-B-Zellen ist nur unzureichend untersucht. Die vorliegende Arbeit umfasst eine phänotypische, molekulare und funktionelle Charakterisierung von isolierten humanen B-Zell-Populationen aus gepaarten Proben von PB und Milz über eine Altersspanne von acht Jahrzehnten. Ebenfalls wurden der Aufbau der Milz vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen und auch das Mikromilieu der sMZ histologisch untersucht.

4.1 Die menschliche Milz archiviert und konserviert Gedächtnis-B-Zell-Klone

In dieser Arbeit wurde eine umfassende klonale Verwandtschaft zwischen B-Zell-Populationen aus PB und Milz von 14 Individuen nachgewiesen: nahezu jeder Klon, der im PB identifiziert wurde, hatte Klonmitglieder in der Milz. Obwohl jeweils nur eine begrenzte Menge Blut untersucht wurde, waren stets zahlreiche expandierte Klone detektierbar. Bereits in Kleinkindern (< 4 Jahre) tritt dieser hohe Verwandtschaftsgrad auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Mitglieder jedes B-Zell-Klons, der in den Blutkreislauf gelangt und mit ihm zirkuliert, in der Milz archiviert wird. Veränderungen der klonalen Häufigkeit treten in jüngeren Individuen zuerst im PB auf und erstrecken sich erst in höherem Alter auf die Milz. Die Milz trägt hierbei sicherlich zur Entstehung von solchen B-Zell-Klonen bei, jedoch sind splenische GC-Reaktionen selten zu beobachten und nehmen im Altersverlauf tendenziell ab (Steiniger *et al.*, 1997; Steiniger *et al.*, 2003; Willenbrock *et al.*, 2005). Gedächtnis-B-Zellen entstehen lokal in körperweit verteilten SLO, werden aber durch Zirkulation mit dem PB im Körper verteilt (Crotty *et al.*, 2003; Giesecke *et al.*, 2014; Mamani-Matsuda *et al.*, 2008; Quiding *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 2008). Im Blutkreislauf zirkulieren demnach Gedächtnis-B-Zellen, die aus GC-Reaktionen in den SLO des gesamten Organismus (Mamani-Matsuda *et al.*, 2008; Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018) stammen und passieren die Milz (Pabst und Trepel, 1975, 1976). In der Milz ist der Blutfluss verlangsamt (Kraal, 1992; Witte und Witte, 1983) und der anatomische Feinbau unterstützt die Adhäsion, den Aufenthalt und das Überleben von Gedächtnis-B-Zellen (Cerutti *et al.*, 2013; Koopman *et al.*, 1994; Lu und Cyster, 2002). Somit tragen Gedächtnis-B-Zellen von Geburt an zu einem systematischen

Archiv in der Milz bei. Neben den akquirierten PB-Mitgliedern bildet und unterstützt die Milz ein eigenständiges Gedächtnis-Kompartiment, dessen relativer Anteil im Altersverlauf zunimmt. Aktuelle Publikationen unterstützen zudem eine starke Vernetzung splenischer B-Zellen mit einem körperweiten, klonalen Netzwerk, welches u.a. Lunge, Darm-assoziierte lymphoide Gewebe, Knochenmark und PB umfasst (Mandric *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017). Diese Arbeiten bestätigen außerdem die Verteilung und Rezirkulation von Gedächtnis-B-Zellen im gesamten Organismus (Pabst und Binns, 1981). Die Milz (und ihre Marginalzone) wurde zuvor als ein „Reservoir für Gedächtnis-B-Zellen“ beschrieben (Dunn-Walters *et al.*, 1995), das zentrale Funktionen in der Abwehr von bakteriellen Infektionen (Amlot und Hayes, 1985; Carsetti *et al.*, 2006; Carsetti *et al.*, 2005; Di Sabatino *et al.*, 2011; Kruetzmann *et al.*, 2003) durch ein effizientes Filtrationssystem des PB vermittelt (Kraal, 1992). Die vorliegende Arbeit erweitert die Rolle der Milz im humanen Immungedächtnis um eine lebenslange, aktive und systematische Archivierung, Konservierung und Expansion humaner Gedächtnis-B-Zellen. Zudem wurde hier gezeigt, dass das Gedächtnis-B-Zell-Archiv der Milz aus zwei phänotypisch distinkten B-Zell-Kompartimenten besteht, die sich anhand der CD21-Expressionsstärke und des Aktivierungszustands unterscheiden.

4.2 Eine stochastische Auswahl von Gedächtnis-B-Zellen prägt die Zusammensetzung der splenischen Marginalzone

Im Kleintiermodell sind unterschiedliche B-Zell-Entwicklungslinien etabliert, die sich u.a. anhand ihres Phänotyps, Rezirkulation, Zeitpunkt der Entstehung und Responsivität gegenüber TI- und TD-Antigenen unterscheiden (Cariappa *et al.*, 2001; Casola *et al.*, 2004; Cerutti *et al.*, 2013; Martin und Kearney, 2000; Oliver *et al.*, 1997; Pillai und Cariappa, 2009; Rickert *et al.*, 1995). Humane sMZ-B-Zellen haben eine vergleichbare histologische Lokalisation, charakteristische Expression von CD21 und CD35, Dynamik nach Aktivierung und Funktion in der Abwehr bakterieller Infektionen wie murine sMZ-B-Zellen (Martin *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1999; Tangye *et al.*, 2003a; Tangye *et al.*, 2003b; Tangye *et al.*, 1998). Murine sMZ-B-Zell-Vorläufer werden bereits im Stadium der

transitionellen B-Zelle auf ein sMZ-B-Zell-Schicksal festgelegt (Casola *et al.*, 2004; Hammad *et al.*, 2017). Die Herkunft humaner sMZ-B-Zellen ist umstritten und es gibt gegensätzliche Hypothesen (Tangye und Good, 2007). Neben einer möglichen GC-Herkunft wurde die GC-unabhängige Entstehung humaner sMZ-B-Zellen vorgeschlagen (Scheeren *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004): Humane adulte sMZ-B-Zellen zeigen klassische Merkmale von GC-erfahrenen B-Zellen, wie Mutationen in den IGHV-Genen, klonale Expansionen mit Anzeichen von Antigen-Selektion und die Expression von CD27 (Dunn-Walters *et al.*, 1995; Tangye *et al.*, 1998; Tierens *et al.*, 1999). Kindliche sMZ-B-Zellen können unabhängig von GC-Reaktionen entstehen, ihre Ig-Gene T-Zell-unabhängig mutieren, im PB als IgM-Gedächtnis-B-Zellen rezirkulieren und haben eine diversere Zusammensetzung als klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen oder splenischen GC-B-Zellen desselben Individuums (Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2008). Jedoch sind IgM-Gedächtnis-B-Zellen, die auch rezirkulierende sMZ-B-Zellen umfassen (Weller *et al.*, 2004) im PB Erwachsener häufig mit klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen klonal verwandt (Seifert und Küppers, 2009; Seifert *et al.*, 2015) und weisen somatische Mutationen im Gen des GC-Master-Transkriptionsfaktors BCL6 auf (Seifert und Küppers, 2009), welches in GC-Reaktionen in geringem Maß AID-abhängig somatisch mutiert (Shen *et al.*, 1998).

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass adulte sMZ-B-Zellen Ig-Mutationen und Anzeichen von Antigen-Selektion aufweisen. Es besteht eine umfassende klonale Verwandtschaft zwischen sMZ-B-Zell-Populationen (CD21^{high}) und Gedächtnis-B-Zellen (CD21⁺) aus PB und Milz. Diese Klone weisen jedoch keine besondere hierarchische Ordnung auf, sondern die CD21^{high} und CD21⁺ Klonmitglieder sind vielmehr zufällig durchmischt. In den ersten Lebensjahrzehnten sind zudem IgM- und klassengewechselte-B-Zell-Populationen der Milz klonal hoch verwandt, was auf eine gemeinsame Herkunft aus GC-Reaktionen deutet. Diese Daten sind starke Argumente für eine GC-Herkunft humaner adulter sMZ-B-Zellen. Der hohe Verwandtschaftsgrad und die fehlende hierarchische Ordnung in Klonen deuten auf einen häufigen, zufälligen Austausch von Zellen zwischen CD21^{high} und CD21⁺ Kompartimenten innerhalb des Gedächtnis-B-Zell-Archivs hin. Demnach sind humane sMZ-B-Zellen (zumindest ab Kleinkindesalter) keine separate B-Zell-

Entwicklungslinie, sondern ein spezialisiertes Kompartiment humaner Gedächtnis-B-Zellen.

4.3 Die splenische Marginalzone induziert einen prä-aktivierten Zustand in B-Zellen

In dieser Arbeit wurde eine Analyse der Genexpressionsprofile humaner sMZ-B-Zellen und B-Zell-Populationen aus PB durchgeführt, die zum Verständnis der Funktionsweise humaner sMZ-B-Zellen beiträgt. Verglichen mit B-Zellen aus PB, zeigen sMZ-B-Zellen in ihren Genexpressionsprofilen eine starke Anreicherung für NOTCH2-Zielgene, die für die Entstehung muriner sMZ-B-Zellen unverzichtbar sind (Fasnacht *et al.*, 2014; Hozumi *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2008; Pillai und Cariappa, 2009; Saito *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2009; Tanigaki *et al.*, 2002). Weiterhin angereichert sind Gengruppen, die mit Adhäsion und Migration assoziiert sind, was auf eine hohe Motilität humaner sMZ-B-Zellen hindeutet, ähnlich zum Mausmodell (Arnon *et al.*, 2013; Cinamon *et al.*, 2008; Lu und Cyster, 2002; Tedford *et al.*, 2017). Gengruppen, die mit Aktivierung, Überlebenssignalen und Signalweiterleitung von Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. Interleukin-Rezeptoren in Verbindung stehen, deuten auf Interaktion mit dem Mikromilieu hin (Kim *et al.*, 2012; Koopman *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 2009). Außerdem suggeriert die Anreicherung mehrerer Signalwege und von MYC-Zielgenen unter ruhenden (d.h. ohne vorhergehende *in vitro* Stimulation) sMZ-B-Zellen eine höhere Basalaktivität dieser Zellpopulation. MYC gilt als Verstärker der Genexpression (Walz *et al.*, 2014). Diese Analyse zeigt, dass trotz unterschiedlicher Herkunft bestimmte phänotypische, funktionelle und molekulare Muster von sMZ-B-Zellen in Menschen und Nagern konserviert sind. Einige Faktoren, die einen „prä-aktivierten“ Zustand (Cerutti *et al.*, 2013) humaner sMZ-B-Zellen induzieren sind bereits bekannt: Das Mikromilieu der menschlichen sMZ enthält spezialisierte Zelltypen, die durch lösliche Mediatoren, Zell-Zell-Kontakt und Bildung extrazellulärer Matrixproteine die immunologische Funktionen von sMZ-B-Zellen unterstützen: DZ, CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, B-Helfer-Neutrophile, folliculäre und Marginalzonen Retikulumzellen, mikrovaskuläre Endothelzellen sowie *Innate lymphoid cells*, die u.a. DLL1, *A proliferation-inducing ligand* (APRIL), *B-cell-activating factor* (BAFF), CD40LG, Interleukine

und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 produzieren (Chorny *et al.*, 2016; Cols *et al.*, 2012; Magri *et al.*, 2014; Pack *et al.*, 2008; Puga *et al.*, 2011; Sintes *et al.*, 2017; Skibinski *et al.*, 1998; Steiniger *et al.*, 2001; Steiniger *et al.*, 2011; Steiniger *et al.*, 2014). Gemeinsam tragen diese unterschiedlichen Zelltypen zur spezialisierten sMZ-Nische bei, die das Überleben, die Aktivierung und Differenzierung humaner sMZ-B-Zellen unterstützen (Cerutti *et al.*, 2013; Kashimura, 2020). In dieser Arbeit zeigen splenische CD21^{high} B-Zell-Populationen eine niedrigere Ansprechempfindlichkeit und stärkere Proliferation unter verschiedenen Stimulierungsbedingungen als CD21⁺ B-Zellen aus PB und Milz, was ihren prä-aktivierten Zustand bestätigt. Viele Faktoren, wie ein prä-aktivierter Zustand und die starke Expression von Komplementrezeptoren, tragen dazu bei, dass humane sMZ-B-Zellen – adaptive Immunzellen – mit einer Kinetik und Intensität angeborener Immunzellen reagieren können (Cerutti *et al.*, 2013). CD21^{high} und CD21⁺ B-Zell-Populationen unterscheiden sich funktionell, jedoch nicht in ihrer IGHV-Gen-Nutzung und CDRIII-Längenverteilung. Sie sind häufig klonal verwandt und die Klonmitglieder zufällig durchmischt. Zusammengenommen bedeuten diese Daten, dass das Mikromilieu in der sMZ des Menschen Gedächtnis-B-Zellen durch bestimmte Signale wie z.B. DLL1 in einen prä-aktivierten Zustand versetzen könnte.

Eine NOTCH2-abhängige Entstehung humaner sMZ-B-Zellen wurde in einer früheren Studie untersucht: Es wurde berichtet, dass in Kindern ein sMZ-B-Zell-Vorläufer durch NOTCH2-Signaltransduktion einen sMZ-B-Zell-ähnlichen Phänotypen und Genexpressionsmuster annimmt (Descatoire *et al.*, 2014). Expression des NOTCH2-Liganden DLL1 wurde mikroskopisch in der sMZ bestätigt (Descatoire *et al.*, 2014). Eine Rolle der NOTCH2-Signaltransduktion bei der Selektion humaner B-Zellen in das prä-aktivierte CD21^{high} Kompartiment wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht. Humane IgM-Gedächtnis-B-Zellen aus PB und Milz haben eine starke Geneigtheit, einen CD21^{high} Phänotypen in Folge von NOTCH2-Signatransduktion anzunehmen. Grundsätzlich reagierten aber auch naive- und klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen mit der Induktion von CD21 nach DLL1-Interaktion, was die Arbeit von Descatoire *et al.* um den Aspekt erweitert, dass verschiedene B-Zell-Typen zu sMZ-

B-Zellen konvertiert werden können. NOTCH2-Signaltransduktion ist ausreichend, eine CD21^{high} Expression in zirkulierenden sowie splenischen humanen B-Zellen zu induzieren.

Die Ergebnisse zur Genexpressionsanalyse und der Ko-Kultur mit DLL1-exprimierenden Zellen unterstützen die Annahme, dass die humane sMZ ein Milieu ist, das B-Zellen- gleich welcher Art und gleich welcher Altersstufe entnommen, zu sMZ-B-Zellen umprogrammiert und einen prä-aktivierten Zustand induziert. Somit sind nicht etwa sMZ-B-Zellen etwas Besonderes, sondern die Milz hat eine besondere Funktion, diese B-Zellen aus Gedächtnis-B-Zellen und möglicherweise weiteren Vorläufern zu generieren.

4.4 Systemische Immunität wird durch Rezirkulation von Gedächtnis-B-Zellen aus dem Milz-Archiv vermittelt

Im Unterschied zu Klonen unter den B-Zell-Populationen aus Milz, war das klonale Verhältnis zwischen B-Zell-Populationen aus PB und Milz in dieser Arbeit nicht zufällig, sondern folgte einem definierten, hierarchischen Muster. Die IGHV-Sequenzen aus PB bilden häufig einen zusammenhängenden, distinkten Ast im Dendrogramm, der auf Anpassung in sekundären (oder späteren) GC-Reaktionen hinweist. PB-Äste wurden in Kleinkindern und jungen Erwachsenen sehr häufig detektiert, nahmen im Altersverlauf jedoch stark ab. Diversifizierte PB-Äste entstehen vermutlich in Folge einer (Re-)Aktivierung von sMZ-B-Zellen und die zirkulierenden Klonmitglieder sind (noch) nicht ins Milz-Archiv zurückgekehrt. Demzufolge wären Gedächtnis-B-Zellen im PB ein Gemisch aus GC-Reaktionen aller SLO des gesamten Organismus (Glass *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2017) und zusätzlich reaktivierten sMZ- sowie splenischen Gedächtnis-B-Zellen. Es ist anzunehmen, dass Gedächtnis-B-Zellen im PB rezirkulierende sMZ-B-Zellen einschließen, die nicht durch einen CD21^{high} Phänotyp, sondern nur durch immungenetische Untersuchungen nachweisbar sind. Das könnte bedeuten, dass die Induktion eines CD21^{high} Phänotypen durch das Mikromilieu in der sMZ transient ist und es zur Aufrechterhaltung dieses Phänotyps kontinuierlicher Signale bedarf. Im Altersverlauf nimmt der Anteil distinkter PB-Äste ab, im

Gegenzug sind vermehrt durchmischte Klone zwischen PB und Milz nachweisbar, was für eine mit dem Alter zunehmende Rezirkulation spricht.

Die Untersuchungen der Klongröße, Klonalität und Isotypen-Zusammensetzung in Klonen zeigen zwei besondere Merkmale splenischer Klone auf. Erstens unterliegen splenische Klone einer kontinuierlichen Größenzunahme im Altersverlauf, wodurch es im hohen Alter zur Ansammlung weniger großer Klone auf Kosten kleinerer Klone kommt. Hierdurch nimmt die klonale Diversität im Altersverlauf ab. Die Häufigkeit bestimmter Antigen-spezifischer Klonotypen ändert sich nicht im Altersverlauf, jedoch nimmt die Diversität Antigen-spezifischer Klone ab ca. 40 bis 50 Jahren deutlich ab.

Zweitens gibt es Anzeichen einer Konservierung splenischer Klone, da die Isotypen-Zusammensetzung unabhängig von der Klongröße ist. Klone mit PB-Mitgliedern zeigen Anzeichen für Anpassung und Ig-Diversifizierung: Klongröße und Anteil Isotypen-gemischter Klone korrelieren, was Merkmale von GC-Reaktionen sind (Budeus *et al.*, 2015; Seifert und Küppers, 2009, 2016). In der vorliegenden Arbeit gibt es Hinweise darauf, dass sMZ- und splenische Gedächtnis-B-Zellen nach ihrer (Re-)Aktivierung rezirkulieren und ihre Ig-Gene diversifizieren. Zahlreichen Studien belegen den effizienten Klassenwechsel humaner sMZ-B-Zellen in Folge von Aktivierung (Chorny *et al.*, 2016; Magri *et al.*, 2014; Puga *et al.*, 2011; Sintes *et al.*, 2017). Eine Korrelation von Klongröße und Isotypen-Zusammensetzung in Klonen mit PB-Mitgliedern ist kompatibel mit einer Reaktivierung von sMZ-B-Zellen und anschließender Klassenwechselrekombination. Eine Anreicherung von rezirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen in der sMZ könnte sowohl systemische Immunität vermitteln als auch die Effizienz der Filtration bekannter Pathogene aus dem Blutstrom erhöhen. Reaktivierte Gedächtnis-B-Zellen können sowohl in GC-Reaktionen adaptieren (McHeyzer-Williams *et al.*, 2015; Mesin *et al.*, 2020; Seifert *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2020) als auch in Antikörper-sezernierende Zellen differenzieren (Seifert *et al.*, 2015; Zuccarino-Catania *et al.*, 2014). Es ist wahrscheinlich, dass durch den prä-aktivierten Zustand humaner sMZ- und sMZ-CSW-B-Zellen Plasmazell-Differenzierung erleichtert wird (Ellyard *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 1999; Tangye *et al.*, 2003a; Tangye *et al.*, 2003b; Tangye *et al.*, 1998).

Die Dynamik von zirkulierenden und archivierten Gedächtnis-B-Zellen (inkl. sMZ-B-Zellen) gewähren einen Einblick in Mechanismen der menschlichen Immunreifung und -alterung.

4.5 Die Reifung der Milz und der Funktion kindlicher sMZ-B-Zellen

Im adulten humanen PB zirkulierende Gedächtnis-B-Zellen werden systematisch in das Milzarchiv integriert und vermutlich durch stochastische Selektion DLL1-abhängig zu sMZ-B-Zellen umprogrammiert. Es ist jedoch unklar, inwiefern sich dieser Prozess in Neugeborenen und Kleinkindern unterscheidet. Das kindliche Immunsystem reagiert bis zu einem Alter von ca. 2 Jahren vermindert auf TI-Antigene und die Morbidität und Mortalität bei bakteriellen Infektionen ist erhöht (Hoffman *et al.*, 2003; Klein, 1981; Mitchell *et al.*, 2014; Mond *et al.*, 1995; Mosier und Subbarao, 1982). Eine mögliche Ursache dafür wurde in der Abwesenheit von sMZ-B-Zellen bzw. den sMZ-Regionen während der ersten Lebensjahre beschrieben (Kruschinski *et al.*, 2004; Timens *et al.*, 1989; Zandvoort *et al.*, 2001). Die Anfälligkeit von Neugeborenen und Kleinkindern gegenüber Infektionskrankheiten nimmt mit dem Alter ab (PrabhuDas *et al.*, 2011), was mit dem Auftreten klassengewechselter B-Zellen und einer höheren Ig-Mutationsfrequenz unter Gedächtnis-B-Zellen sowie weiterhin höherer Qualität, Quantität und Persistenz sezernierter Antikörper korreliert (Einhorn *et al.*, 1986; Paunio *et al.*, 2000; Siegrist, 2001; Whittle *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sMZ-B-Zellen bereits in Neugeborenen detektierbar sind und ihr Anteil unter den B-Zellen kaum vermindert ist. Dennoch gibt es Unterschiede zwischen kindlichen und adulten sMZ-B-Zellen, die wahrscheinlich auf fehlende oder verminderte GC-Reifung kindlicher (sMZ-)B-Zellen beruhen: Kindliche sMZ- und Gedächtnis-B-Zellen exprimieren weitestgehend unmutierte IGHV-Gene, es gibt eine ausgeprägte CD27⁺ sMZ-B-Zell-Population und bis zu einem Alter von ca. 2 Jahren sind wenige klassengewechselte B-Zellen im PB und der Milz vorhanden. Die B-Zellen von Neugeborenen und Kleinkindern sind jedoch weder defekt noch unreif: Naive B-Zellen aus Nabelschnurblut sind mehrheitlich reif und reagieren schneller und stärker als adulte naive B-Zellen auf unterschiedliche Stimulierungsbedingungen

mit Proliferation und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen (Budeus *et al.*, 2020). Ein großer Teil kindlicher B-Zellen exprimiert CD5 auf der Zelloberfläche (Budeus *et al.*, 2020), welches homophil mit anderen CD5-Molekülen interagiert (Brown und Lacey, 2010). Auf diesem Weg könnte die Zell-Zell-Interaktion zwischen kindlichen B- und T-Zellen (die ebenfalls CD5 exprimieren) die Signaltransduktion des BCR (und TCR) attenuieren (Bikah *et al.*, 1998; Brown und Lacey, 2010; Gary-Gouy *et al.*, 2000; Gary-Gouy *et al.*, 2002).

Eine langsame Bildung affinitätsgereifter und klassengewechselter B-Zellen in den ersten Lebensjahren könnte durch eine verzögerte Reifung der GC-Reaktion und beteiligter Zelltypen nach der Geburt zusammenhängen, wie auch anhand humoraler Immunantworten gegenüber Impfungen dokumentiert wurde (Blanchard Rohner *et al.*, 2008; Siegrist, 2001). Follikuläre DZ und fT_H -Zellen unterstützen GC-Reaktionen erst verzögert nach einer frühkindlichen Reifung (Expression aktivierender Moleküle und follikuläre Lokalisation) (Brugnoni *et al.*, 1994; Debock und Flamand, 2014; Debock *et al.*, 2013; Kroczek *et al.*, 1994; Mastelic *et al.*, 2012; Pihlgren *et al.*, 2003). Der Anteil unreifer DZ, regulatorischer T-Zellen im Blut und den SLO sowie die Serum-Konzentration von immunsupprimierendem Adenosin sind in Neugeborenen am höchsten (Hunt *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 2006; Michaelsson *et al.*, 2006; Pettengill *et al.*, 2013; Pettengill und Levy, 2016). Weiterhin könnte Immundominanz mütterlicher Antikörper für kindliche B-Zellen eine zusätzliche Hürde bei der Initiation einer Immunantwort darstellen (Angeletti und Yewdell, 2018; Vono *et al.*, 2019): Mütterliche affinitätsgereifte IgG-Antikörper, die über die Plazenta in den Blutkreislauf des Kindes gelangen, bieten einen effektiven Nestschutz, können jedoch immundominate Epitope maskieren (Edwards, 2015; Getahun und Heyman, 2009; Niewiesk, 2014) und die Aktivierung kindlicher Antigen-spezifischer B-Zellen über Fc-Rezeptoren inhibieren (Chu *et al.*, 2008; Tzeng *et al.*, 2015).

Strukturelle Unterschiede der SLO oder unvollständige Reifung kindlicher Immun- oder Stromazellen können die Bildung und Aufrechterhaltung von GC-Reaktionen in Kleinkindern beeinträchtigen (Asano *et al.*, 1993; Kruschinski *et al.*, 2004; Mureto, 1998; Steiniger *et al.*, 2007; Westerga und Timens, 1989; Zandvoort *et al.*, 2001). Die vorliegende Arbeit zeigt eine reduzierte Expression der

Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in der sMZ, welche einen Einfluss auf die Funktion oder Motilität kindlicher sMZ-B-Zellen haben können (Arnon *et al.*, 2013; Cinamon *et al.*, 2008; Lu und Cyster, 2002; Tedford *et al.*, 2017). Weiterhin wird hier gezeigt, dass ebenfalls die Liganden für VCAM-1 auf der Zelloberfläche kindlicher sMZ-B-Zellen reduziert sind, möglicherweise als Folge einer Anpassung an die kindliche sMZ-Nische. Darüber hinaus könnte die differenzielle Expression von CD184 und CD185 Unterschiede bei der Lokalisation kindlicher sMZ-B-Zellen in der folliculären Grenzregion bzw. einer Migration zwischen sMZ und B-Zell-Follikel zur Folge haben. Der Ligand für CD184 ist *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12) und wird von folliculären Retikulumzellen in der folliculären Grenzregion (Steiniger *et al.*, 2014) und von Endothelzellen und Stromazellen in den Sinusregionen der Roten Pulpa gebildet (Ellyard *et al.*, 2005; Miwa *et al.*, 2013). *C-X-C motif chemokine ligand 13* (CXCL13), der Ligand für CD185 wird unter anderem von folliculären DZ im B-Zell-Follikel gebildet (Steiniger *et al.*, 2014). Murine sMZ-B-Zellen migrieren via VCAM-1-Interaktion entlang eines CXCL12 Gradienten in die Rote Pulpa (Tedford *et al.*, 2017). Histologische Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen zwar eine korrekte Lokalisation kindlicher sMZ-B-Zellen im Randbereich von B-Zell-Follikeln unter homöostatischen Bedingungen, jedoch ist unklar inwiefern die reduzierte Expression von VCAM-1 und differenzielle Expression von CD184 und CD185 die Migration von sMZ-B-Zellen im Verlauf einer Immunreaktion beeinflussen können. Weitere strukturelle Unterschiede, die in dieser Arbeit beschrieben werden, umfassen eine reduzierte Expression von CD90 und CD105, die von folliculären Retikulumzellen der sMZ gebildet werden und möglicherweise von der Reifung oder der Aktivität des B-Zell-Folikels abhängen (Steiniger *et al.*, 2001; Steiniger *et al.*, 2006; Steiniger *et al.*, 2014). Folliculäre Retikulumzellen sind wichtig für die extrazelluläre Architektur der sMZ und ihnen werden Funktionen in der Antigenpräsentation und Chemokinproduktion zugeschrieben und sie unterstützen die Adhäsion und Funktionen von sMZ-B-Zellen (Golub *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2013). Zusammengenommen deuten diese Daten auf Unterschiede in der Adhäsion und Migration kindlicher sMZ-B-Zellen hin, die durch B-Zell-extrinsische Faktoren bedingt sind und einer altersabhängigen Reifung unterliegen.

Kindliche sMZ-B-Zellen unterscheiden sich funktionell von sMZ-B-Zellen in Erwachsenen, unter anderem da im Kleinkind der Anteil von Gedächtnis-B-Zellen niedrig ist und GC-Reaktionen ineffizienter verlaufen. In Neugeborenen und Kleinkindern tragen daher überwiegend naive fötale B-Zellen (Budeus *et al.*, 2020) zur Bildung einer sMZ-B-Zell-Population bei (Descatoire *et al.*, 2014). Dazu passt, dass bereits in Individuen unter 2 Jahren humane sMZ-B-Zellen (sowohl CD27⁺ als auch CD27⁻) nachweisbar sind und für UCB-Klonotypen angereichert, jedoch nahezu Ig-unmutiert sind. Humane sMZ- und Gedächtnis-B-Zellen werden ab der Geburt gebildet, ihre Qualität erhöht sich jedoch deutlich mit dem Einsetzen von effizienten GC-Reaktionen.

4.6 Heterogenität humaner sMZ-B-Zellen

Humane adulte Gedächtnis-B-Zellen werden in sMZ-B-Zellen umprogrammiert. In Neugeborenen gibt es keine Gedächtnis-B-Zellen, daher werden vermutlich naive B-Zellen in dieses prä-aktivierte Kompartiment rekrutiert, wie Ig-Mutationsstatus und Häufigkeit von UCB-Klonotypen nahelegen. Diese altersabhängige Dynamik humaner sMZ-B-Zellen reflektiert die widersprüchliche Literatur zu diesem Thema (Bagnara *et al.*, 2015; Budeus *et al.*, 2015; Descatoire *et al.*, 2014; Dunn-Walters *et al.*, 1995, 1996; Garraud *et al.*, 2012; Hendricks *et al.*, 2018; Kibler *et al.*, 2021; Klein *et al.*, 1994, 1997; Klein *et al.*, 1998; Scheeren *et al.*, 2008; Seifert und Küppers, 2009; Spencer *et al.*, 1985; Spencer *et al.*, 1998; Tierens *et al.*, 1999; Tull *et al.*, 2021; Vossenkamper *et al.*, 2013; Weill *et al.*, 2009; Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2008; Willenbrock *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018). Es ist jedoch unklar, ob eine besondere Subpopulation humaner sMZ-B-Zellen aus einer separaten B-Zell-Entwicklungslinie entsteht (Herzenberg und Herzenberg, 1989).

Die Spezifität des BCR spielt bei Entscheidungen des B-Zell-Schicksals in zahlreichen Mausmodellen eine wichtige Rolle (Graf *et al.*, 2019; Pillai und Cariappa, 2009). Humane kindliche sMZ-B-Zellen sind für Klonotypen angereichert, die ebenfalls von B-Zellen aus Nabelschnurblut exprimiert werden (Budeus *et al.*, 2020). Diese UCB-Klonotypen sind interindividuell konserviert und wahrscheinlich ohne Selektion durch Fremdantigene entstanden, da sie bereits

unmittelbar nach der Geburt nachweisbar sind. Dies spricht für eine Anreicherung autoreaktiver Spezifitäten im Ig-Repertoire Neugeborener, die sich in den kindlichen Antikörper-sezernierenden Zellen fortsetzen (Merbl *et al.*, 2007).

Weitere Beobachtungen unterstützen die Idee, dass humane sMZ-B-Zellen keine homogene Population sind, sondern eine heterogene Zusammensetzung haben (Garraud *et al.*, 2012; Hendricks *et al.*, 2018). Es gibt unter sMZ-B-Zellen IgM-exprimierende und klassengewechselte, aber auch Ig-mutierte und Ig-unmutierte sowie auf TI- und TD-Stimulation reagierende Subpopulationen (Colombo *et al.*, 2013; Della Valle *et al.*, 2014; Dunn-Walters *et al.*, 1995; Ettinger *et al.*, 2007; Krutzmann *et al.*, 2003; Lettau *et al.*, 2020; Tangye *et al.*, 1998; Tierens *et al.*, 1999; Wasserstrom *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2018). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass GC-, T-Zell- und Antigen-unabhängige Mechanismen an der Diversifizierung der Ig-Gene von sMZ-B-Zellen beteiligt sein könnten (Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2008), genauso wie GC-erfahrene, Antigen-selektierte sMZ- und IgM-Gedächtnis-B-Zellen beschrieben wurden (Dunn-Walters *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1998; Seifert und Küppers, 2009; Seifert *et al.*, 2015; Tangye *et al.*, 1998; Tierens *et al.*, 1999).

Ein primärer Diversifizierungsmechanismus des Ig-Repertoires humaner sMZ-B-Zellen könnte eine Ursache für pädiatrische Lymphompathogenese darstellen, jedoch gibt es bislang keine direkte Assoziation mit einer bestimmten Tumorentität. Pädiatrische Non-Hodgkin-Lymphome treten selten auf und die Inzidenz korreliert mit ansteigendem Alter (Sandlund und Martin, 2016). Pädiatrische B-Zell-Lymphome sind häufig hochmaligne und entweder Eppstein-Barr-Virus-assoziiert (Burkitt-Lymphom und klassisches Hodgkin-Lymphom), stammen von GC-B-Zellen ab (DLBCL vom GC-Typ und pädiatrisches klassisches Hodgkin-Lymphom) (Allen *et al.*, 2015; Bechtel *et al.*, 2005; Kanzler *et al.*, 1996; Küppers und Hansmann, 2005; Küppers *et al.*, 1994) oder entstehen aus prä-B-Zellen (Sandlund und Martin, 2016). Im pädiatrischen prä-B-Lymphoblastischen Lymphom gibt es keine Anzeichen somatischer Ig-Mutationen (Hojo *et al.*, 2001). Niedrig-maligne Lymphome wie das Follikuläre Lymphom oder das Marginalzonen-Lymphom sind in jungen Individuen selten (Sandlund und Martin,

2016). Es ist unklar, ob primäre BCR-Diversifizierung an der Entstehung humaner B-Zell-Neoplasien beteiligt ist.

Die Zusammensetzung und Heterogenität humaner sMZ-B-Zellen wurden in dieser Arbeit mittels Einzel-Zell-Untersuchungen erfasst. Unterschiede zwischen den sMZ-B-Zell-Subpopulationen umfassten die Ig-Mutationsfrequenz und differenzielle Expression von Genen, die in Zusammenhang mit B-Zell-Reifung und GC-Erfahrung beschrieben wurden. Phänotypische Unterschiede (CITE-Seq) und differenzielle Expression von Transkripten für Zelloberflächenmoleküle führten zur Identifizierung einer CD27⁻ sMZ-B-Zell-Subpopulationen, deren Häufigkeit im Altersverlauf abnimmt. Kindliche splenische B-Zellen enthalten bereits (im reduzierten Ausmaß) die gleichen B-Zell-Populationen wie in adulten Milzen, abgesehen von Plasmazellen und proliferierenden Zellen. Im Gegenzug gibt es unter kindlichen splenischen B-Zellen jedoch B-Zell-Populationen, die im Altersverlauf entweder stark vermindert oder nicht länger detektierbar sind. Diese Daten könnten ein Hinweis auf eine distinkte, kindliche sMZ-B-Zell-Entwicklungslinie sein. Die Anreicherung von UCB-Klonotypen (Budeus *et al.*, 2020) im kindlichen splenischen IGHV-Repertoire unterstützt, dass fötale B-Zellen aus UCB ebenfalls zu sMZ-B-Zellen umprogrammiert werden können. Es gibt Hinweise darauf, dass humane fötale B-Zellen eine separate B-Zell-Entwicklungslinie darstellen, die vom Entwicklungspotenzial hämatopoetischer Stammzellen abhängt (Budeus *et al.*, 2020). Einzel-Zell-Untersuchungen zeigen eine altersabhängige Reduktion humaner fötaler B-Zellen, die bereits mit ca. 20 Jahren kaum nachweisbar sind (persönliche Kommunikation mit Kevin Bronischewski, Institut für Zellbiologie). Diese Daten könnten ein Hinweis darauf sein, dass humane fötale B-Zellen im Altersverlauf von follikulären B-Zellen adulten Typs verdrängt werden.

Die Analyse dieser Daten ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

4.7 Immunalterung und Immunseneszenz im B-Zell-System

Mit zunehmendem Alter ist ein kontinuierlicher Anstieg der Klonalität unter archivierten B-Zellen messbar, was in einer Häufung sehr großer Klone und dadurch verringerte klonale Diversität in Senioren resultiert. Da dies auf Kosten kleinerer Klone geschieht, ist es in höherem Alter wahrscheinlich zunehmend schwieriger neu-gebildete Klone in das Gedächtnis-B-Zell-Archiv der Milz aufzunehmen. Andere Studien kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Diversität des Ig-Repertoires altersabhängig abnimmt (Gibson *et al.*, 2009; Tabibian-Keissar *et al.*, 2016). Die altersabhängigen Veränderungen im B-Zell-System decken sich mit dem Alter der Involution des Thymus und Veränderungen in der Lymphopoese des Knochenmarks (Guerrettaz *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2011). Diese Veränderungen könnten sekundäre Auswirkungen auf das B-Zell-System haben, z.B. durch reduzierte Bildung naiver B-Zellen oder unzureichender T-Zell-Hilfe in GC-Reaktionen (Eaton *et al.*, 2004; Haynes und Eaton, 2005; Haynes *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2011). Die hier beobachteten Unterschiede in den Ig-Repertoiren von älteren Erwachsenen und Senioren zu jungen erwachsenen Individuen könnten eine Rolle bei der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen dieser Altersgruppen spielen (Siegrist und Aspinall, 2009; Timens *et al.*, 1989) und bieten eine mögliche Erklärung für eingeschränkte Immunantworten bei Impfungen (Siegrist und Aspinall, 2009). Altersabhängige Veränderungen der B-Zellen und des Ig-Repertoires können ebenfalls zu schwächeren Immunantworten in Senioren beitragen, wie durch Verjüngung des Ig-Repertoires nach Rituximab-Therapie gezeigt wurde (Avivi *et al.*, 2019). Humane sMZ-CSW-B-Zellen stellen in Senioren die dominante B-Zell-Population in der Milz, jedoch gibt es keine absolute Vergrößerung des Kompartiments klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen. Zudem nimmt im Altersverlauf die Entkopplung von IgM- und klassengewechselten Klonen zu, womit eine Reduktion der Flexibilität des B-Zell-Gedächtnisses einhergehen könnte. Die Anreicherung von sMZ-CSW-B-Zellen in Senioren könnte Immunantworten gegen Polysaccharid-Impfstoffe beeinflussen (Shi *et al.*, 2005). Die Effizienz sekundärer Immunreaktionen gegen bekannte Antigene wäre weniger beeinträchtigt, die Bildung neuer Gedächtnis-B-Zellen aus naiven B-Zellen jedoch benachteiligt. Konjugat-Impfstoffe lösen durch T-Zell-Hilfe die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen

aus, allerdings ist der relative Anteil naiver B-Zellen in Senioren stark reduziert. Diese Ergebnisse könnten Auswirkungen auf altersabhängige Impfprogramme haben.

Es ist unklar, inwiefern B-Zell-intrinsische Veränderungen z.B. der Genexpression, Epigenetik und des Metabolismus Auswirkungen auf zelluläre Funktion humaner sMZ- und Gedächtnis-B-Zellen im hohen Alter haben (Avivi *et al.*, 2019; Kurupati *et al.*, 2019). B-Zellen aus gealterten Individuen sind wegen differenzieller Expression zentraler Transkriptionsfaktoren eher dazu geneigt zu Plasmazellen zu differenzieren (Chi *et al.*, 2019).

Eine gealtertes Mikromilieu könnte ebenfalls zur Reduktion immunologischer Funktionen im Alter beitragen: Aus Mausmodellen ist bekannt, dass die Migration von sMZ-B-Zellen zwischen sMZ und B-Zell-Follikel altersabhängig abnimmt (Turner und Mabbott, 2017a). Die Ursache dafür sind in erster Linie nicht gealterte sMZ-B-Zellen, sondern eine altersabhängige Auflösung der Milz-Architektur (Turner und Mabbott, 2017b). Eine Atrophie der Weißen Pulpa der menschlichen Milz im hohen Alter ist bekannt und eine funktionelle Einschränkung gealterter follikulärer DZ in einem Mausmodell ist beschrieben (Alex *et al.*, 2015; Aydar *et al.*, 2004; Turner und Mabbott, 2017b). Unklar ist jedoch, inwiefern die Auflösung der Milz-Architektur zu den Veränderungen des IGHV-Repertoires beiträgt. Es gibt Hinweise auf veränderte B-Zell-Selektion während GC-Reaktionen in den Milzen älterer Individuen (Banerjee *et al.*, 2002), wozu sicherlich verminderte Fc-Rezeptor-Expression von follikulären DZ und CD40LG von T_H-Zellen beitragen könnten (Aydar *et al.*, 2004; Eaton *et al.*, 2004; Haynes und Eaton, 2005).

4.8 Ein Modell für die Dynamik humaner Gedächtnis-B-Zellen

Die vorliegende Arbeit schlägt eine aktualisierte Sichtweise auf humane Gedächtnis-B-Zellen vor, wobei die Funktion und Dynamik splenischer B-Zell-Populationen und ihr Verhältnis zu B-Zellen aus PB im Fokus stehen. Gedächtnis-B-Zellen werden in drei miteinander verwobene Kompartimente eingeteilt (Abb. 35, Seite 123): zirkulierende Gedächtnis-B-Zellen tragen Merkmale adaptiver Immunantworten. Neu-gebildete, in die Zirkulation des Blutkreislaufs freigesetzte Gedächtnis-B-Zellen werden kontinuierlich in das systematische Gedächtnis-B-Zell-Archiv der Milz aufgenommen. Dieses Archiv konserviert und expandiert systematisch und lebenslang B-Zell-Klone. Eine zufällige Stichprobe archivierter Gedächtnis-B-Zellen wird in das sMZ-B-Zell-Kompartiment rekrutiert, welches durch CD21^{high} Expression, einen prä-aktivierten (engl. *primed*) Zustand und eine daraus resultierende gesteigerte Ansprechempfindlichkeit charakterisiert ist. Gedächtnis- und sMZ-B-Zellen aus dem Archiv der Milz können in die Zirkulation des Blutkreislaufs zurückkehren und in sekundären GC-Reaktionen ihre Ig-Gene diversifizieren. Die Änderung der B-Zell-Zusammensetzung und die Anhäufung großer Klone im Altersverlauf könnten Ursachen für Immunalterung sein, eine Grundlage für erhöhte Lymphompathogenese und schließlich die beobachtete Anfälligkeit für Infektionen im hohen Alter begünstigen.

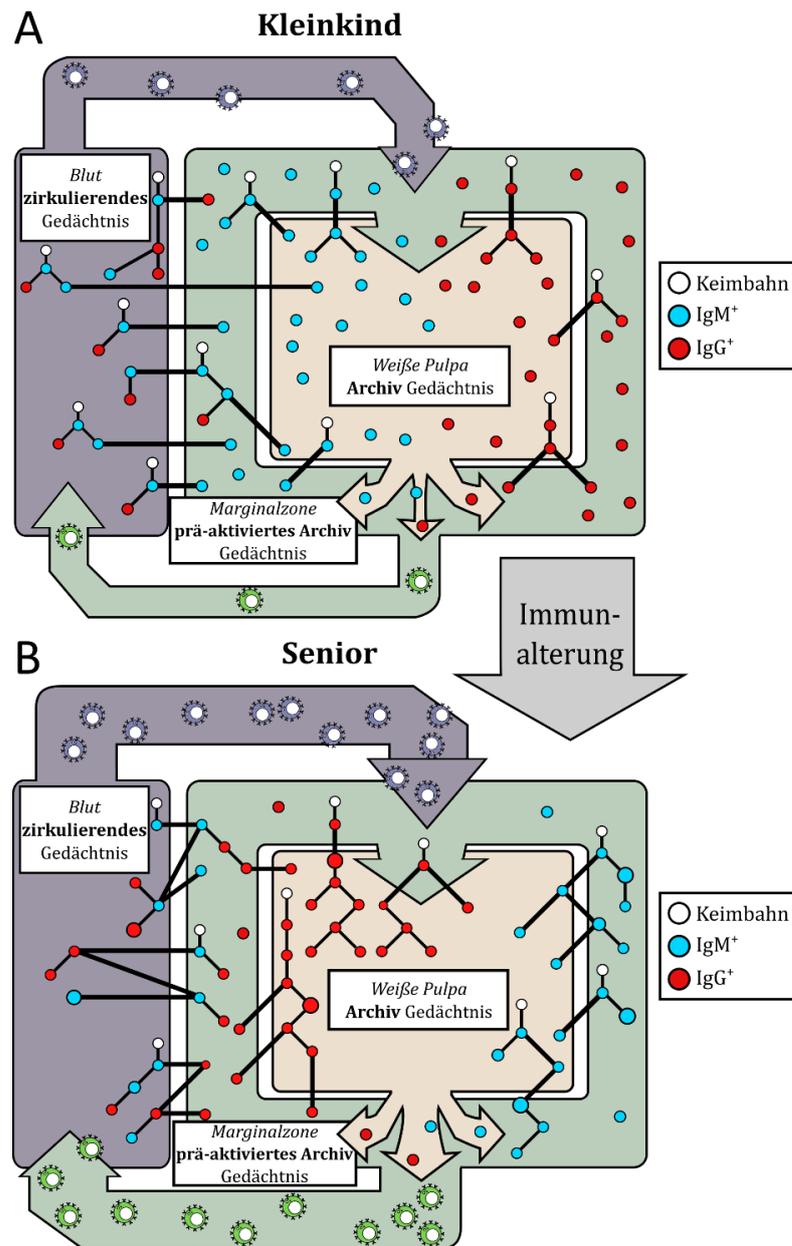


Abb. 35: Modell für die Dynamik humaner Gedächtnis-B-Zellen

(A) Drei miteinander verwobene Kompartimente bestimmen die Dynamik des humanen Immungedächtnisses: Im Blut zirkulierende Gedächtnis-B-Zellen entstehen in GC-Reaktionen in SLO des gesamten Organismus und werden kontinuierlich und systematisch in das Archiv der Milz aufgenommen. Archivierte Klonmitglieder werden konserviert, expandiert und durch zufälligen Austausch DLL1-abhängig in einen prä-aktivierten Zustand versetzt und in die sMZ aufgenommen. Archivierte Klonmitglieder können nach ihrer Reaktivierung in die Peripherie rezirkulieren, Ig-diversifizieren und Klassenwechsel durchlaufen und tragen somit zu adaptiven Immunantworten bei. (B) Immunalterung verstärkt die Rezirkulation zwischen Blut und Milz, große Klone expandieren auf Kosten kleinerer Klone und es findet eine Entkopplung von IgM- und klassengewechselten Klonen statt. ©2021 Kibler et al. Originally published in *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20201952>

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift konnten Erkenntnisse zur Immunreifung, Funktionsweise und Immunalterung des B-Zell-Gedächtnisses gewonnen werden.

Humane sMZ-B-Zellen haben essenzielle Funktionen in der Abwehr bakterieller Infektionen, jedoch ist der Mechanismus ihrer Entstehung umstritten. Gedächtnis-B-Zellen aus PB und Milz sind häufig mit sMZ-B-Zellen klonal verwandt und Klonmitglieder sind zufällig durchmischt. Das sind Argumente für eine gemeinsame Herkunft aus GC-Reaktionen. Eine Anreicherung von Gensignaturen in sMZ-B-Zellen, die mit NOTCH-Signaltransduktion, B-Zell-Gedächtnis und Zellaktivierung assoziiert sind, suggerieren einen möglichen Entstehungsmechanismus humaner sMZ-B-Zellen: CD21⁺ B-Zellen aus PB und Milz induzieren CD21^{high} Expression in Folge von DLL1- NOTCH2-Interaktion, im Einklang mit der Idee einer Umprogrammierung humaner Gedächtnis-B-Zellen in prä-aktivierte sMZ-B-Zellen. Funktionelle Unterschiede zwischen CD21⁺ und prä-aktivierten CD21^{high} B-Zell-Populationen wurden validiert. Einzel-Zell-Untersuchungen von sMZ-B-Zellen suggerieren eine heterogene, sich mit dem Alter verändernde Zusammensetzung aus Subpopulationen, die molekular und phänotypisch unterscheidbar sind. Histologische Untersuchungen enthüllen eine frühkindliche Reifung des Mikromilieus der sMZ. Unterschiede im Ig-Mutationsstatus, Fehlen von IgA- und IgG-Expression und differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren durch kindliche sMZ-B-Zellen könnten funktionelle Unterschiede zu adulten sMZ-B-Zellen erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bedeuten in wenigen Worten: Humane Gedächtnis-B-Zellen aus PB werden systematisch in der Milz archiviert, konserviert und expandiert. Mitglieder des Gedächtnis-B-Zell-Archivs werden zufällig DLL1-abhängig zu sMZ-B-Zellen umprogrammiert. Immunreifung kindlicher sMZ-B-Zellen ist abhängig von GC-Erfahrung und der Reifung des Mikromilieus in der sMZ. Kontinuierliche altersabhängige Reduktion der klonalen Diversität und Entkopplung von IgM- und klassengewechselten Klonen können Ursachen für Immunalterung des B-Zell-Systems sein.

6 Summary

Human sMZ B cells protect from systemic bacterial infections, however, their developmental origin is debated.

Human memory B cells from PB and spleen and sMZ B cells are often clonally related but clone members lack intraclonal hierarchical patterns, which supports the GC-dependent origin of human sMZ B cells. Molecular analysis revealed an enrichment of NOTCH2-signaling, immune cell activation and immune memory signatures among adult sMZ B cells. These data suggest a mechanism of human sMZ B cell development: Signaling via the DLL1-NOTCH2-pathway induces CD21^{high} expression in memory B cells from PB and spleen, which is associated with a primed state. Indeed, human CD21^{high} B cells respond faster and more vigorously to various types of stimulation than CD21⁺ B cells from PB and spleen. In addition, the composition of human sMZ B cells is heterogeneous and changes with age, as single-cell-analyses revealed. Subsets of sMZ B cells are distinguishable through Ig-mutation levels, gene expression and phenotypical markers. In this study, histological analyses indicate an immature sMZ microenvironment in infants, and flow cytometry shows an altered expression of adhesion molecules and chemokine receptors in sMZ B cells, which might contribute to impaired immune responses against blood-borne pathogens and TI-antigens.

In brief, human memory B cells circulate via the PB and are comprehensively archived in the spleen. MBCs in the splenic archive are systematically preserved and a stochastic selection of MBCs is reprogrammed to sMZ B cells via a DLL1-NOTCH2-dependent pathway. CD21^{high} expressing sMZ B cells are in a primed state and upon reactivation, Ig-diversification, class-switching, and recirculation contribute to immune adaptation and systemic protection. Maturation of infant sMZ B cells depends on GC-experience and the sMZ microenvironment, whereas clonal outgrowth and uncoupling of IgM- and class-switched clones might contribute to immune aging.

7 Ausblick

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind die Einzel-Zell-Analysen humaner sMZ-B-Zellen mittels 10X-Chromium-Technologie und die multiplex-Immunfluoreszenz-Analysen humaner Milzen mittels MICS noch nicht abgeschlossen.

Eine Charakterisierung der altersabhängigen Reifung der sMZ-Nische, ihre zelluläre Zusammensetzung und Interaktionen zwischen sMZ-B-Zellen und ihrem Mikromilieu sind geplant. Eine veränderte Interaktion kindlicher sMZ-B-Zellen mit ihrem Mikromilieu sollte zudem *in vitro* validiert werden. Dies könnte durch Isolierung kindlicher und adulter B-Zell-Populationen und Untersuchung von Migrationskapazität und Adhäsionsverhalten unter verschiedenen Stimulierungsbedingungen erfolgen. Dadurch könnten Auswirkungen einer reduzierten VCAM-1 Expression und differenzieller Chemokinrezeptor-Expression beleuchtet werden. Eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen sMZ-B-Zellen und ihrem Mikromilieu erscheint reizvoll, da dies einen Einblick in Immundynamik gewähren und Möglichkeiten der Manipulation ineffizienter oder dysregulierter Immunreaktionen aufdecken könnte.

Eine Untersuchung der altersabhängigen Reifung humaner sMZ-B-Zellen und ihrer Zusammensetzung wäre für das Verständnis humaner Immunreifung und Immunalterung interessant. Dafür ist die Identifizierung von Oberflächmolekülen, die eine Isolation distinkter sMZ-B-Zell-Subpopulationen ermöglichen essenziell. Isolierte sMZ-B-Zell-Subpopulationen könnten phänotypisch, molekular und funktionell charakterisiert werden, wodurch ein besseres Verständnis der Funktionen von sMZ-B-Zellen im Altersverlauf entstehen würde. Einzel-Zell-Untersuchungen könnten weiterhin dazu beitragen, die Existenz einer separaten sMZ-B-Zell-Entwicklungslinie in Föten, Kleinkindern und Hyper-IgM-Patienten zu klären und ggf. molekulare Anforderungen ihrer Entstehung aufzudecken.

Eine Untersuchung der histologischen Lokalisation klonal verwandter B-Zellen könnte zur Klärung mehrerer Fragestellungen beitragen: Es ist unklar, inwieweit Rezirkulation zur Verteilung von Klonmitgliedern innerhalb der Milz (z.B. zu verschiedenen, räumlich und entlang des Blutstroms getrennte sMZ) beiträgt und

ob CD21⁺ und CD21^{high} Klonmitglieder distinkte anatomische Nischen innerhalb der Weißen Pulpa (d.h. B-Zell-Follikel, Mantelzone, Marginalzone und perifollikuläre Zone) einnehmen. Eine Abstammung kindlicher sMZ-B-Zellen aus GC-Reaktionen konnte mit den vorliegenden Daten nicht verlässlich geklärt werden. Räumliche Verteilung von Klonmitgliedern in der Milz könnte zur Klärung dieser Fragen beitragen und wäre z.B. mittels RNAscope nachweisbar, eine Weiterentwicklung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (Gall und Pardue, 1969; Wang *et al.*, 2012). Hierzu könnten splenische GC-B-Zellen und sMZ-B-Zellen mittels Mikrodissektion oder Zellsortierung isoliert und ihre VDJ-Umlagerungen bestimmt werden. Die Lokalisation klonal verwandter B-Zellen könnte mittels CDRIII-spezifischer Sonden in einem (konsekutiven) Gewebsschnitt detektiert werden.

Ig-Repertoire-Analysen können Einblick in Diversität und klonale Verwandtschaft von B-Zellen geben. Altersabhängige Änderungen der Spezifität und Affinität im Ig-Repertoire sind durch den Vergleich mit veröffentlichten Ig-Sequenzen, deren Antigen-Spezifität und Affinität bekannt sind, möglich. Eine denkbare Weiterentwicklung dieser Herangehensweise umfasst eine Untersuchung Antigen-spezifischer IgM- und IgG-Titer im Serum z.B. mittels VirScan (Xu *et al.*, 2015), opsonophagozytische Aktivität von Antikörpern sowie die Häufigkeit und klonale Diversität Antigen-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen aus Milz und PB. Diese kombinierte Herangehensweise würde Einblick in das ruhende (Gedächtnis-B-Zellen) und aktive Kompartiment (Plasmazellen) der menschlichen humoralen Immunität gewähren. Dies könnte dazu beitragen, Ursachen für die gesteigerte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen von Kleinkindern und Senioren aufzudecken.

Schließlich ermöglicht ein tieferes Verständnis der Entstehung, Reifung und Funktion humaner sMZ- und Gedächtnis-B-Zellen und ihrer Subpopulationen einen Einblick in den zellulären Ursprung und die Pathogenese von Immundefizienzen, Autoimmunität sowie B-Zell-Lymphomen und -Leukämien.

8 Literaturverzeichnis

- Ademokun, A., Wu, Y.C., und Dunn-Walters, D., The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology* 11 (2010) 125-137.
- Aderem, A., und Underhill, D.M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 593-623.
- Adler, A.S., Mizrahi, R.A., Spindler, M.J., Adams, M.S., Asensio, M.A., Edgar, R.C., Leong, J., Leong, R., Roalfe, L., White, R., Goldblatt, D., und Johnson, D.S., Rare, high-affinity anti-pathogen antibodies from human repertoires, discovered using microfluidics and molecular genomics. *MAbs* 9 (2017) 1282-1296.
- Agematsu, K., Nagumo, H., Shinozaki, K., Hokibara, S., Yasui, K., Terada, K., Kawamura, N., Toba, T., Nonoyama, S., Ochs, H.D., und Komiyama, A., Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest* 102 (1998) 853-860.
- Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., und Komiyama, A., B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol* 27 (1997) 2073-2079.
- Agrawal, A., und Schatz, D.G., RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination. *Cell* 89 (1997) 43-53.
- Ahmed, R., und Gray, D., Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272 (1996) 54-60.
- Akilesh, S., Huber, T.B., Wu, H., Wang, G., Hartleben, B., Kopp, J.B., Miner, J.H., Roopenian, D.C., Unanue, E.R., und Shaw, A.S., Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 967-972.
- Alex, L., Rajan, M., Xavier, B., Jacob, P., Rani, K., und Lakshmi, G., Microscopic study of human spleen in different age groups. *Int J Res Med Sci* 3 (2015) 1706-1707.
- Allen, C.D., und Cyster, J.G., Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 20 (2008) 14-25.
- Allen, C.E., Kelly, K.M., und Bollard, C.M., Pediatric lymphomas and histiocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am* 62 (2015) 139-165.
- Allman, D., Li, J., und Hardy, R.R., Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* 189 (1999) 735-740.
- Allman, D., und Miller, J.P., B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 17 (2005) 463-467.
- Alt, F.W., Bothwell, A.L., Knapp, M., Siden, E., Mather, E., Koshland, M., und Baltimore, D., Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* 20 (1980) 293-301.
- Amlot, P.L., und Hayes, A.E., Impaired human antibody response to the thymus-independent antigen, DNP-Ficoll, after splenectomy. Implications for post-splenectomy infections. *Lancet* 1 (1985) 1008-1011.
- Anderson, S.M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A.M., Kleinstein, S.H., und Shlomchik, M.J., Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. *J Immunol* 183 (2009) 7314-7325.
- Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., und Shlomchik, M.J., New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J Exp Med* 204 (2007) 2103-2114.
- Andrews, S.F., Chambers, M.J., Schramm, C.A., Plyler, J., Raab, J.E., Kanekiyo, M., Gillespie, R.A., Ransier, A., Darko, S., Hu, J., *et al.*, Activation Dynamics and Immunoglobulin Evolution of Pre-existing and Newly Generated Human Memory B cell Responses to Influenza Hemagglutinin. *Immunity* 51 (2019) 398-410 e395.
- Andrews, S.F., Huang, Y., Kaur, K., Popova, L.I., Ho, I.Y., Pauli, N.T., Henry Dunand, C.J., Taylor, W.M., Lim, S., Huang, M., Qu, X., Lee, J.H., Salgado-Ferrer, M., Krammer, F., Palese, P., Wrammert, J., Ahmed, R., und Wilson, P.C., Immune history profoundly affects broadly protective B cell responses to influenza. *Sci Transl Med* 7 (2015) 316ra192.
- Angeletti, D., und Yewdell, J.W., Understanding and Manipulating Viral Immunity: Antibody Immunodominance Enters Center Stage. *Trends Immunol* 39 (2018) 549-561.

- Aran, D., Looney, A.P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R.P., Wolters, P.J., Abate, A.R., Butte, A.J., und Bhattacharya, M., Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol* 20 (2019) 163-172.
- Arnold, J., ggthemes: Extra themes, scales and geoms for "ggplot2."R package version 3.4.0. <https://github.com/jrnold/ggthemes> (2017).
- Arnon, T.I., Horton, R.M., Grigorova, I.L., und Cyster, J.G., Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* 493 (2013) 684-688.
- Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., und Liu, Y.J., Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268 (1995) 720-722.
- Asano, S., Akaike, Y., Muramatsu, T., Mochizuki, M., Tsuda, T., und Wakasa, H., Immunohistologic detection of the primary follicle (PF) in human fetal and newborn lymph node anlagen. *Pathol Res Pract* 189 (1993) 921-927.
- Ashkar, A.A., und Rosenthal, K.L., Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med* 2 (2002) 545-556.
- Aslam, M.A., Alemdehy, M.F., Hao, B., Krijger, P.H.L., Pritchard, C.E.J., de Rink, I., Muhaimin, F.I., Nurziah, I., van Baalen, M., Kerkhoven, R.M., van den Berk, P.C.M., Skok, J.A., und Jacobs, H., The Ig heavy chain protein but not its message controls early B cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117 (2020) 31343-31352.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., und Tangye, S.G., IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* 181 (2008) 1767-1779.
- Avivi, I., Zisman-Rozen, S., Naor, S., Dai, I., Benhamou, D., Shahaf, G., Tabibian-Keissar, H., Rosenthal, N., Rakovsky, A., Hanna, A., Shechter, A., Peled, E., Benyamini, N., Dmitrukha, E., Barshack, I., Mehr, R., und Melamed, D., Depletion of B cells rejuvenates the peripheral B-cell compartment but is insufficient to restore immune competence in aging. *Aging Cell* 18 (2019) e12959.
- Aydar, Y., Balogh, P., Tew, J.G., und Szakal, A.K., Follicular dendritic cells in aging, a "bottle-neck" in the humoral immune response. *Ageing Res Rev* 3 (2004) 15-29.
- Bagnara, D., Squillario, M., Kipling, D., Mora, T., Walczak, A.M., Da Silva, L., Weller, S., Dunn-Walters, D.K., Weill, J.C., und Reynaud, C.A., A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans. *J Immunol* 195 (2015) 3716-3724.
- Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., und Kearney, J., Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17 (2002) 341-352.
- Banerjee, M., Mehr, R., Bebelovsky, A., Spencer, J., und Dunn-Walters, D.K., Age- and tissue-specific differences in human germinal center B cell selection revealed by analysis of IgVH gene hypermutation and lineage trees. *Eur J Immunol* 32 (2002) 1947-1957.
- Bankovich, A.J., Raunser, S., Juo, Z.S., Walz, T., Davis, M.M., und Garcia, K.C., Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* 316 (2007) 291-294.
- Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D., An, J., Nagasawa, T., und Cyster, J.G., Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 39 (2013) 912-924.
- Barak, M., Zuckerman, N.S., Edelman, H., Unger, R., und Mehr, R., IgTree: creating Immunoglobulin variable region gene lineage trees. *J Immunol Methods* 338 (2008) 67-74.
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., und Williams, D.A., The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* 32 (2018) 9-25.
- Bashford-Rogers, R.J.M., Bergamaschi, L., McKinney, E.F., Pombal, D.C., Mescia, F., Lee, J.C., Thomas, D.C., Flint, S.M., Kellam, P., Jayne, D.R.W., Lyons, P.A., und Smith, K.G.C., Analysis of the B cell receptor repertoire in six immune-mediated diseases. *Nature* 574 (2019) 122-126.
- Baxendale, H.E., Davis, Z., White, H.N., Spellerberg, M.B., Stevenson, F.K., und Goldblatt, D., Immunogenetic analysis of the immune response to pneumococcal polysaccharide. *Eur J Immunol* 30 (2000) 1214-1223.
- Baxendale, H.E., und Goldblatt, D., Correlation of molecular characteristics, isotype, and in vitro functional activity of human antipneumococcal monoclonal antibodies. *Infect Immun* 74 (2006) 1025-1031.

- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C., und Küppers, R., Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106 (2005) 4345-4350.
- Beerman, I., Bhattacharya, D., Zandi, S., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., Bryder, D., und Rossi, D.J., Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 5465-5470.
- Bemark, M., Hazanov, H., Stromberg, A., Komban, R., Holmqvist, J., Koster, S., Mattsson, J., Sikora, P., Mehr, R., und Lycke, N.Y., Limited clonal relatedness between gut IgA plasma cells and memory B cells after oral immunization. *Nat Commun* 7 (2016) 12698.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., und Lanzavecchia, A., Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298 (2002) 2199-2202.
- Beutler, B., und Rietschel, E.T., Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 169-176.
- Bianchi, M.E., DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81 (2007) 1-5.
- Biddison, W.E., Rao, P.E., Talle, M.A., Goldstein, G., und Shaw, S., Possible involvement of the OKT4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens. Evidence from studies of cytotoxic T lymphocytes specific for SB antigens. *J Exp Med* 156 (1982) 1065-1076.
- Biddison, W.E., Rao, P.E., Talle, M.A., Goldstein, G., und Shaw, S., Possible involvement of the T4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens: evidence from studies of proliferative responses to SB antigens. *J Immunol* 131 (1983) 152-157.
- Bikah, G., Lynd, F.M., Aruffo, A.A., Ledbetter, J.A., und Bondada, S., A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol* 10 (1998) 1185-1196.
- Blanchard Rohner, G., Snape, M.D., Kelly, D.F., John, T., Morant, A., Yu, L.M., Borkowski, A., Ceddia, F., Borrow, R., Siegrist, C.A., und Pollard, A.J., The magnitude of the antibody and memory B cell responses during priming with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in human infants is associated with the persistence of antibody and the intensity of booster response. *J Immunol* 180 (2008) 2165-2173.
- Boegel, S., Lower, M., Bukur, T., Sorn, P., Castle, J.C., und Sahin, U., HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics* 11 (2018) 36.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., und Diefenbach, A., Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 64-76.
- Bohlsón, S.S., Fraser, D.A., und Tenner, A.J., Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol* 44 (2007) 33-43.
- Boyd, S.D., und Crowe, J.E., Jr., Deep sequencing and human antibody repertoire analysis. *Curr Opin Immunol* 40 (2016) 103-109.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., und Goodman, M.F., Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 4102-4107.
- Briney, B., Inderbitzin, A., Joyce, C., und Burton, D.R., Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. *Nature* 566 (2019) 393-397.
- Brodeur, S.R., Angelini, F., Bacharier, L.B., Blom, A.M., Mizoguchi, E., Fujiwara, H., Plebani, A., Notarangelo, L.D., Dahlback, B., Tsitsikov, E., und Geha, R.S., C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* 18 (2003) 837-848.
- Brown, M.H., und Lacey, E., A ligand for CD5 is CD5. *J Immunol* 185 (2010) 6068-6074.
- Brugnoni, D., Airo, P., Graf, D., Marconi, M., Lebowitz, M., Plebani, A., Giliani, S., Malacarne, F., Cattaneo, R., Ugazio, A.G., und et al., Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *Eur J Immunol* 24 (1994) 1919-1924.
- Budeus, B., Kibler, A., Brauser, M., Homp, E., Bronischewski, K., Ross, J.A., Görgens, A., Weniger, M.A., Dunst, J., Kreslavsky, T., *et al.*, Human neonatal B cell immunity differs from the adult version by conserved Ig repertoires and rapid, but transient response dynamics. *bioRxiv* doi: 10.1101/2020.08.11.245985 (2020).
- Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowicz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., und Küppers, R., Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility

- of clonal diversification in germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) E5281-5289.
- Burnet, F.M., *The clonal selection theory of acquired immunity*, Vanderbilt University Press, Nashville, 1959.
- Cambier, J.C., Pleiman, C.M., und Clark, M.R., Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 457-486.
- Cameron, P.U., Jones, P., Gorniak, M., Dunster, K., Paul, E., Lewin, S., Woolley, I., und Spelman, D., Splenectomy associated changes in IgM memory B cells in an adult spleen registry cohort. *PLoS One* 6 (2011) e23164.
- Campos-Martin, Y., Martinez, N., Martinez-Lopez, A., Cereceda, L., Casado, F., Algara, P., Oscier, D., Menarguez, F.J., Garcia, J.F., Piris, M.A., und Mollejo, M., Clinical and diagnostic relevance of NOTCH2-and KLF2-mutations in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 102 (2017) e310-e312.
- Cancro, M.P., B cells and aging: gauging the interplay of generative, selective, and homeostatic events. *Immunol Rev* 205 (2005) 48-59.
- Cancro, M.P., Hao, Y., Scholz, J.L., Riley, R.L., Frasca, D., Dunn-Walters, D.K., und Blomberg, B.B., B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol* 30 (2009) 313-318.
- Carey, J.B., Moffatt-Blue, C.S., Watson, L.C., Gavin, A.L., und Feeney, A.J., Repertoire-based selection into the marginal zone compartment during B cell development. *J Exp Med* 205 (2008) 2043-2052.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., und Pillai, S., The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14 (2001) 603-615.
- Carroll, M., Role of complement receptors CD21/CD35 in B lymphocyte activation and survival. *Curr Top Microbiol Immunol* 246 (1999) 63-68; discussion 69.
- Carroll, M.C., The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5 (2004) 981-986.
- Carsetti, R., Di Sabatino, A., Rosado, M.M., Cascioli, S., Piano Mortari, E., Milito, C., Grimsholm, O., Aranburu, A., Giorda, E., Tinozzi, F.P., Pulvirenti, F., Donato, G., Morini, F., Bagolan, P., Corazza, G.R., und Quinti, I., Lack of Gut Secretory Immunoglobulin A in Memory B-Cell Dysfunction-Associated Disorders: A Possible Gut-Spleen Axis. *Front Immunol* 10 (2019) 2937.
- Carsetti, R., Pantosti, A., und Quinti, I., Impairment of the antipolysaccharide response in splenectomized patients is due to the lack of immunoglobulin M memory B cells. *J Infect Dis* 193 (2006) 1189-1190.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., Donnanno, S., Guazzi, V., Soresina, A., Meini, A., Plebani, A., Aiuti, F., und Quinti, I., The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 115 (2005) 412-417.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., und Nussenzweig, M.C., Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291 (2001) 1541-1544.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., und Rajewsky, K., B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5 (2004) 317-327.
- Cerutti, A., Cols, M., und Puga, I., Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13 (2013) 118-132.
- Chao, M.P., Seita, J., und Weissman, I.L., Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73 (2008) 439-449.
- Charles, E.D., Brunetti, C., Marukian, S., Ritola, K.D., Talal, A.H., Marks, K., Jacobson, I.M., Rice, C.M., und Dustin, L.B., Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21low B-cell subset. *Blood* 117 (2011) 5425-5437.
- Chaudhuri, J., und Alt, F.W., Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 541-552.
- Chen, C., Nagy, Z., Prak, E.L., und Weigert, M., Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* 3 (1995a) 747-755.
- Chen, C., Nagy, Z., Radic, M.Z., Hardy, R.R., Huszar, D., Camper, S.A., und Weigert, M., The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* 373 (1995b) 252-255.

- Chen, J., Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 32 (2004) 1025-1032.
- Chen, Z., Cox, K.S., Tang, A., Roman, J., Fink, M., Kaufhold, R.M., Guan, L., Xie, A., Boddicker, M.A., McGuinness, D., Xiao, X., Li, H., Skinner, J.M., Verch, T., Retzlaff, M., und Vora, K.A., Human monoclonal antibodies isolated from a primary pneumococcal conjugate Vaccinee demonstrates the expansion of an antigen-driven Hypermutated memory B cell response. *BMC Infect Dis* 18 (2018) 613.
- Chi, V.L.D., Garaud, S., De Silva, P., Thibaud, V., Stamatopoulos, B., Berehad, M., Gu-Trantien, C., Krayem, M., Duvillier, H., Lodewyckx, J.N., Willard-Gallo, K., Sibille, C., und Bron, D., Age-related changes in the BACH2 and PRDM1 genes in lymphocytes from healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer* 19 (2019) 81.
- Chong, Y., Ikematsu, H., Yamaji, K., Nishimura, M., Nabeshima, S., Kashiwagi, S., und Hayashi, J., CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol* 17 (2005) 383-390.
- Chorny, A., Casas-Recasens, S., Sintes, J., Shan, M., Polentarutti, N., Garcia-Escudero, R., Walland, A.C., Yeiser, J.R., Cassis, L., Carrillo, J., *et al.*, The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. *J Exp Med* 213 (2016) 2167-2185.
- Chu, S.Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G.L., Lazar, G.A., Pong, E., Joyce, P.F., Szymkowski, D.E., und Desjarlais, J.R., Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol Immunol* 45 (2008) 3926-3933.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Jr., und Cyster, J.G., Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9 (2008) 54-62.
- Coffman, R.L., und Cohn, M., The class of surface immunoglobulin on virgin and memory B lymphocytes. *J Immunol* 118 (1977) 1806-1815.
- Colino, J., Shen, Y., und Snapper, C.M., Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med* 195 (2002) 1-13.
- Colombo, M., Cutrona, G., Reverberi, D., Bruno, S., Ghiotto, F., Tenca, C., Stamatopoulos, K., Hadzidimitriou, A., Ceccarelli, J., Salvi, S., Boccardo, S., Calevo, M.G., De Santanna, A., Truini, M., Fais, F., und Ferrarini, M., Expression of immunoglobulin receptors with distinctive features indicating antigen selection by marginal zone B cells from human spleen. *Mol Med* 19 (2013) 294-302.
- Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Vitello, S., Lio, D., Candore, G., und Caruso, C., B cell immunosenescence in the elderly and in centenarians. *Rejuvenation Res* 11 (2008) 433-439.
- Cols, M., Barra, C.M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D.M., Dillon, S.R., Leonard, J.P., Furman, R.R., Chen, K., und Cerutti, A., Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol* 188 (2012) 6071-6083.
- Cooper, M.D., Peterson, R.D., und Good, R.A., Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* 205 (1965) 143-146.
- Corces, M.R., Buenrostro, J.D., Wu, B., Greenside, P.G., Chan, S.M., Koenig, J.L., Snyder, M.P., Pritchard, J.K., Kundaje, A., Greenleaf, W.J., Majeti, R., und Chang, H.Y., Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet* 48 (2016) 1193-1203.
- Corti, D., Cameroni, E., Guarino, B., Kallewaard, N.L., Zhu, Q., und Lanzavecchia, A., Tackling influenza with broadly neutralizing antibodies. *Curr Opin Virol* 24 (2017) 60-69.
- Crotty, S., Felgner, P., Davies, H., Glidewell, J., Villarreal, L., und Ahmed, R., Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 171 (2003) 4969-4973.
- Csárdi, G., und Nepusz, T., igraph -The network analysis package (R package version 0.8.2). <https://igraph.org/r/> (2020a).
- Csárdi, G., und Nepusz, T., igraph -The network analysis package (R package version 0.8.2). (2020b).
- Cyster, J.G., Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 127-159.

- Cyster, J.G., und Allen, C.D.C., B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 177 (2019) 524-540.
- Cyster, J.G., Dang, E.V., Reboldi, A., und Yi, T., 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 14 (2014) 731-743.
- Cyster, J.G., Hartley, S.B., und Goodnow, C.C., Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371 (1994) 389-395.
- Daeron, M., Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15 (1997) 203-234.
- Dahlgren, C., und Karlsson, A., Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232 (1999) 3-14.
- Dauby, N., Kummert, C., Lecomte, S., Liesnard, C., Delforge, M.L., Donner, C., und Marchant, A., Primary human cytomegalovirus infection induces the expansion of virus-specific activated and atypical memory B cells. *J Infect Dis* 210 (2014) 1275-1285.
- Davies, D.R., und Metzger, H., Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* 1 (1983) 87-117.
- de Kruif, J., Kramer, A., Visser, T., Clements, C., Nijhuis, R., Cox, F., van der Zande, V., Smit, R., Pinto, D., Throsby, M., und Logtenberg, T., Human immunoglobulin repertoires against tetanus toxoid contain a large and diverse fraction of high-affinity promiscuous V(H) genes. *J Mol Biol* 387 (2009) 548-558.
- De Silva, N.S., und Klein, U., Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15 (2015) 137-148.
- De Smet, K., und Contreras, R., Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27 (2005) 1337-1347.
- de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G., und MacLennan, I.C., Germinal centers without T cells. *J Exp Med* 191 (2000) 485-494.
- Debock, I., und Flamand, V., Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. *Front Immunol* 5 (2014) 393.
- Debock, I., Jaworski, K., Chadlaoui, H., Delbaue, S., Passon, N., Twyffels, L., Leo, O., und Flamand, V., Neonatal follicular Th cell responses are impaired and modulated by IL-4. *J Immunol* 191 (2013) 1231-1239.
- Decanniere, K., Muyldermans, S., und Wyns, L., Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J Mol Biol* 300 (2000) 83-91.
- Defrance, T., Taillardet, M., und Genestier, L., T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 23 (2011) 330-336.
- DeFranco, A.L., Richards, J.D., Blum, J.H., Stevens, T.L., Law, D.A., Chan, V.W., Datta, S.K., Foy, S.P., Hourihane, S.L., Gold, M.R., und et al., Signal transduction by the B-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 766 (1995) 195-201.
- DeKosky, B.J., Ippolito, G.C., Deschner, R.P., Lavinder, J.J., Wine, Y., Rawlings, B.M., Varadarajan, N., Giesecke, C., Dorner, T., Andrews, S.F., Wilson, P.C., Hunicke-Smith, S.P., Willson, C.G., Ellington, A.D., und Georgiou, G., High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nat Biotechnol* 31 (2013) 166-169.
- Della Valle, L., Dohmen, S.E., Verhagen, O.J., Berkowska, M.A., Vidarsson, G., und Ellen van der Schoot, C., The majority of human memory B cells recognizing RhD and tetanus resides in IgM+ B cells. *J Immunol* 193 (2014) 1071-1079.
- Descatoire, M., Weller, S., Irtan, S., Sarnacki, S., Feuillard, J., Storck, S., Guiochon-Mantel, A., Bouligand, J., Morali, A., Cohen, J., Jacquemin, E., Iascone, M., Bole-Feysot, C., Cagnard, N., Weill, J.-C., und Reynaud, C.-A., Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J Exp Med* 211 (2014) 987-1000.
- Di Niro, R., Mesin, L., Raki, M., Zheng, N.Y., Lund-Johansen, F., Lundin, K.E., Charpilienne, A., Poncet, D., Wilson, P.C., und Sollid, L.M., Rapid generation of rotavirus-specific human monoclonal antibodies from small-intestinal mucosa. *J Immunol* 185 (2010) 5377-5383.
- Di Noia, J.M., und Neuberger, M.S., Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76 (2007) 1-22.
- Di Sabatino, A., Carsetti, R., und Corazza, G.R., Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet* 378 (2011) 86-97.
- Diebolder, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J., van de Winkel, J.G., Wilson, I.A., Koster, A.J., Taylor, R.P., Saphire, E.O., Burton, D.R., Schuurman, J., Gros, P., und Parren, P.W.,

- Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 343 (2014) 1260-1263.
- Dono, M., Zupo, S., Leanza, N., Melioli, G., Fogli, M., Melagrana, A., Chiorazzi, N., und Ferrarini, M., Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. *J Immunol* 164 (2000) 5596-5604.
- Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., und Spencer, J., Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med* 182 (1995) 559-566.
- Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., und Spencer, J., Sequence analysis of rearranged IgVH genes from microdissected human Peyer's patch marginal zone B cells. *Immunology* 88 (1996) 618-624.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., und Hood, L., An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19 (1980a) 981-992.
- Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R., und Hood, L., Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* 20 (1980b) 313-319.
- Eaton, S.M., Burns, E.M., Kusser, K., Randall, T.D., und Haynes, L., Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *J Exp Med* 200 (2004) 1613-1622.
- Edgren, G., Almqvist, R., Hartman, M., und Utter, G.H., Splenectomy and the risk of sepsis: a population-based cohort study. *Ann Surg* 260 (2014) 1081-1087.
- Edwards, K.M., Maternal antibodies and infant immune responses to vaccines. *Vaccine* 33 (2015) 6469-6472.
- Effros, R.B., Dagarag, M., Spaulding, C., und Man, J., The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 205 (2005) 147-157.
- Ehlich, A., Martin, V., Muller, W., und Rajewsky, K., Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 4 (1994) 573-583.
- Ehrhardt, G.R., Hsu, J.T., Gartland, L., Leu, C.M., Zhang, S., Davis, R.S., und Cooper, M.D., Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med* 202 (2005) 783-791.
- Einhorn, M.S., Weinberg, G.A., Anderson, E.L., Granoff, P.D., und Granoff, D.M., Immunogenicity in infants of Haemophilus influenzae type B polysaccharide in a conjugate vaccine with Neisseria meningitidis outer-membrane protein. *Lancet* 2 (1986) 299-302.
- Elhanati, Y., Sethna, Z., Marcou, Q., Callan, C.G., Jr., Mora, T., und Walczak, A.M., Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370 (2015).
- Ellyard, J.I., Avery, D.T., Mackay, C.R., und Tangye, S.G., Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol* 35 (2005) 699-708.
- Ettlinger, R., Sims, G.P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R.T., Grammer, A.C., Kuchen, S., und Lipsky, P.E., IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 178 (2007) 2872-2882.
- Facchetti, F., Appiani, C., Salvi, L., Levy, J., und Notarangelo, L.D., Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J Immunol* 154 (1995) 6624-6633.
- Fagraeus, A., Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Med. Scand.* (Suppl.) 204 (1948).
- Fasnacht, N., Huang, H.Y., Koch, U., Favre, S., Auderset, F., Chai, Q., Onder, L., Kallert, S., Pinschewer, D.D., MacDonald, H.R., Tacchini-Cottier, F., Ludewig, B., Luther, S.A., und Radtke, F., Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J Exp Med* 211 (2014) 2265-2279.
- Fazilleau, N., Eisenbraun, M.D., Malherbe, L., Ebright, J.N., Pogue-Caley, R.R., McHeyzer-Williams, L.J., und McHeyzer-Williams, M.G., Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat Immunol* 8 (2007) 753-761.

- Fecteau, J.F., Cote, G., und Neron, S., A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177 (2006) 3728-3736.
- Ferguson, A.R., Youd, M.E., und Corley, R.B., Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16 (2004) 1411-1422.
- Fijen, C.A., Kuijper, E.J., Tjia, H.G., Daha, M.R., und Dankert, J., Complement deficiency predisposes for meningitis due to nongroupable meningococci and Neisseria-related bacteria. *Clin Infect Dis* 18 (1994) 780-784.
- Footo, J.B., und Kearney, J.F., Generation of B cell memory to the bacterial polysaccharide alpha-1,3 dextran. *J Immunol* 183 (2009) 6359-6368.
- Forster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., und Lipp, M., A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87 (1996) 1037-1047.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., und De Benedictis, G., Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908 (2000) 244-254.
- Frasca, D., und Blomberg, B.B., Effects of aging on B cell function. *Curr Opin Immunol* 21 (2009) 425-430.
- Frippiat, J.P., Williams, S.C., Tomlinson, I.M., Cook, G.P., Cherif, D., Le Paslier, D., Collins, J.E., Dunham, I., Winter, G., und Lefranc, M.P., Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 4 (1995) 983-991.
- Frolich, D., Giesecke, C., Mei, H.E., Reiter, K., Daridon, C., Lipsky, P.E., und Dorner, T., Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *J Immunol* 185 (2010) 3103-3110.
- Fu, Y.X., und Chaplin, D.D., Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 399-433.
- Fujita, T., Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 346-353.
- Fulcher, D.A., und Basten, A., Influences on the lifespan of B cell subpopulations defined by different phenotypes. *Eur J Immunol* 27 (1997) 1188-1199.
- Gall, J.G., und Pardue, M.L., Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63 (1969) 378-383.
- Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P., und Abrignani, S., CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 197 (2003) 1051-1057.
- Galson, J.D., Truck, J., Fowler, A., Clutterbuck, E.A., Munz, M., Cerundolo, V., Reinhard, C., van der Most, R., Pollard, A.J., Lunter, G., und Kelly, D.F., Analysis of B Cell Repertoire Dynamics Following Hepatitis B Vaccination in Humans, and Enrichment of Vaccine-specific Antibody Sequences. *EBioMedicine* 2 (2015) 2070-2079.
- Gao, G.F., Tormo, J., Gerth, U.C., Wyer, J.R., McMichael, A.J., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., und Jakobsen, B.K., Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 387 (1997) 630-634.
- Garcia de Vinuesa, C., O'Leary, P., Sze, D.M., Toellner, K.M., und MacLennan, I.C., T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur J Immunol* 29 (1999) 1314-1323.
- Garcia, K.C., und Adams, E.J., How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* 122 (2005) 333-336.
- Garnier, S., viridis: Default Color Maps from 'matplotlib'. <https://CRAN.R-project.org/package=viridis> (Zugriff am 08. Sept. 2020) (2017).
- Garraud, O., Borhis, G., Badr, G., Degrelle, S., Pozzetto, B., Cognasse, F., und Richard, Y., Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunol* 13 (2012) 63.
- Gary-Gouy, H., Bruhns, P., Schmitt, C., Dalloul, A., Daeron, M., und Bismuth, G., The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem* 275 (2000) 548-556.
- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Dalloul, A., Donnadieu, E., und Bismuth, G., CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 168 (2002) 232-239.

- Gasque, P., Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41 (2004) 1089-1098.
- Geiger, H., und Van Zant, G., The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 3 (2002) 329-333.
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., und Hahne, F., *genefilter*: *genefilter*: methods for filtering genes from high-throughput experiments. R package version 1.72.0. doi: 10.18129/B9.bioc.genefilter (2020).
- George, A.J., und Ritter, M.A., Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 17 (1996) 267-272.
- Germain, R.N., MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76 (1994) 287-299.
- Getahun, A., und Heyman, B., Studies on the mechanism by which antigen-specific IgG suppresses primary antibody responses: evidence for epitope masking and decreased localization of antigen in the spleen. *Scand J Immunol* 70 (2009) 277-287.
- Ghia, P., Gratwohl, A., Signer, E., Winkler, T.H., Melchers, F., und Rolink, A.G., Immature B cells from human and mouse bone marrow can change their surface light chain expression. *Eur J Immunol* 25 (1995) 3108-3114.
- Ghraichy, M., Galson, J.D., Kovaltsuk, A., von Niederhausern, V., Pachlopnik Schmid, J., Recher, M., Jauch, A.J., Miho, E., Kelly, D.F., Deane, C.M., und Truck, J., Maturation of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Repertoire With Age. *Front Immunol* 11 (2020) 1734.
- Gibson, K.L., Wu, Y.C., Barnett, Y., Duggan, O., Vaughan, R., Kondeatis, E., Nilsson, B.O., Wikby, A., Kipling, D., und Dunn-Walters, D.K., B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging Cell* 8 (2009) 18-25.
- Giesecke, C., Frölich, D., Reiter, K., Mei, H.E., Wirries, I., Kuhly, R., Killig, M., Glatzer, T., Stölzel, K., Perka, C., Lipsky, P.E., und Dörner, T., Tissue Distribution and Dependence of Responsiveness of Human Antigen-Specific Memory B Cells. *J Immunol* 192 (2014) 3091-3100.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., und Mathis, D., Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261 (1993) 1175-1178.
- Gitlin, A.D., Shulman, Z., und Nussenzweig, M.C., Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509 (2014) 637-640.
- Gitlin, A.D., von Boehmer, L., Gazumyan, A., Shulman, Z., Oliveira, T.Y., und Nussenzweig, M.C., Independent Roles of Switching and Hypermutation in the Development and Persistence of B Lymphocyte Memory. *Immunity* 44 (2016) 769-781.
- Glass, D.R., Tsai, A.G., Oliveria, J.P., Hartmann, F.J., Kimmey, S.C., Calderon, A.A., Borges, L., Glass, M.C., Wagar, L.E., Davis, M.M., und Bendall, S.C., An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity* 53 (2020) 217-232 e215.
- Golub, R., Tan, J., Watanabe, T., und Brendolan, A., Origin and Immunological Functions of Spleen Stromal Cells. *Trends Immunol* 39 (2018) 503-514.
- Gomez, C.R., Boehmer, E.D., und Kovacs, E.J., The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* 17 (2005) 457-462.
- Good, K.L., Avery, D.T., und Tangye, S.G., Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 182 (2009) 890-901.
- Good, K.L., Bryant, V.L., und Tangye, S.G., Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 177 (2006) 5236-5247.
- Good, K.L., und Tangye, S.G., Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 13420-13425.
- Goodwin, K., Viboud, C., und Simonsen, L., Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 24 (2006) 1159-1169.
- Goossens, T., Klein, U., und Koppers, R., Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 2463-2468.
- Goronzy, J.J., und Weyand, C.M., T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 17 (2005) 468-475.
- Graf, R., Seagal, J., Otipoby, K.L., Lam, K.P., Ayoub, S., Zhang, B., Sander, S., Chu, V.T., und Rajewsky, K., BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science* 363 (2019) 748-753.

- Granato, A., Chen, Y., und Wesemann, D.R., Primary immunoglobulin repertoire development: time and space matter. *Curr Opin Immunol* 33 (2015) 126-131.
- Grawunder, U., Leu, T.M., Schatz, D.G., Werner, A., Rolink, A.G., Melchers, F., und Winkler, T.H., Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 3 (1995) 601-608.
- Gray, D., MacLennan, I.C., Bazin, H., und Khan, M., Migrant mu+ delta+ and static mu+ delta- B lymphocyte subsets. *Eur J Immunol* 12 (1982) 564-569.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A.A., Mages, H.W., Kroczeck, R.A., und Peter, H.H., Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4 (2003) 261-268.
- Gros, P., Milder, F.J., und Janssen, B.J., Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 48-58.
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., und Brors, B., circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30 (2014) 2811-2812.
- Guerrettaz, L.M., Johnson, S.A., und Cambier, J.C., Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11898-11902.
- Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., und Ravetch, J.V., Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1 (2000) 31-36.
- Gulino, A.V., und Notarangelo, L.D., Hyper IgM syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 15 (2003) 422-429.
- Hadders, M.A., Beringer, D.X., und Gros, P., Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science* 317 (2007) 1552-1554.
- Hahsler, M., und Nagar, A., rBLAST: Interface to the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://github.com/mhahsler/rBLAST> (2017).
- Haley, P.J., The lymphoid system: a review of species differences. *J Toxicol Pathol* 30 (2017) 111-123.
- Hammad, H., Vanderkerken, M., Pouliot, P., Deswarte, K., Toussaint, W., Vergote, K., Vandersarren, L., Janssens, S., Ramou, I., Savvides, S.N., Haigh, J.J., Hendriks, R., Kopf, M., Craessaerts, K., de Strooper, B., Kearney, J.F., Conrad, D.H., und Lambrecht, B.N., Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nat Immunol* 18 (2017) 313-320.
- Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., Hanifin, J.M., und Slifka, M.K., Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 9 (2003) 1131-1137.
- Hannoun, C., Megas, F., und Piercy, J., Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res* 103 (2004) 133-138.
- Hansen, K., Gentry, J., Long, L., Gentleman, R., Falcon, S., Hahne, F., und Sarkar, D., Rgraphviz: Provides plotting capabilities for R graph objects. (R package version 2.32.0). (2020a).
- Hansen, K., Gentry, J., Long, L., Gentleman, R., Falcon, S., Hahne, F., und Sarkar, D., Rgraphviz: Provides plotting capabilities for R graph objects. R package version 2.34.0. 10.18129/B9.bioc.Rgraphviz (2020b).
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., und Weaver, C.T., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6 (2005) 1123-1132.
- Hauser, A.E., Junt, T., Mempel, T.R., Sneddon, M.W., Kleinstein, S.H., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., Shlomchik, M.J., und Haberman, A.M., Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26 (2007) 655-667.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., und Aderem, A., The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410 (2001) 1099-1103.
- Haynes, L., und Eaton, S.M., The effect of age on the cognate function of CD4+ T cells. *Immunol Rev* 205 (2005) 220-228.
- Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Randall, T.D., und Swain, S.L., CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 15053-15058.

- Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., and Carroll, M.C., Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38 (2013) 1164-1175.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303 (2004) 1526-1529.
- Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Jr., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M., CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124 (2006) 915-927.
- Hendricks, J., Bos, N.A., and Kroese, F.G.M., Heterogeneity of Memory Marginal Zone B Cells. *Crit Rev Immunol* 38 (2018) 145-158.
- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P.M., Burgerhof, J.G., Bos, N.A., and Kroese, F.G., Class-switched marginal zone B cells in spleen have relatively low numbers of somatic mutations. *Mol Immunol* 48 (2011) 874-882.
- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P.M., Burgerhof, J.G.M., Bos, N.A., and Kroese, F.G.M., The formation of mutated IgM memory B cells in rat splenic marginal zones is an antigen dependent process. *PLoS One* 14 (2019) e0220933.
- Henry, C., Palm, A.E., Utset, H.A., Huang, M., Ho, I.Y., Zheng, N.Y., Fitzgerald, T., Neu, K.E., Chen, Y.Q., Krammer, F., Treanor, J.J., Sant, A.J., Topham, D.J., and Wilson, P.C., Monoclonal Antibody Responses after Recombinant Hemagglutinin Vaccine versus Subunit Inactivated Influenza Virus Vaccine: a Comparative Study. *J Virol* 93 (2019).
- Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A., Toward a layered immune system. *Cell* 59 (1989) 953-954.
- Hewitt, E.W., The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110 (2003) 163-169.
- Higo-Moriguchi, K., Akahori, Y., Iba, Y., Kurosawa, Y., and Taniguchi, K., Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J Virol* 78 (2004) 3325-3332.
- Hoffman, J.A., Mason, E.O., Schutze, G.E., Tan, T.Q., Barson, W.J., Givner, L.B., Wald, E.R., Bradley, J.S., Yogev, R., and Kaplan, S.L., Streptococcus pneumoniae infections in the neonate. *Pediatrics* 112 (2003) 1095-1102.
- Hojo, H., Sasaki, Y., Nakamura, N., and Abe, M., Absence of somatic hypermutation of immunoglobulin heavy chain variable region genes in precursor B-lymphoblastic lymphoma: a study of four cases in childhood and adolescence. *Am J Clin Pathol* 116 (2001) 673-682.
- Holers, V.M., Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol* 32 (2014) 433-459.
- Hollowood, K., and Macartney, J., Cell kinetics of the germinal center reaction--a stathmokinetic study. *Eur J Immunol* 22 (1992) 261-266.
- Hong, S., Zhang, Z., Liu, H., Tian, M., Zhu, X., Zhang, Z., Wang, W., Zhou, X., Zhang, F., Ge, Q., Zhu, B., Tang, H., Hua, Z., and Hou, B., B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4(+) T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity* 49 (2018) 695-708 e694.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M., and Normark, S., Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3 (2002) 1033-1040.
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J., Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 5 (2004) 638-644.
- Hughey, C.T., Brewer, J.W., Colosia, A.D., Rosse, W.F., and Corley, R.B., Production of IgM hexamers by normal and autoimmune B cells: implications for the physiologic role of hexameric IgM. *J Immunol* 161 (1998) 4091-4097.
- Hunt, D.W., Huppertz, H.I., Jiang, H.J., and Petty, R.E., Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 84 (1994) 4333-4343.
- Ihle, J.N., Cytokine receptor signalling. *Nature* 377 (1995) 591-594.
- IJspeert, H., van Schouwenburg, P.A., van Zessen, D., Pico-Knijnenburg, I., Driessen, G.J., Stubbs, A.P., and van der Burg, M., Evaluation of the Antigen-Experienced B-Cell Receptor Repertoire in Healthy Children and Adults. *Front Immunol* 7 (2016) 410.
- Ilardo, M.A., Moltke, I., Korneliussen, T.S., Cheng, J., Stern, A.J., Racimo, F., de Barros Damgaard, P., Sikora, M., Seguin-Orlando, A., Rasmussen, S., van den Munckhof, I.C.L., Ter Horst, R., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Salingkat, S., Nielsen, R., and Willerslev, E., Physiological and Genetic Adaptations to Diving in Sea Nomads. *Cell* 173 (2018) 569-580 e515.

- Inamine, A., Takahashi, Y., Baba, N., Miyake, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., und Abe, R., Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol* 17 (2005) 581-589.
- Insel, R.A., Varade, W.S., und Marin, E., Human splenic IgM immunoglobulin transcripts are mutated at high frequency. *Mol Immunol* 31 (1994) 383-392.
- Isnardi, I., Ng, Y.S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J.H., Cunningham-Rundles, C., und Meffre, E., Complement receptor 2/CD21-human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 115 (2010) 5026-5036.
- Jacob, J., und Kelsoe, G., In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176 (1992) 679-687.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., und Weiss, U., Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354 (1991) 389-392.
- Janeway, C.A., Jr., und Medzhitov, R., Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20 (2002) 197-216.
- Janssen, B.J., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J.D., und Gros, P., Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444 (2006) 213-216.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., und Lee, J.O., Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130 (2007) 1071-1082.
- Johansen, F.E., und Kaetzel, C.S., Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 4 (2011) 598-602.
- Johnson, G., und Wu, T.T., Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 214-218.
- Joo, H.M., He, Y., und Sangster, M.Y., Broad dispersion and lung localization of virus-specific memory B cells induced by influenza pneumonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 3485-3490.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., und Takemori, T., Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med* 209 (2012) 2079-2097.
- Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J.E., Zhang, J., Siraganian, R.P., und Krystal, G., Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 14 (2001) 801-811.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K., Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184 (1996) 1495-1505.
- Karasuyama, H., Rolink, A., Shinkai, Y., Young, F., Alt, F.W., und Melchers, F., The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 77 (1994) 133-143.
- Kashimura, M., The human spleen as the center of the blood defense system. *Int J Hematol* 112 (2020) 147-158.
- Kassambara, A., ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots (R package version 0.4.0). <https://github.com/kassambara/ggpubr> (2020).
- Kaufmann, S.H., Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 9 (2008) 705-712.
- Kaur, K., Zheng, N.Y., Smith, K., Huang, M., Li, L., Pauli, N.T., Henry Dunand, C.J., Lee, J.H., Morrissey, M., Wu, Y., *et al.*, High Affinity Antibodies against Influenza Characterize the Plasmablast Response in SLE Patients After Vaccination. *PLoS One* 10 (2015) e0125618.
- Kibler, A., Budeus, B., Homp, E., Bronischewski, K., Berg, V., Sellmann, L., Murke, F., Heinold, A., Heinemann, F., Lindemann, M., Bekerredjian-Ding, I., Horn, P., Kirschning, C., Küppers, R., und Seifert, M., Systematic memory B cell archiving and random display shape the human splenic marginal zone throughout life. *Journal of Experimental Medicine* (2021).
- Kim, J., Kim, D.W., Chang, W., Choe, J., Kim, J., Park, C.S., Song, K., und Lee, I., Wnt5a is secreted by follicular dendritic cells to protect germinal center B cells via Wnt/Ca2+/NFAT/NF-kappaB-B cell lymphoma 6 signaling. *J Immunol* 188 (2012) 182-189.

- Kirkland, J.L., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Han, J., und Karagiannides, I., Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 37 (2002) 757-767.
- Kirschning, C.J., und Bauer, S., Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int J Med Microbiol* 291 (2001) 251-260.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., und Rajewsky, K., A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350 (1991) 423-426.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., und Okada, T., Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34 (2011) 961-972.
- Klein, J.O., The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis* 3 (1981) 246-253.
- Klein, U., und Dalla-Favera, R., Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 22-33.
- Klein, U., Küppers, R., und Rajewsky, K., Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med* 180 (1994) 1383-1393.
- Klein, U., Küppers, R., und Rajewsky, K., Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89 (1997) 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K., und Küppers, R., Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188 (1998) 1679-1689.
- Kleinfield, R., Hardy, R.R., Tarlinton, D., Dangl, J., Herzenberg, L.A., und Weigert, M., Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segment in a Ly 1+ B-cell lymphoma. *Nature* 322 (1986) 843-846.
- Koethe, S., Zander, L., Koster, S., Annan, A., Ebenfelt, A., Spencer, J., und Bemark, M., Pivotal advance: CD45RB glycosylation is specifically regulated during human peripheral B cell differentiation. *J Leukoc Biol* 90 (2011) 5-19.
- Kohler, S., Wagner, U., Pierer, M., Kimmig, S., Oppmann, B., Mowes, B., Julke, K., Romagnani, C., und Thiel, A., Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol* 35 (2005) 1987-1994.
- Kolde, R., pheatmap: Pretty Heatmaps. <http://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>. (Zugriff am 08. Sept. 2020) (2018).
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., und Alt, F.W., Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261 (1993) 1171-1175.
- Konopka, T., umap: Uniform Manifold Approximation and Projection. <https://github.com/tkonopka/umap/> (2020).
- Koopman, G., Keehnen, R.M., Lindhout, E., Newman, W., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., de Groot, C., und Pals, S.T., Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 152 (1994) 3760-3767.
- Kosco, M.H., Burton, G.F., Kapasi, Z.F., Szakal, A.K., und Tew, J.G., Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing. *Immunology* 68 (1989) 312-318.
- Kraal, G., Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 132 (1992) 31-74.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., und Klinman, D.M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374 (1995) 546-549.
- Kroczek, R.A., Graf, D., Brugnani, D., Giliani, S., Korthuer, U., Ugazio, A., Senger, G., Mages, H.W., Villa, A., und Notarangelo, L.D., Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev* 138 (1994) 39-59.
- Kruetzmann, S., Rosado, M.M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H.H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., Quinti, I., und Carsetti, R., Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 197 (2003) 939-945.
- Kruschinski, C., Zidan, M., Debertain, A.S., von Horsten, S., und Pabst, R., Age-dependent development of the splenic marginal zone in human infants is associated with different causes of death. *Hum Pathol* 35 (2004) 113-121.

- Kumararatne, D.S., Bazin, H., und MacLennan, I.C., Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. *Eur J Immunol* 11 (1981) 858-864.
- Küppers, R., und Hansmann, M.L., The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005) 511-517.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., und Hansmann, M.L., Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10962-10966.
- Kurupati, R.K., Haut, L.H., Schmader, K.E., und Ertl, H.C., Age-related changes in B cell metabolism. *Aging (Albany NY)* 11 (2019) 4367-4381.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (2001) 860-921.
- Lansdorp, P.M., Dragowska, W., Thomas, T.E., Little, M.T., und Mayani, H., Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates. *Blood Cells* 20 (1994) 376-380; discussion 380-371.
- Lavinder, J.J., Horton, A.P., Georgiou, G., und Ippolito, G.C., Next-generation sequencing and protein mass spectrometry for the comprehensive analysis of human cellular and serum antibody repertoires. *Curr Opin Chem Biol* 24 (2015) 112-120.
- Lavinder, J.J., Wine, Y., Giesecke, C., Ippolito, G.C., Horton, A.P., Lungu, O.I., Hoi, K.H., DeKosky, B.J., Murrin, E.M., Wirth, M.M., Ellington, A.D., Dorner, T., Marcotte, E.M., Boutz, D.R., und Georgiou, G., Identification and characterization of the constituent human serum antibodies elicited by vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014) 2259-2264.
- LeBien, T.W., und Tedder, T.F., B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112 (2008) 1570-1580.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., und Hoffmann, J.A., The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996) 973-983.
- Lettau, M., Wiedemann, A., Schrezenmeier, E.V., Giesecke-Thiel, C., und Dorner, T., Human CD27+ memory B cells colonize a superficial follicular zone in the palatine tonsils with similarities to the spleen. A multicolor immunofluorescence study of lymphoid tissue. *PLoS One* 15 (2020) e0229778.
- Levy, O., Coughlin, M., Cronstein, B.N., Roy, R.M., Desai, A., und Wessels, M.R., The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 177 (2006) 1956-1966.
- Lewis, S.M., Williams, A., und Eisenbarth, S.C., Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* 4 (2019).
- Li, H., Borrego, F., Nagata, S., und Tolnay, M., Fc Receptor-like 5 Expression Distinguishes Two Distinct Subsets of Human Circulating Tissue-like Memory B Cells. *J Immunol* 196 (2016) 4064-4074.
- Li, M.O., Sanjabi, S., und Flavell, R.A., Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25 (2006) 455-471.
- Li, Y.S., Hayakawa, K., und Hardy, R.R., The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med* 178 (1993) 951-960.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., und Davies, D.R., Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320 (2008) 379-381.
- Liu, Y.J., Oldfield, S., und MacLennan, I.C., Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol* 18 (1988) 355-362.
- Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y., und MacLennan, I.C., Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21 (1991) 2951-2962.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., und Carsetti, R., B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190 (1999) 75-89.
- Longo, N.S., Lugar, P.L., Yavuz, S., Zhang, W., Krijger, P.H., Russ, D.E., Jima, D.D., Dave, S.S., Grammer, A.C., und Lipsky, P.E., Analysis of somatic hypermutation in X-linked hyper-

- IgM syndrome shows specific deficiencies in mutational targeting. *Blood* 113 (2009) 3706-3715.
- Looney, R.J., Hasan, M.S., Coffin, D., Campbell, D., Falsey, A.R., Kolassa, J., Agosti, J.M., Abraham, G.N., und Evans, T.G., Hepatitis B immunization of healthy elderly adults: relationship between naive CD4+ T cells and primary immune response and evaluation of GM-CSF as an adjuvant. *J Clin Immunol* 21 (2001) 30-36.
- Love, M.I., Huber, W., und Anders, S., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15 (2014) 550.
- Lu, T.T., und Cyster, J.G., Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 297 (2002) 409-412.
- Ma, C.S., Pittaluga, S., Avery, D.T., Hare, N.J., Maric, I., Klion, A.D., Nichols, K.E., und Tangye, S.G., Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 116 (2006) 322-333.
- Ma, Y.C., Lee, W.I., Shyur, S.D., Lin, S.C., Huang, L.H., und Wu, J.Y., De novo mutation causing X-linked hyper-IgM syndrome: a family study in Taiwan. *Asian Pac J Allergy Immunol* 23 (2005) 53-59.
- Macallan, D.C., Wallace, D.L., Zhang, Y., Ghattas, H., Asquith, B., de Lara, C., Worth, A., Panayiotakopoulos, G., Griffin, G.E., Tough, D.F., und Beverley, P.C., B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells. *Blood* 105 (2005) 3633-3640.
- MacLennan, I.C., Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 117-139.
- Magri, G., Miyajima, M., Bascones, S., Mortha, A., Puga, I., Cassis, L., Barra, C.M., Comerma, L., Chudnovskiy, A., Gentile, M., Llige, D., Cols, M., Serrano, S., Arostegui, J.I., Juan, M., Yague, J., Merad, M., Fagarasan, S., und Cerutti, A., Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol* 15 (2014) 354-364.
- Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L., und Rabbitts, T.H., Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 4957-4961.
- Mamani-Matsuda, M., Cosma, A., Weller, S., Faili, A., Staib, C., Garcon, L., Hermine, O., Beyne-Rauzy, O., Fieschi, C., Pers, J.O., *et al.*, The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* 111 (2008) 4653-4659.
- Mandric, I., Rotman, J., Yang, H.T., Strauli, N., Montoya, D.J., Van Der Wey, W., Ronas, J.R., Statz, B., Yao, D., Petrova, V., Zelikovsky, A., Spreafico, R., Shifman, S., Zaitlen, N., Rossetti, M., Ansel, K.M., Eskin, E., und Mangul, S., Profiling immunoglobulin repertoires across multiple human tissues using RNA sequencing. *Nat Commun* 11 (2020) 3126.
- Marini, F., und Binder, H., pcaExplorer: an R/Bioconductor package for interacting with RNA-seq principal components. *BMC Bioinformatics* 20 (2019) 331.
- Martin, F., und Kearney, J.F., Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12 (2000) 39-49.
- Martin, F., und Kearney, J.F., Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 323-335.
- Martin, F., Oliver, A.M., und Kearney, J.F., Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14 (2001) 617-629.
- Martin, V., Bryan Wu, Y.C., Kipling, D., und Dunn-Walters, D., Ageing of the B-cell repertoire. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370 (2015).
- Mastelic, B., Kamath, A.T., Fontannaz, P., Tougne, C., Rochat, A.F., Belnoue, E., Combescure, C., Auderset, F., Lambert, P.H., Tacchini-Cottier, F., und Siegrist, C.A., Environmental and T cell-intrinsic factors limit the expansion of neonatal follicular T helper cells but may be circumvented by specific adjuvants. *J Immunol* 189 (2012) 5764-5772.
- Matsuda, F., und Honjo, T., Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv Immunol* 62 (1996) 1-29.
- Maurer, D., Fischer, G.F., Fae, I., Majdic, O., Stuhlmeier, K., Von Jeney, N., Holter, W., und Knapp, W., IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol* 148 (1992) 3700-3705.
- McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., und McHeyzer-Williams, M.G., Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat Immunol* 16 (2015) 296-305.

- McHeyzer-Williams, M.G., Nossal, G.J., und Lalor, P.A., Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* 350 (1991) 502-505.
- McKenzie, C.V., Colonne, C.K., Yeo, J.H., und Fraser, S.T., Splenomegaly: Pathophysiological bases and therapeutic options. *Int J Biochem Cell Biol* 94 (2018) 40-43.
- Mebius, R.E., und Kraal, G., Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 606-616.
- Mebius, R.E., Nolte, M.A., und Kraal, G., Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol* 24 (2004) 449-464.
- Mekori, Y.A., und Metcalfe, D.D., Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 173 (2000) 131-140.
- Melchers, F., ten Boekel, E., Yamagami, T., Andersson, J., und Rolink, A., The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol* 11 (1999) 307-317.
- Melegaro, A., und Edmunds, W.J., The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Part I. Efficacy of PPV in the elderly: a comparison of meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 19 (2004) 353-363.
- Meng, W., Zhang, B., Schwartz, G.W., Rosenfeld, A.M., Ren, D., Thome, J.J.C., Carpenter, D.J., Matsuoka, N., Lerner, H., Friedman, A.L., Granot, T., Farber, D.L., Shlomchik, M.J., Hershberg, U., und Luning Prak, E.T., An atlas of B-cell clonal distribution in the human body. *Nat Biotechnol* 35 (2017) 879-884.
- Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., und Cohen, I.R., Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest* 117 (2007) 712-718.
- Mesin, L., Schiepers, A., Ersching, J., Barbulescu, A., Cavazzoni, C.B., Angelini, A., Okada, T., Kurosaki, T., und Victora, G.D., Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting. *Cell* 180 (2020) 92-106 e111.
- Metchnikoff, E., und Binnie, F.G., *Immunity in infective diseases*, University Press, Cambridge,, 1905.
- Meyer-Hermann, M.E., Maini, P.K., und Iber, D., An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers. *Math Med Biol* 23 (2006) 255-277.
- Michaelsson, J., Mold, J.E., McCune, J.M., und Nixon, D.F., Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol* 176 (2006) 5741-5748.
- Miller, J.P., und Allman, D., The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol* 171 (2003) 2326-2330.
- Miller, R.A., Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* 18 (2000) 1654-1660.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., und Dorshkind, K., Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol Rev* 205 (2005) 7-17.
- Mitchell, R., Kelly, D.F., Pollard, A.J., und Truck, J., Polysaccharide-specific B cell responses to vaccination in humans. *Hum Vaccin Immunother* 10 (2014) 1661-1668.
- Miwa, Y., Hayashi, T., Suzuki, S., Abe, S., Onishi, I., Kirimura, S., Kitagawa, M., und Kurata, M., Up-regulated expression of CXCL12 in human spleens with extramedullary haematopoiesis. *Pathology* 45 (2013) 408-416.
- Moens, L., Wuyts, M., Meyts, I., De Boeck, K., und Bossuyt, X., Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response. *J Immunol* 181 (2008) 5306-5312.
- Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottlil, S., Arthos, J., Proschan, M.A., Chun, T.W., und Fauci, A.S., Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205 (2008) 1797-1805.
- Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., und Snapper, C.M., T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7 (1995) 349-354.
- Monroe, J.G., ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 283-294.
- Monroe, R.J., Seidl, K.J., Gaertner, F., Han, S., Chen, F., Sekiguchi, J., Wang, J., Ferrini, R., Davidson, L., Kelsoe, G., und Alt, F.W., RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 11 (1999) 201-212.
- Morbach, H., Eichhorn, E.M., Liese, J.G., und Girschick, H.J., Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 162 (2010) 271-279.

- Moriyama, Y., Sekine, C., Koyanagi, A., Koyama, N., Ogata, H., Chiba, S., Hirose, S., Okumura, K., und Yagita, H., Delta-like 1 is essential for the maintenance of marginal zone B cells in normal mice but not in autoimmune mice. *Int Immunol* 20 (2008) 763-773.
- Mosier, D.E., und Subbarao, B., Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol Today* 3 (1982) 217-222.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., und Coffman, R.L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (1986) 2348-2357.
- Mostov, K.E., Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 63-84.
- Müller, K., und Wickham, H., tibble: Simple Data Frames. R package version 1.3.3. <https://cloud.r-project.org/package=tibble> (2017).
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., und Honjo, T., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102 (2000) 553-563.
- Muretto, P., Immunohistochemical study of tonsils from newborn infants with emphasis on follicular dendritic reticulum cells. *Eur J Histochem* 42 (1998) 189-195.
- Murphy, K., und Weaver, C., *Janeway's Immunobiology*, Garland Science, 2016.
- Nakazawa M, Package 'fmsb' version 0.7.0., <http://minato.sip21c.org/msb/> (2019).
- Nandin, I.S., Fong, C., Deantonio, C., Torreno-Pina, J.A., Pecetta, S., Maldonado, P., Gasparrini, F., Ordovas-Montanes, J., Kazer, S.W., Kjaer, S., Borley, D.W., Nair, U., Coleman, J.A., Lingwood, D., Shalek, A.K., Meffre, E., Poignard, P., Burton, D.R., und Batista, F.D., Correction: Novel in vitro booster vaccination to rapidly generate antigen-specific human monoclonal antibodies. *J Exp Med* 214 (2017) 2811.
- Naylor, K., Li, G., Vallejo, A.N., Lee, W.W., Koetz, K., Bryl, E., Witkowski, J., Fulbright, J., Weyand, C.M., und Goronzy, J.J., The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 174 (2005) 7446-7452.
- Nestorowa, S., Hamey, F.K., Pijuan Sala, B., Diamanti, E., Shepherd, M., Laurenti, E., Wilson, N.K., Kent, D.G., und Gottgens, B., A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood* 128 (2016) e20-31.
- Netea, M.G., Dominguez-Andres, J., Barreiro, L.B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Mhlanga, M.M., Mulder, W.J.M., Riksen, N.P., Schlitzer, A., Schultze, J.L., Stabell Benn, C., Sun, J.C., Xavier, R.J., und Latz, E., Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 20 (2020) 375-388.
- Neuwirth, E., The RColorBrewer Package. <http://cran.r-project.org/package=rccolorbrewer> (Zugriff am 08. Sept. 2020) (2005).
- Nielsen, S.C.A., Roskin, K.M., Jackson, K.J.L., Joshi, S.A., Nejad, P., Lee, J.Y., Wagar, L.E., Pham, T.D., Hoh, R.A., Nguyen, K.D., Tsunemoto, H.Y., Patel, S.B., Tibshirani, R., Ley, C., Davis, M.M., Parsonnet, J., und Boyd, S.D., Shaping of infant B cell receptor repertoires by environmental factors and infectious disease. *Sci Transl Med* 11 (2019).
- Niewiesk, S., Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol* 5 (2014) 446.
- Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V., Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96 (2007) 179-204.
- Nociari, M.M., Telford, W., und Russo, C., Postthymic development of CD28-CD8+ T cell subset: age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol* 162 (1999) 3327-3335.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., und Dong, C., Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29 (2008) 138-149.
- Odegard, V.H., und Schatz, D.G., Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 573-583.
- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., und Kearney, J.F., Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 27 (1997) 2366-2374.
- Oliver, A.M., Martin, F., und Kearney, J.F., IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162 (1999) 7198-7207.

- Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., and Kobayashi, K., Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) 2485-2490.
- Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., Jones, P.P., and Kuby, J., *Kuby immunology*, W.H. Freeman, New York, 2013.
- Pabst, R., und Binns, R.M., In vivo labelling of the spleen and mesenteric lymph nodes with fluorescein isothiocyanate for lymphocyte migration studies. *Immunology* 44 (1981) 321-329.
- Pabst, R., und Trepel, F., The predominant role of the spleen in lymphocyte recirculation. I. Homing of lymphocytes to and release from the isolated perfused pig spleen. *Cell Tissue Kinet* 8 (1975) 529-541.
- Pabst, R., und Trepel, F., The predominant role of the spleen in lymphocyte recirculation. II. Pre- and postsplenectomy retransfusion studies in young pigs. *Cell Tissue Kinet* 9 (1976) 179-189.
- Pack, M., Trumpfheller, C., Thomas, D., Park, C.G., Granelli-Piperno, A., Munz, C., und Steinman, R.M., DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology* 123 (2008) 438-446.
- Palmer, S., Albergante, L., Blackburn, C.C., und Newman, T.J., Thymic involution and rising disease incidence with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018) 1883-1888.
- Pang, W.W., Price, E.A., Sahoo, D., Beerman, I., Maloney, W.J., Rossi, D.J., Schrier, S.L., und Weissman, I.L., Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 20012-20017.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., und Muller-Eberhard, H.J., Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154 (1981) 856-867.
- Papavasiliou, F., Misulovin, Z., Suh, H., und Nussenzweig, M.C., The role of Ig beta in precursor B cell transition and allelic exclusion. *Science* 268 (1995) 408-411.
- Pappas, L., Foglierini, M., Piccoli, L., Kallewaard, N.L., Turrini, F., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B., Agatic, G., Giacchetto-Sasselli, I., Pellicciotta, G., Sallusto, F., Zhu, Q., Vicenzi, E., Corti, D., und Lanzavecchia, A., Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature* 516 (2014) 418-422.
- Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H., und Lee, J.O., The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 (2009) 1191-1195.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., und Dong, C., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6 (2005) 1133-1141.
- Parren, P.W., und Burton, D.R., The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol* 77 (2001) 195-262.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., und Capra, J.D., Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 180 (1994) 329-339.
- Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., und Huber, W., EBImage--an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics* 26 (2010) 979-981.
- Paunio, M., Hedman, K., Davidkin, I., Valle, M., Heinonen, O.P., Leinikki, P., Salmi, A., und Peltola, H., Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. *Epidemiol Infect* 124 (2000) 263-271.
- Pettengill, M., Robson, S., Tresenriter, M., Millan, J.L., Usheva, A., Bingham, T., Belderbos, M., Bergelson, I., Burl, S., Kampmann, B., Gelinas, L., Kollmann, T., Bont, L., und Levy, O., Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem* 288 (2013) 27315-27326.
- Pettengill, M.A., und Levy, O., Circulating Human Neonatal Naive B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage. *Front Immunol* 7 (2016) 121.
- Pfister, G., Weiskopf, D., Lazuardi, L., Kovaïou, R.D., Cioca, D.P., Keller, M., Lorbeg, B., Parson, W., und Grubeck-Loebenstein, B., Naive T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci* 1067 (2006) 152-157.

- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., und Goodman, M.F., Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424 (2003) 103-107.
- Pihlgren, M., Tougne, C., Bozzotti, P., Fulurija, A., Duchosal, M.A., Lambert, P.H., und Siegrist, C.A., 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. *J Immunol* 170 (2003) 2824-2832.
- Pillai, S., und Cariappa, A., The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 767-777.
- Pleiman, C.M., D'Ambrosio, D., und Cambier, J.C., The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 15 (1994) 393-399.
- Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., und Casali, P., BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun* 3 (2012) 767.
- Portugal, S., Tipton, C.M., Sohn, H., Kone, Y., Wang, J., Li, S., Skinner, J., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Doumbo, O.K., Doumbo, S., Kayentao, K., Ongoiba, A., Traore, B., Sanz, I., Pierce, S.K., und Crompton, P.D., Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *Elife* 4 (2015).
- Poulsen, T.R., Jensen, A., Haurum, J.S., und Andersen, P.S., Limits for antibody affinity maturation and repertoire diversification in hypervaccinated humans. *J Immunol* 187 (2011) 4229-4235.
- Poulsen, T.R., Meijer, P.J., Jensen, A., Nielsen, L.S., und Andersen, P.S., Kinetic, affinity, and diversity limits of human polyclonal antibody responses against tetanus toxoid. *J Immunol* 179 (2007) 3841-3850.
- Pozo, A.L., Godfrey, E.M., und Bowles, K.M., Splenomegaly: investigation, diagnosis and management. *Blood Rev* 23 (2009) 105-111.
- PrabhuDas, M., Adkins, B., Gans, H., King, C., Levy, O., Ramilo, O., und Siegrist, C.A., Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol* 12 (2011) 189-194.
- Pradeu, T., und Du Pasquier, L., Immunological memory: What's in a name? *Immunol Rev* 283 (2018) 7-20.
- Prak, E.L., und Weigert, M., Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement. *J Exp Med* 182 (1995) 541-548.
- Proudfoot, A.E., Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 106-115.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., *et al.*, B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13 (2011) 170-180.
- Purtha, W.E., Tedder, T.F., Johnson, S., Bhattacharya, D., und Diamond, M.S., Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. *J Exp Med* 208 (2011) 2599-2606.
- Quiding, M., Nordstrom, I., Kilander, A., Andersson, G., Hanson, L.A., Holmgren, J., und Czerkinsky, C., Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 88 (1991) 143-148.
- Rajewsky, K., Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381 (1996) 751-758.
- Rakhmanov, M., Keller, B., Gutenberger, S., Foerster, C., Hoenig, M., Driessen, G., van der Burg, M., van Dongen, J.J., Wiech, E., Visentini, M., *et al.*, Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 13451-13456.
- Rechavi, E., Lev, A., Lee, Y.N., Simon, A.J., Yinon, Y., Lipitz, S., Amariglio, N., Weisz, B., Notarangelo, L.D., und Somech, R., Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development. *Sci Transl Med* 7 (2015) 276ra225.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., und Segal, A.W., Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux. *Nature* 416 (2002) 291-297.

- Reinherz, E.L., Tan, K., Tang, L., Kern, P., Liu, J., Xiong, Y., Hussey, R.E., Smolyar, A., Hare, B., Zhang, R., Joachimiak, A., Chang, H.C., Wagner, G., und Wang, J., The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286 (1999) 1913-1921.
- Reise Sousa, C., Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16 (2004) 21-25.
- Restifo, N.P., und Gattinoni, L., Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol* 25 (2013) 556-563.
- Reth, M., Gehrmann, P., Petrac, E., und Wiese, P., A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* 322 (1986) 840-842.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., *et al.*, Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102 (2000) 565-575.
- Reynaud, C.A., Bertocci, B., Dahan, A., und Weill, J.C., Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol* 57 (1994) 353-378.
- Reynaud, C.A., Garcia, C., Hein, W.R., und Weill, J.C., Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 80 (1995) 115-125.
- Rickert, R.C., Rajewsky, K., und Roes, J., Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376 (1995) 352-355.
- Riedel, R., Addo, R., Ferreira-Gomes, M., Heinz, G.A., Heinrich, F., Kummer, J., Greiff, V., Schulz, D., Klaeden, C., Cornelis, R., *et al.*, Discrete populations of isotype-switched memory B lymphocytes are maintained in murine spleen and bone marrow. *Nat Commun* 11 (2020) 2570.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., und Wall, R., Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* 20 (1980) 303-312.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., und Melchers, F., IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* 6 (1994) 1257-1264.
- Rother, M.B., Jensen, K., van der Burg, M., van de Bovenkamp, F.S., Kroek, R., van, I.W.F., van der Velden, V.H., Cupedo, T., Olstad, O.K., van Dongen, J.J., und van Zelm, M.C., Decreased IL7Ralpha and TdT expression underlie the skewed immunoglobulin repertoire of human B-cell precursors from fetal origin. *Sci Rep* 6 (2016) 33924.
- Roundy, K.M., Jacobson, A.C., Weis, J.J., und Weis, J.H., The in vitro derivation of phenotypically mature and diverse B cells from immature spleen and bone marrow precursors. *Eur J Immunol* 40 (2010) 1139-1149.
- Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., und Torres, R.M., TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J Immunol* 180 (2008a) 3882-3888.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., Muller, W., und Rudensky, A.Y., Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28 (2008b) 546-558.
- Russell, D.M., Dembic, Z., Morahan, G., Miller, J.F., Burki, K., und Nemazee, D., Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354 (1991) 308-311.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., und Hirai, H., Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18 (2003) 675-685.
- Sakaguchi, N., und Melchers, F., Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 324 (1986) 579-582.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., und Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 (1995) 1151-1164.

- Sandlund, J.T., und Martin, M.G., Non-Hodgkin lymphoma across the pediatric and adolescent and young adult age spectrum. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016 (2016) 589-597.
- Sankilampi, U., Isoaho, R., Bloigu, A., Kivela, S.L., und Leinonen, M., Effect of age, sex and smoking habits on pneumococcal antibodies in an elderly population. *Int J Epidemiol* 26 (1997) 420-427.
- Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., und Wilson, I.A., Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293 (2001) 1155-1159.
- Saravia, J., Chapman, N.M., und Chi, H., Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 16 (2019) 634-643.
- Schatz, D.G., V(D)J recombination. *Immunol Rev* 200 (2004) 5-11.
- Scheeren, F.A., Nagasawa, M., Weijer, K., Cupedo, T., Kirberg, J., Legrand, N., und Spits, H., T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med* 205 (2008) 2033-2042.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L., und June, C.H., Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96 (2000) 3490-3498.
- Schloerke, B., Crowley, J., und Cook, D., GGally: Extension to 'ggplot2'(R Package Version 1.3.1). <https://github.com/ggobi/ggally> (2017).
- Schneider, S., und Zacharias, M., Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol* 51 (2012) 66-72.
- Schraufstatter, I.U., Trieu, K., Sikora, L., Sriramarao, P., und DiScipio, R., Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol* 169 (2002) 2102-2110.
- Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., und Nussenzweig, M.C., A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med* 208 (2011) 1243-1252.
- Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., Earp, H.S., und Matsushima, G.K., Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411 (2001) 207-211.
- Segura, E., und Villadangos, J.A., Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 21 (2009) 105-110.
- Seifert, M., und Küppers, R., Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* 206 (2009) 2659-2669.
- Seifert, M., und Küppers, R., Human memory B cells. *Leukemia* 30 (2016) 2283-2292.
- Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., und Küppers, R., Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (2015) E546-555.
- Setliff, I., Shiakolas, A.R., Pilewski, K.A., Murji, A.A., Mapengo, R.E., Janowska, K., Richardson, S., Oosthuysen, C., Raju, N., Ronsard, L., *et al.*, High-Throughput Mapping of B Cell Receptor Sequences to Antigen Specificity. *Cell* 179 (2019) 1636-1646 e1615.
- Shapiro-Shelef, M., und Calame, K., Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 230-242.
- Sharp, A., Kukulansky, T., und Globerson, A., In vitro analysis of age-related changes in the developmental potential of bone marrow thymocyte progenitors. *Eur J Immunol* 20 (1990) 2541-2546.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., und Storb, U., Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280 (1998) 1750-1752.
- Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H.D., und Sugane, K., Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol* 108 (2003) 128-137.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., und Agematsu, K., Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 175 (2005) 3262-3267.

- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., und Nussenzweig, M.C., Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* 345 (2014) 1058-1062.
- Siegrist, C.A., Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 19 (2001) 3331-3346.
- Siegrist, C.A., und Aspinall, R., B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 185-194.
- Sims, R.V., Boyko, E.J., Maislin, G., Lipsky, B.A., und Schwartz, J.S., The role of age in susceptibility to pneumococcal infections. *Age Ageing* 21 (1992) 357-361.
- Sintes, J., Gentile, M., Zhang, S., Garcia-Carmona, Y., Magri, G., Cassis, L., Segura-Garzon, D., Ciociola, A., Grasset, E.K., Bascones, S., *et al.*, mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nat Commun* 8 (2017) 1462.
- Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., und Andre-Schmutz, I., A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J Exp Med* 204 (2007) 3085-3093.
- Skattum, L., van Deuren, M., van der Poll, T., und Truedsson, L., Complement deficiency states and associated infections. *Mol Immunol* 48 (2011) 1643-1655.
- Skibinski, G., Skibinska, A., Stewart, G.D., und James, K., Enhancement of terminal B lymphocyte differentiation in vitro by fibroblast-like stromal cells from human spleen. *Eur J Immunol* 28 (1998) 3940-3948.
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., und Ahmed, R., Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8 (1998) 363-372.
- Smith, J.P., Burton, G.F., Tew, J.G., und Szakal, A.K., Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev Immunol* 6 (1998) 285-294.
- Smith, K., Muther, J.J., Duke, A.L., McKee, E., Zheng, N.Y., Wilson, P.C., und James, J.A., Fully human monoclonal antibodies from antibody secreting cells after vaccination with Pneumovax(R)23 are serotype specific and facilitate opsonophagocytosis. *Immunobiology* 218 (2013) 745-754.
- Soenawan, E., Srivastava, I., Gupta, S., Kan, E., Janani, R., Kazzaz, J., Singh, M., Shreedhar, V., und Vajdy, M., Maintenance of long-term immunological memory by low avidity IgM-secreting cells in bone marrow after mucosal immunizations with cholera toxin adjuvant. *Vaccine* 22 (2004) 1553-1563.
- Song, H., und Cerny, J., Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 198 (2003) 1923-1935.
- Song, J., Lokmic, Z., Lammermann, T., Rolf, J., Wu, C., Zhang, X., Hallmann, R., Hannocks, M.J., Horn, N., Ruegg, M.A., Sonnenberg, A., Georges-Labouesse, E., Winkler, T.H., Kearney, J.F., Cardell, S., und Sorokin, L., Extracellular matrix of secondary lymphoid organs impacts on B-cell fate and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) E2915-2924.
- Song, W., Bomsel, M., Casanova, J., Vaerman, J.P., und Mostov, K., Stimulation of transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor by dimeric IgA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 163-166.
- Soto, C., Bombardi, R.G., Branchizio, A., Kose, N., Matta, P., Sevy, A.M., Sinkovits, R.S., Gilchuk, P., Finn, J.A., und Crowe, J.E., Jr., High frequency of shared clonotypes in human B cell receptor repertoires. *Nature* 566 (2019) 398-402.
- Spencer, J., Finn, T., Pulford, K.A., Mason, D.Y., und Isaacson, P.G., The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol* 62 (1985) 607-612.
- Spencer, J., Perry, M.E., und Dunn-Walters, D.K., Human marginal-zone B cells. *Immunol Today* 19 (1998) 421-426.
- Springer, T.A., Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (1990) 425-434.
- Srivastava, B., Quinn, W.J., 3rd, Hazard, K., Erikson, J., und Allman, D., Characterization of marginal zone B cell precursors. *J Exp Med* 202 (2005) 1225-1234.
- Steiniger, B., Barth, P., und Hellinger, A., The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol* 159 (2001) 501-512.
- Steiniger, B., Barth, P., Herbst, B., Hartnell, A., und Crocker, P.R., The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive

- macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* 92 (1997) 307-316.
- Steiniger, B., Ruttinger, L., und Barth, P.J., The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments. *J Histochem Cytochem* 51 (2003) 655-664.
- Steiniger, B., Timphus, E.M., und Barth, P.J., The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. *Histochem Cell Biol* 126 (2006) 641-648.
- Steiniger, B., Timphus, E.M., Jacob, R., und Barth, P.J., CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. *Immunol* 116 (2005) 429-442.
- Steiniger, B., Trabant, M., und Barth, P.J., The follicular dendritic cell network in secondary follicles of human palatine tonsils and spleens. *Histochem Cell Biol* 135 (2011) 327-336.
- Steiniger, B., Ulfig, N., Risse, M., und Barth, P.J., Fetal and early post-natal development of the human spleen: from primordial arterial B cell lobules to a non-segmented organ. *Histochem Cell Biol* 128 (2007) 205-215.
- Steiniger, B.S., Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunol* 145 (2015) 334-346.
- Steiniger, B.S., Ulrich, C., Berthold, M., Guthe, M., und Lobachev, O., Capillary networks and follicular marginal zones in human spleens. Three-dimensional models based on immunostained serial sections. *PLoS One* 13 (2018) e0191019.
- Steiniger, B.S., Wilhelmi, V., Seiler, A., Lampp, K., und Stachniss, V., Heterogeneity of stromal cells in the human splenic white pulp. Fibroblastic reticulum cells, follicular dendritic cells and a third superficial stromal cell type. *Immunol* 143 (2014) 462-477.
- Stewart, I.B., und McKenzie, D.C., The human spleen during physiological stress. *Sports Med* 32 (2002) 361-369.
- Strugnell, R.A., und Wijburg, O.L., The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* 8 (2010) 656-667.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoekius, M., Smibert, P., und Satija, R., Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177 (2019) 1888-1902 e1821.
- Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., und Strober, W., Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2 (1995) 507-521.
- Stuber, E., und Strober, W., The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med* 183 (1996) 979-989.
- Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., und Nakauchi, H., Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192 (2000) 1273-1280.
- Sullivan, R.T., Kim, C.C., Fontana, M.F., Feeney, M.E., Jagannathan, P., Boyle, M.J., Drakeley, C.J., Ssewanyana, I., Nankya, F., Mayanja-Kizza, H., Dorsey, G., und Greenhouse, B., FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with Plasmodium falciparum Exposure. *PLoS Pathog* 11 (2015) e1004894.
- Sun, Y., Park, M.K., Kim, J., Diamond, B., Solomon, A., und Nahm, M.H., Repertoire of human antibodies against the polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Infect Immun* 67 (1999) 1172-1179.
- Szakai, A.K., Kosco, M.H., und Tew, J.G., A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J Immunol* 140 (1988) 341-353.
- Szakai, A.K., Taylor, J.K., Smith, J.P., Kosco, M.H., Burton, G.F., und Tew, J.J., Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. *Anat Rec* 227 (1990) 475-485.
- Tabibian-Keissar, H., Hazanov, L., Schiby, G., Rosenthal, N., Rakovsky, A., Michaeli, M., Shahaf, G.L., Pickman, Y., Rosenblatt, K., Melamed, D., Dunn-Walters, D., Mehr, R., und Barshack, I., Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *Eur J Immunol* 46 (2016) 480-492.
- Takahama, Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 127-135.
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., und Rajewsky, K., Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol* 44 (2014) 1258-1264.
- Tan, J.B., Xu, K., Cretegnny, K., Visan, I., Yuan, J.S., Egan, S.E., und Guidos, C.J., Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches. *Immunity* 30 (2009) 254-263.

- Tangye, S.G., Avery, D.T., Deenick, E.K., und Hodgkin, P.D., Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* 170 (2003a) 686-694.
- Tangye, S.G., Avery, D.T., und Hodgkin, P.D., A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol* 170 (2003b) 261-269.
- Tangye, S.G., und Good, K.L., Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol* 179 (2007) 13-19.
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., und de Vries, J.E., Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 188 (1998) 1691-1703.
- Tangye, S.G., van de Weerd, B.C., Avery, D.T., und Hodgkin, P.D., CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur J Immunol* 32 (2002) 1640-1649.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., und Honjo, T., Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 3 (2002) 443-450.
- Tedford, K., Steiner, M., Koshutin, S., Richter, K., Tech, L., Eggers, Y., Jansing, I., Schilling, K., Hauser, A.E., Korthals, M., und Fischer, K.D., The opposing forces of shear flow and sphingosine-1-phosphate control marginal zone B cell shuttling. *Nat Commun* 8 (2017) 2261.
- Tian, C., Luskin, G.K., Dischert, K.M., Higginbotham, J.N., Shepherd, B.E., und Crowe, J.E., Jr., Immunodominance of the VH1-46 antibody gene segment in the primary repertoire of human rotavirus-specific B cells is reduced in the memory compartment through somatic mutation of nondominant clones. *J Immunol* 180 (2008) 3279-3288.
- Tierens, A., Delabie, J., Michiels, L., Vandenberghe, P., und De Wolf-Peeters, C., Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood* 93 (1999) 226-234.
- Timens, W., Boes, A., Rozeboom-Uiterwijk, T., und Poppema, S., Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J Immunol* 143 (1989) 3200-3206.
- Timens, W., Rozeboom, T., und Poppema, S., Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistological study. *Immunology* 60 (1987) 603-609.
- Toellner, K.M., Jenkinson, W.E., Taylor, D.R., Khan, M., Sze, D.M., Sansom, D.M., Vinuesa, C.G., und MacLennan, I.C., Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers. *J Exp Med* 195 (2002) 383-389.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., und Tokuhisa, T., Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17 (2002) 329-339.
- Trombetta, E.S., und Mellman, I., Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 975-1028.
- Truck, J., Ramasamy, M.N., Galson, J.D., Rance, R., Parkhill, J., Lunter, G., Pollard, A.J., und Kelly, D.F., Identification of antigen-specific B cell receptor sequences using public repertoire analysis. *J Immunol* 194 (2015) 252-261.
- Tull, T.J., Pitcher, M.J., Guesdon, W., Siu, J.H.Y., Lebrero-Fernandez, C., Zhao, Y., Petrov, N., Heck, S., Ellis, R., Dhami, P., *et al.*, Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. *J Exp Med* 218 (2021).
- Turner, J.S., Zhou, J.Q., Han, J., Schmitz, A.J., Rizk, A.A., Alsoussi, W.B., Lei, T., Amor, M., McIntire, K.M., Meade, P., *et al.*, Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. *Nature* 586 (2020) 127-132.
- Turner, V.M., und Mabbott, N.A., Ageing adversely affects the migration and function of marginal zone B cells. *Immunology* 151 (2017a) 349-362.
- Turner, V.M., und Mabbott, N.A., Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes. *Biogerontology* 18 (2017b) 723-738.
- Turvey, S.E., und Broide, D.H., Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) S24-32.
- Tzeng, S.J., Li, W.Y., und Wang, H.Y., FcγRIIB mediates antigen-independent inhibition on human B lymphocytes through Btk and p38 MAPK. *J Biomed Sci* 22 (2015) 87.
- Vajdy, M., Sethupathi, P., und Knight, K.L., Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J Immunol* 160 (1998) 2725-2729.

- van Dijk, D., Sharma, R., Nainys, J., Yim, K., Kathail, P., Carr, A.J., Burdziak, C., Moon, K.R., Chaffer, C.L., Pattabiraman, D., Bierende, B., Mazutis, L., Wolf, G., Krishnaswamy, S., and Pe'er, D., Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion. *Cell* 174 (2018) 716-729 e727.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., and Lansdorf, P.M., Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 9857-9860.
- Viant, C., Weymar, G.H.J., Escolano, A., Chen, S., Hartweger, H., Cipolla, M., Gazumyan, A., and Nussenzweig, M.C., Antibody Affinity Shapes the Choice between Memory and Germinal Center B Cell Fates. *Cell* 183 (2020) 1298-1311 e1211.
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C., Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143 (2010) 592-605.
- Vidya, M.K., Kumar, V.G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., and Bhatta, R., Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol* 37 (2018) 20-36.
- Vieira, P., and Rajewsky, K., Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help. *Int Immunol* 2 (1990) 487-494.
- Vono, M., Eberhardt, C.S., Auderset, F., Mastelic-Gavillet, B., Lemeille, S., Christensen, D., Andersen, P., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A., Maternal Antibodies Inhibit Neonatal and Infant Responses to Vaccination by Shaping the Early-Life B Cell Repertoire within Germinal Centers. *Cell Rep* 28 (2019) 1773-1784 e1775.
- Vossenkamper, A., Blair, P.A., Safinia, N., Fraser, L.D., Das, L., Sanders, T.J., Stagg, A.J., Sanderson, J.D., Taylor, K., Chang, F., Choong, L.M., D'Cruz, D.P., Macdonald, T.T., Lombardi, G., and Spencer, J., A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire. *J Exp Med* 210 (2013) 1665-1674.
- Wagner, H., Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunol* 91 (2006) 159-173.
- Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K.E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M., Roels, F., Wustefeld, T., Fischer, M., Teichmann, M., Zender, L., Wei, C.L., Sansom, O., Wolf, E., and Eilers, M., Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* 511 (2014) 483-487.
- Wang, C., Liu, Y., Xu, L.T., Jackson, K.J., Roskin, K.M., Pham, T.D., Laserson, J., Marshall, E.L., Seo, K., Lee, J.Y., Furman, D., Koller, D., Dekker, C.L., Davis, M.M., Fire, A.Z., and Boyd, S.D., Effects of aging, cytomegalovirus infection, and EBV infection on human B cell repertoires. *J Immunol* 192 (2014) 603-611.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.T., Ma, X.J., and Luo, Y., RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 14 (2012) 22-29.
- Wang, X., Cho, B., Suzuki, K., Xu, Y., Green, J.A., An, J., and Cyster, J.G., Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 208 (2011) 2497-2510.
- Ward, S.M., Phalora, P., Bradshaw, D., Leyendeckers, H., and Klenerman, P., Direct ex vivo evaluation of long-lived protective antiviral memory B cell responses against hepatitis B virus. *J Infect Dis* 198 (2008) 813-817.
- Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J.J., Orłowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., Draeger, R., Schlesier, M., Peter, H.H., and Grimbacher, B., Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107 (2006) 3045-3052.
- Wasserstrom, H., Bussell, J., Lim, L.C., and Cunningham-Rundles, C., Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy. *J Immunol* 181 (2008) 3684-3689.
- Weaver, C.T., and Unanue, E.R., The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol Today* 11 (1990) 49-55.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.H., Milner, E.C., and Sanz, I., A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178 (2007) 6624-6633.
- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., and Hood, L., The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* 283 (1980) 497-499.

- Weill, J.C., Weller, S., und Reynaud, C.A., Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27 (2009) 267-285.
- Weinberger, B., Herndler-Brandstetter, D., Schwanninger, A., Weiskopf, D., und Grubeck-Loebenstein, B., Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis* 46 (2008) 1078-1084.
- Weisel, F., und Shlomchik, M., Memory B Cells of Mice and Humans. *Annu Rev Immunol* 35 (2017) 255-284.
- Weiskopf, D., Weinberger, B., und Grubeck-Loebenstein, B., The aging of the immune system. *Transpl Int* 22 (2009) 1041-1050.
- Weksler, M.E., Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine* 18 (2000) 1624-1628.
- Weksler, M.E., und Szabo, P., The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol* 20 (2000) 240-249.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., Tchernia, G., Steiniger, B., Staudt, L.M., Casanova, J.L., Reynaud, C.A., und Weill, J.C., Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104 (2004) 3647-3654.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist, F.F., de Saint Basile, G.G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., und Weill, J.C., CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 1166-1170.
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J.C., und Reynaud, C.A., Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med* 205 (2008) 1331-1342.
- Weng, N.P., Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 24 (2006) 495-499.
- Westerga, J., und Timens, W., Immunohistological analysis of human fetal lymph nodes. *Scand J Immunol* 29 (1989) 103-112.
- White, H., und Gray, D., Analysis of immunoglobulin (Ig) isotype diversity and IgM/D memory in the response to phenyl-oxazolone. *J Exp Med* 191 (2000) 2209-2220.
- Whittle, H.C., Aaby, P., Samb, B., Jensen, H., Bennett, J., und Simondon, F., Effect of subclinical infection on maintaining immunity against measles in vaccinated children in West Africa. *Lancet* 353 (1999) 98-102.
- Wickham, H., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, <https://ggplot2.tidyverse.org>. (Zugriff am 08. Sept. 2020) (2016).
- Wickham, H., Francois, R., Henry, L., und Müller, K., *dplyr: A grammar of data manipulation*, R package version 0.4. <https://dplyr.tidyverse.org> (2015).
- Wickham, H., Henry, L., Luciani, T., Decorde, M., und Lise, V., *svglite: An SVG graphics device*, R Package Version 1.2. <https://github.com/r-lib/svglite> (2020).
- Willenbrock, K., Jungnickel, B., Hansmann, M.L., und Küppers, R., Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. *Eur J Immunol* 35 (2005) 3002-3007.
- Wilson, P.C., de Bouteiller, O., Liu, Y.J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D., und Pascual, V., Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187 (1998) 59-70.
- Wilson, S.S., Wiens, M.E., und Smith, J.G., Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol* 425 (2013) 4965-4980.
- Winkler, T.H., Rolink, A., Melchers, F., und Karasuyama, H., Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. *Eur J Immunol* 25 (1995) 446-450.
- Witte, C.L., und Witte, M.H., Circulatory dynamics of the spleen. *Lymphology* 16 (1983) 60-71.
- Wong, R., Belk, J.A., Govero, J., Uhrlaub, J.L., Reinartz, D., Zhao, H., Errico, J.M., D'Souza, L., Ripperger, T.J., Nikolich-Zugich, J., Shlomchik, M.J., Satpathy, A.T., Fremont, D.H., Diamond, M.S., und Bhattacharya, D., Affinity-Restricted Memory B Cells Dominate Recall Responses to Heterologous Flaviviruses. *Immunity* 53 (2020) 1078-1094 e1077.
- Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G.M., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W.I., *et al.*, Broadly cross-reactive antibodies dominate

- the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 208 (2011) 181-193.
- Wu, T.T., und Kabat, E.A., An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132 (1970) 211-250.
- Wu, Y.C., Kipling, D., Leong, H.S., Martin, V., Ademokun, A.A., und Dunn-Walters, D.K., High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 116 (2010) 1070-1078.
- Xu, G.J., Kula, T., Xu, Q., Li, M.Z., Vernon, S.D., Ndung'u, T., Ruxrungtham, K., Sanchez, J., Brander, C., Chung, R.T., O'Connor, K.C., Walker, B., Larman, H.B., und Elledge, S.J., Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science* 348 (2015) aaa0698.
- Yamaguchi, Y., Kim, H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I., und Arata, Y., Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. *J Immunol Methods* 181 (1995) 259-267.
- Yamane, H., und Paul, W.E., Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 69 (2012) 1577-1583.
- Yefenof, E., Sanders, V.M., Snow, E.C., Noelle, R.J., Oliver, K.G., Uhr, J.W., und Vitetta, E.S., Preparation and analysis of antigen-specific memory B cells. *J Immunol* 135 (1985) 3777-3784.
- Yoon, S.O., Zhang, X., Berner, P., Blom, B., und Choi, Y.S., Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* 183 (2009) 352-358.
- Yoshikawa, T.T., Perspective: aging and infectious diseases: past, present, and future. *J Infect Dis* 176 (1997) 1053-1057.
- Yoshikawa, T.T., Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clin Infect Dis* 30 (2000) 931-933.
- Yu, W., Misulovin, Z., Suh, H., Hardy, R.R., Jankovic, M., Yannoutsos, N., und Nussenzweig, M.C., Coordinate regulation of RAG1 and RAG2 by cell type-specific DNA elements 5' of RAG2. *Science* 285 (1999) 1080-1084.
- Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., Stevens, J., Wilson, I.A., Aguilar, P.V., Altschuler, E.L., Basler, C.F., und Crowe, J.E., Jr., Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455 (2008) 532-536.
- Yuan, D., Vitetta, E.S., und Kettman, J.R., Cell surface immunoglobulin. XX. Antibody responsiveness of subpopulations of B lymphocytes bearing different isotypes. *J Exp Med* 145 (1977) 1421-1435.
- Zandvoort, A., Lodewijk, M.E., de Boer, N.K., Dammers, P.M., Kroese, F.G., und Timens, W., CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells. *Tissue Antigens* 58 (2001) 234-242.
- Zarembek, K.A., und Godowski, P.J., Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168 (2002) 554-561.
- Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J.H.Y., Tull, T.J., Sanderson, J.D., Wu, Y.B., Zhou, J.Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., *et al.*, Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nat Commun* 9 (2018) 3857.
- Zheng, B., Han, S., Takahashi, Y., und Kelsoe, G., Immunosenescence and germinal center reaction. *Immunol Rev* 160 (1997) 63-77.
- Zhou, J., Lottenbach, K.R., Barenkamp, S.J., Lucas, A.H., und Reason, D.C., Recurrent variable region gene usage and somatic mutation in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 23F. *Infect Immun* 70 (2002) 4083-4091.
- Zhou, J., Lottenbach, K.R., Barenkamp, S.J., und Reason, D.C., Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 6B. *Infect Immun* 72 (2004) 3505-3514.
- Zhou, J.Q., und Kleinstein, S.H., Cutting Edge: Ig H Chains Are Sufficient to Determine Most B Cell Clonal Relationships. *J Immunol* 203 (2019) 1687-1692.
- Zinkernagel, R.M., und Doherty, P.C., Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248 (1974) 701-702.

Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., und Shlomchik, M.J., CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat Immunol* 15 (2014) 631-637.

Anhang

Tabelle 15: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen angereicherte Gengruppen (Auswahl).

Gengruppe: Bezeichnung der angereicherten Gengruppe in der GSEA-Datenbank. NES: *Normalized Enrichment Score*, NOM p-val: *Nominal P Value*, FDR q-val: *False Discovery Rate*, Vergleich: N: sMZ und PB-Naïve, M: sMZ und PB-MD27, C: sMZ und PB-CSW.

Gengruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val	Vergleich
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	3,18	0	0	N, M, C
NAGASHIMA_EGF_SIGNALING_UP	3,07	0	0	N, M, C
RYAN_MANTLE_CELL_LYMPHOMA_NOTCH_DIRECT_UP	3,02	0	0	N, M, C
GSE29617_CTRL_VS_DAY7_TIV_FLU_VACCINE_PBMC_2008_UP	2,80	0	0,001	N, M, C
OSWALD_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_IN_COLLAGEN_GEL_UP	2,65	0	0	M, C
REACTOME_CELLULAR_RESPONSES_TO_EXTERNAL_STIMULI	2,53	0	0	M
GSE36891_UNSTIM_VS_POLYIC_TLR3_STIM_PERITONEAL_MACROPHAGE_UP	2,51	0	0,005	M
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	2,49	0	0,001	N, M, C
MARZEC_IL2_SIGNALING_UP	2,47	0	0,008	N, M, C
REACTOME_PRE_NOTCH_EXPRESSION_AND_PROCESSING	2,45	0	0	N, M
DANG_MYC_TARGETS_UP	2,31	0	0,003	M, C
GO_REGULATION_OF_G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	2,27	0	0,046	N
REACTOME_SIGNALING_BY_NOTCH	2,21	0	0,004	N, M, C
GSE12366_NAIVE_VS_MEMORY_CELL_UP	2,21	0	0,069	C
GO_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_MEDIATED_SIGNALING_PATHWAY	2,17	0	0,086	N
DIRMEIER_LMP1_RESPONSE_EARLY	2,05	0,004	0,069	C
GO_INTEGRIN_BINDING	2,04	0	0,111	N
WP_IL18_SIGNALING_PATHWAY	2,02	0	0,037	N
GSE9988_LOW_LPS_VS_VEHICLE_TREATED_MONOCYTE_UP	1,99	0	0,113	C
GO_ENDOTHELIAL_CELL_MIGRATION	1,97	0	0,14	N
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_ENDOTHELIAL_CELL_MIGRATION	1,96	0,013	0,139	N
VILIMAS_NOTCH1_TARGETS_UP	1,94	0,007	0,049	N

GO_CELL_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	1,92	0,004	0,124	N
GSE22886_IGA_VS_IGM_MEMORY_BCELL_DN	1,91	0	0,156	C
GO_HOMOPHILIC_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	1,90	0,003	0,125	N
AFFAR_YY1_TARGETS_UP	1,88	0,007	0,021	M
REACTOME_SIGNALING_BY_WNT	1,87	0,007	0,022	M
GSE23925_LIGHT_ZONE_VS_NAIVE_BCELL_UP	1,83	0	0,086	M, N
PHONG_TNF_TARGETS_UP	1,83	0,008	0,083	N
GO_TISSUE_MIGRATION	1,82	0	0,152	N
BENPORATH_MYC_TARGETS_WITH_EBOX	1,80	0	0,031	M
GO_CELL_ADHESION_MEDIATED_BY_INTEGRIN	1,79	0,011	0,166	N
SCHUHMACHER_MYC_TARGETS_UP	1,77	0,009	0,101	N
GRAHAM_CML_DIVIDING_VS_NORMAL_QUIESCENT_UP	1,72	0,013	0,111	N
IL15_UP.V1_UP	1,65	0,038	0,17	M
SANA_TNF_SIGNALING_UP	1,65	0,01	0,14	N
REACTOME_SIGNALING_BY_INTERLEUKINS	1,63	0	0,062	M
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1,61	0,02	0,223	C
GSE42724_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_UP	1,61	0,008	0,185	N
FERNANDEZ_BOUND_BY_MYC	1,54	0,037	0,094	M
DER_IFN_GAMMA_RESPONSE_UP	1,54	0,057	0,201	N
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	1,44	0,056	0,134	N
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1,44	0,064	0,131	N
SUNG_METASTASIS_STROMA_UP	1,39	0,085	0,165	M
REACTOME_SIGNALING_BY_RECEPTOR_TYROSINE_KINASES	1,36	0,1	0,187	M

Tabelle 16: In Genexpressionsprofilen humaner sMZ-B-Zellen angereicherte Gengruppen (Auswahl).

Gengruppe: Bezeichnung der angereicherten Gengruppe in der GSEA-Datenbank. NES: *Normalized Enrichment Score*, NOM p-val: *Nominal P Value*, FDR q-val: *False Discovery Rate*, Vergleich: N: sMZ und PB-Naïve, M: sMZ und PB-MD27, C: sMZ und PB-CSW.

Gengruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val	Vergleich
GSE12366_NAIVE_VS_MEMORY_BCELL_UP	-3	0	0	N
GSE22886_NAIVE_VS_IGM_MEMORY_BCELL_UP	-2,97	0	0	N
GSE22886_NAIVE_VS_IGG_IGA_MEMORY_BCELL_UP	-2,9	0	0	N
GSE13411_NAIVE_VS_IGM_MEMORY_BCELL_UP	-2,86	0	0	N
GSE22886_IGA_VS_IGM_MEMORY_BCELL_UP	-2,76	0	0	C
GSE12845_IGD_POS_VS_NEG_BLOOD_BCELL_UP	-2,68	0	0	N
REACTOME_FCERI_MEDIATED_CA_2_MOBILIZATION	-2,16	0	0,01	N
HADDAD_B_LYMPHOCYTE_PROGENITOR	-2,16	0	0,011	N
BENPORATH_SUZ12_TARGETS	-2,16	0	0,074	C
REACTOME_CD22_MEDIATED_BCR_REGULATION	-2,13	0	0,014	N
GSE11961_MEMORY_BCELL_DAY7_VS_MEMORY_BCELL_DAY40_UP	-2,13	0	0	C
CHICAS_RB1_TARGETS_CONFLUENT	-2,09	0	0,054	M, C
YU_MYC_TARGETS_DN	-2,01	0	0,07	C
GSE22886_IGM_MEMORY_BCELL_VS_BM_PLASMA_CELL_UP	-1,95	0	0,037	M
BENPORATH_EED_TARGETS	-1,92	0	0,088	C
REACTOME_FCERI_MEDIATED_NF_KB_ACTIVATION	-1,91	0,001	0,06	N
REACTOME_FCGR_ACTIVATION	-1,87	0,005	0,084	N
GRAHAM_CML QUIESCENT_VS_NORMAL QUIESCENT_DN	-1,87	0,006	0,147	N
KONDO_EZH2_TARGETS	-1,85	0,005	0,116	C
GSE11961_UNSTIM_VS_ANTI_IGM_AND_CD40_STIM_6H_FOLLICULAR_BCELL_DN	-1,8	0,008	0,092	C
GSE13411_IGM_VS_SWITCHED_MEMORY_BCELL_DN	-1,8	0,003	0	C
REACTOME_FC_EPSILON_RECEPTOR_FCERI_SIGNALING	-1,79	0,004	0,135	N
REACTOME_FCGAMMA_RECEPTOR_FCGR_DEPENDENT_PHAGOCYTOSIS	-1,79	0,005	0,134	N
GSE11961_MEMORY_BCELL_DAY7_VS_GERMINAL_CENTER_BCELL_DAY7_UP	-1,75	0,005	0,111	M

BASSO_CD40_SIGNALING_DN	-1,73	0,01	0,154	N
GO_REGULATION_OF_CALCIUM_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORT	-1,95	0,003	0,207	N
GO_REGULATION_OF_CALCIUM_MEDIATED_SIGNALING	-1,87	0,004	0,261	N
GO_PHOSPHATIDYLINOSITOL_BINDING	-1,86	0,001	0,264	N
GO_REGULATION_OF_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORT	-1,85	0,002	0,233	N
GO_CALCIUM_ION_TRANSMEMBRANE_IMPORT_INTO_CYTOSOL	-1,81	0,003	0,314	N
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	-1,47	0,048	0,298	N, C
GO_SEQUESTERING_OF_CALCIUM_ION	-1,92	0,001	0,244	N
GO_VOLTAGE_GATED_ION_CHANNEL_ACTIVITY	-1,92	0,001	0,214	N
GO_CATION_CHANNEL_COMPLEX	-1,87	0,004	0,3	N
GO_REGULATION_OF_CYTOSOLIC_CALCIUM_ION_CONCENTRATION	-1,74	0,006	0,495	N
GO_PHOSPHOLIPID_BINDING	-1,76	0,005	0,467	N

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Mentor PD Dr. Marc Seifert für die Konzeption und Betreuung der vorliegenden Arbeit, konstruktive Kritik, stete Unterstützung und Lektionen in zahlreichen Themen außerhalb der Immunologie. Vielen Dank an Prof. Dr. Ralf Küppers für lehrreiche Diskussionen und einen zusätzlichen Blickwinkel auf wissenschaftliche Herausforderungen.

Ebenso möchte ich den Kollegen im Institut für Zellbiologie und im Besonderen den Mitgliedern der Nachwuchsgruppe „B-Zell-Immunologie und Lymphompathogenese“ sowie Eva Gau und Klaus Lennartz danken. Hervorheben möchte ich außerdem Dr. Bettina Budeus für die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit und manches Gespräch unter Frühaufstehern.

Meinen Dank ausdrücken möchte ich den Kooperationspartnern, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt haben: den Wissenschaftlern und technischen Assistenten der Transplantationsdiagnostik des Instituts für Transfusionsmedizin, des BioChip-Labors, der Arbeitsgruppe für Translationale Hautkrebsforschung, des Instituts für Pathologie, der Abteilung Mikrobiologie vom Paul-Ehrlich-Institut und namentlich Dr. Aparajita Singh und Dr. Florian Murke.

Einen besonderen Dank schulde ich meinen Eltern und Schwiegereltern, Geschwistern und Freunden für ihre Hilfsbereitschaft, Neugier, Unterstützung und ihren Rückhalt.

Schließlich bin ich meiner bezaubernden Verlobten und verständnisvollen Seelenverwandten Victoria sehr verbunden, herzlichen Dank für vieles.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse der Entwicklung, Zusammensetzung und Dynamik humaner splenischer Marginalzonen-B-Zellen im Altersverlauf“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Artur Kibler befürworte.

Essen, den _____

PD Dr. Marc Seifert

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Artur Kibler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Artur Kibler