

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

***B-Zellimmunität bei Primären Immundefekten  
wie den Class Switch Recombination (CSR)-Defekten  
und dem STAT3-Hyper-IgE-Syndrom***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carolin Evelyn Krätz

aus

München

Jahr

2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ellen D. Renner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinl

PD Dr. med. Tobias Herold

PD Dr. med. Reinhard Obst

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Beate Hagl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Krätz, Carolin Evelyn

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

B-Zellimmunität bei Primären Immundefekten  
wie den Class Switch Recombination (CSR)-Defekten  
und dem STAT3-Hyper-IgE-Syndrom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Geltendorf, 26.03.2022

Carolin Krätz

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Affidavit</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Publikationsliste</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>1. Beitrag zu den Publikationen</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 Beitrag zu Paper I: Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome ..... | 7         |
| 1.2 Beitrag zu Paper II: Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses .....  | 8         |
| <b>2. Einleitung</b> .....   | <b>9</b>  |
| 2.1 B-Zell-Immunität und Primäre Immundefekte .....  | 9         |
| 2.2 STAT3-Hyper-IgE-Syndrom .....  | 10        |
| 2.3 Class Switch Recombination (CSR)-Defekte .....   | 11        |
| 2.3.1 CD40L-Defekt .....   | 12        |
| 2.3.2 CD40-Defekt .....  | 12        |
| 2.3.3 AID-Defekt .....   | 13        |
| 2.3.4 UNG-Defekt .....   | 13        |
| 2.3.5 NEMO-Defekt .....  | 13        |
| 2.3.6 I $\kappa$ B $\alpha$ -Defekt .....  | 13        |
| 2.3.7 Weitere Gendefekte .....   | 14        |
| 2.4 Ausblick .....   | 14        |
| <b>3. Zusammenfassung:</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>4. Abstract (English):</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>5. Paper I</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>6. Paper II</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>Danksagung</b> .....  | <b>26</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |  |
|-----------------------|--|
| CSR                   | class switch recombination   |
| HIES                  | Hyper-IgE syndrome   |
| PBMC                  | peripheral blood mononuclear cell  |
| SHM                   | somatic hypermutation  |
| STAT                  | signal transducer and activator of transcription                                   |
| AID                   | Activation-Induced Cytidine Deaminase  |
| CD40L                 | CD40-ligand  |
| UNG                   | Uracil-DNA-Glycosylase   |
| NEMO/ IKK $\gamma$    | nuclear-factor kappa B essential modulator   |
| I $\kappa$ B $\alpha$ | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha |
| CSRD                  | class switch recombination defect  |
| HIGM                  | Hyper-IgM syndrome   |
| IL                    | interleukin  |
| Ig                    | immunoglobulin   |
| FACS                  | fluorescence-activated cell sorting  |
| PID                   | primary immunodeficiency   |
| ESID                  | European Society for Immunodeficiencies  |
| TNF                   | tumor necrosis factor  |

## Publikationsliste

van de Veen W\*, **Krätz CE\***, McKenzie CI, Aui PM, Neumann J, van Noesel CJM, Wirz OF, Hagl B, Kröner C, Spielberger BD, Akdis CA, van Zelm MC, Akdis M, Renner ED. Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome. *Allergy*. 2019;74:2394–2405. <https://doi.org/10.1111/all.13969>

\*shared first author, contributed equally

Renner ED\*, **Krätz CE\***, Orange JS, Hagl B, Rylaarsdam S, Notheis G, Durandy A, Torgerson TR, Ochs HD. Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses. *Clin Immunol*. 2021 Jan;222:108638. doi: 10.1016/j.clim.2020.108638. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33276124.

\*shared first author, contributed equally

## 1. Beitrag zu den Publikationen

### 1.1 Beitrag zu Paper I: Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome

van de Veen W & Krätz CE, McKenzie CI, Aui PM, Neumann J, van Noesel CJM, Wirz OF, Hagl B, Kröner C, Spielberger BD, Akdis CA, van Zelm MC, Akdis M, Renner ED. Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome. *Allergy*. 2019;74:2394–2405. <https://doi.org/10.1111/all.13969>

Bei oben genanntem Paper war ich maßgeblich an der Erstellung des Studiendesigns, der Datenerhebung, Patientenmaterialgewinnung, Versuchsdurchführung und -etablierung, sowie Datenauswertung und Manuskriptverfassung beteiligt.

Im Folgenden stelle ich meinen Beitrag an der Publikation im Detail dar:

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ellen Renner im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München begann ich mich in das Thema einzuarbeiten. Ich rekrutierte Patienten, erhob klinische und laborchemische Daten wie Immunglobulinserumwerte und die Immunoblot-RAST-Testung. Zudem erlernte ich die Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus Patientenblut und führte diese Technik dann selbstständig zur Gewinnung von Patientenmaterial im Rahmen dieser Studie durch. Gemeinsam mit Frau Prof. Ellen Renner warb ich ein Stipendium der CK-Care Stiftung für einen Forschungsaufenthalt am Schweizerischen Institut für Allergie und Asthmaforschung (SIAF) ein.

Im SIAF führte ich gemeinsam mit Herrn Dr. Willem van de Veen die Versuchsreihe der IgE-Induktion mit IL-4 und IL-21 an B-Zellen von Patienten und Kontrollen durch. Diese beinhaltete die Färbung der PBMCs, das Sortieren der PBMCs zur Gewinnung von reinen B-Zellpopulationen, die Stimulation mit Interleukinen, die Durchführung der Durchflusszytometrie und die Messung von produziertem IgE mittels ELISA und von IgM, IgG und IgA mittels ELISPOT zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten. Außerdem war ich zuständig für die Gewinnung der jeweiligen Proben zur weiter vorgesehenen RNA-Analyse.

Ich führte die Suche nach passenden FACS-Antikörpern bezüglich Laserausstattung der FACS-Geräte und Kompatibilität durch und holte diverse Angebote bei den produzierenden Firmen ein.

Ich wirkte an der Etablierung und Optimierung von zwei unterschiedlichen FACS-IgG-Subklassen-Färbungen mit und führte die Durchflusszytometrie selbstständig durch. Zusammen mit Herrn Dr. Willem van de Veen wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ausgewertet und graphisch dargestellt.

Ich brachte aktiv die Gestaltung des Manuskriptes voran und wirkte bei der Idee des Grundaufbaus des Graphical Abstractes mit.

Ergebnisse der Untersuchungen stellte ich auf dem Kongress der ESID (European Society for Immunodeficiencies) 2016 in Barcelona vor.

Auf der Basis dieser internationalen Zusammenarbeit entstand diese Publikation mit geteilter Erstautorenschaft mit Herrn Dr. Willem van de Veen.

## **1.2 Beitrag zu Paper II: Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses**

**Renner ED & Krätz CE, Orange JS, Hagl B, Rylaarsdam S, Notheis G, Durandy A, Torgerson TR, Ochs HD. Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses. Clin Immunol. 2021 Jan;222:108638. doi: 10.1016/j.clim.2020.108638. E-pub 2020 Dec 1. PMID: 33276124.**

Bei der zweiten Publikation lag meine führende Rolle in der Datenauswertung und Erstellung des Manuskripts, sowie dessen Revision auf Gutachterhinweise.

Die Laborversuche wurden von Frau Prof. Ellen Renner während ihres Senior Fellowship in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hans Ochs am Children's Hospital Seattle und der University of Washington durchgeführt.

Ich vervollständigte die Patientendaten und kontaktierte hierzu die Koautoren. Eigenständig führte ich die statistische Berechnung, sowie die Erstellung der Tabelle und den Abbildungen durch. Zur Erstellung des Manuskripts führte ich eine ausführliche Literaturrecherche durch und schrieb federführend den Manuskripttext. Für die folgenden Revisionen stand ich im Austausch mit den Koautoren und führte die Anpassung an die Gutachterkommentare und der Koautoren durch.



## 2. Einleitung

### 2.1 B-Zell-Immunität und Primäre Immundefekte

Primäre Immundefekte (PIDs) sind angeborene Immundefekte, die meist monogenetischen Ursprungs sind, was wiederum bedeutet, dass die Erkrankung auf einem einzelnen defekten Gen beruht. Durch neu etablierte Methoden in der genomischen Diagnostik wie dem Next generation sequencing konnte ein deutlicher Anstieg an molekulargenetischen Diagnosen von PIDs in den letzten Jahren beobachtet werden (1-3). PIDs können sowohl durch Loss-of-Function-Mutationen, und damit verbunden einem kompletten oder partiellen Funktionsverlust des Genprodukts, als auch durch Gain-of-Function-Mutationen, bei denen die Funktionsfähigkeit verstärkt oder die Funktion des Genprodukts verändert wird, verursacht werden (4, 5). Eine konstante Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist oft nicht gegeben, da ein hohes Maß an Variabilität bezogen auf die Expressivität und Penetranz besteht. Dies bedeutet, dass Patienten mit gleicher Mutation sehr unterschiedliche klinische Phänotypen aufzeigen können bzw. ähnlichen Phänotypen eine andere Mutation zu Grunde liegen kann (1, 6).

Allgemein übergreifend zeichnet Patienten mit PID eine erhöhte Anfälligkeit für infektiöse Erkrankungen und nicht-infektiöse Merkmale wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder ein erhöhtes Malignitätsrisiko aus (7). Wichtig ist eine frühzeitige Diagnosestellung. Die primäre Basisdiagnostik besteht aus der Bestimmung von Immunglobulin-Spiegeln im Serum sowie einem Differenzialblutbild (8). Bei gesichertem Verdacht auf einen PID sollte eine humangenetische Untersuchung erfolgen, um daraus eine optimale Therapie ableiten zu können und diese frühestmöglich zu initiieren, sodass der größtmögliche Benefit in Hinblick auf Lebensqualität und Lebenszeitgewinnung für die Patienten erreicht werden kann (9).

Aber nicht nur für die Diagnostik und anschließende Therapie der Patienten ist das Erkennen von Immundefekten wichtig, sondern PIDs stellen immer schon eine Hilfe dar, das Immunsystem besser zu verstehen. Sie geben uns die Möglichkeit, Prozesse und Abläufe des Immunsystems, die durch bestimmte Faktoren inner- und außerhalb des Systems beeinflusst werden, besser zu verstehen, um im Anschluss daran Rückschlüsse auf eine intakte Immunantwort zu zulassen.

Das Wissen über Prozesse im Immunsystem gewinnt immer mehr an Bedeutung, da eine zunehmende Prävalenz von atopischen Erkrankungen, wie beispielweise der allergischen Rhinitis oder Lebensmittelallergien über die letzten fünf Jahrzehnte in der weltweiten Bevölkerung beobachtet werden konnte (10).

Die beiden Publikationen dieser Dissertation möchten das Zusammenspiel der unterschiedlichen Komponenten und Mechanismen des Immunsystems mit Schwerpunkt auf dem B-Zellsystem näher beleuchten und mehr Einblick geben in die Interaktion auf zellulärer und intrazellulärer Ebene.

Prinzipiell lässt sich die adaptive Immunität, die für eine erregerspezifische Erkennung und Eliminierung zuständig ist, in einen zellulären und humoralen Teil gliedern. Bei PIDs sind je nach De-

fekt das humorale und zelluläre Immunsystem kombiniert oder auch isoliert betroffen. Der zelluläre Part wird von T-Zellen ausgeübt, wo hingegen die B-Zellen für den humoralen Teil verantwortlich sind. Den Fokus beider Publikationen legten wir dabei auf die B-Zellimmunität. B-Zellen werden im Knochenmark hergestellt und wandern als naive B-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe ein. Sie werden naive B-Zellen genannt, da sie noch nie Kontakt zu einem Erregerantigen hatten. In den sekundären lymphatischen Organen passiert der weitere Reifeprozess, der teilweise sowohl T-Zell-abhängig als auch -unabhängig stattfindet. Die B-Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, sogenannte Immunglobuline (Ig) vom IgM oder IgD Typ, mit denen sie Antigene binden kann. Dieser Prozess leitet die weitere Proliferation der B-Zelle - über die Zwischenstadien des Zentroblasten und des Zentrozyten - in eine antikörperproduzierende und -sezernierende Plasmazelle beziehungsweise die Differenzierung zu einer Gedächtniszelle ein (11). Um ein breiteres Wirkspektrum abzudecken, besteht die Möglichkeit des Immunglobulinlinklassenwechsels (Class switch recombination, CSR) hin zu einer IgA, IgG oder IgE produzierenden Plasmazelle, der zytokingesteuert durch T-Helfer-Zellen abläuft (11, 12). Grundsätzlich besteht die Struktur eines Antikörpers aus jeweils zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten. Die Antigenbindungsstelle wird durch die variable Domäne einer leichten und einer schweren Kette zusammen gebildet. Ein weiterer Punkt für eine noch effizientere Erregerabwehr ist die somatische Hypermutation (SHM), bei der durch das Einfügen von Basenpaarveränderungen in die DNA-Sequenz der variablen Immunglobulin Region (IgV) der V(D)J Region, eine höhere Affinität der Antikörper zum Antigen bewirkt wird (13).

Des Weiteren sind für eine intakte B-Zellimmunität zusätzliche Signalwege erforderlich, um die Steuerung von Transkriptionsfaktoren - beispielsweise STAT3 - beziehungsweise im Endeffekt die adäquate Synthese von Proteinen zu gewährleisten. Dies wird im Folgenden genauer anhand des STAT3-Hyper-IgE-Syndroms und der CSR-Defekte erläutert, die als Modell für ein nicht intaktes Immunsystem mit gestörter B-Zellimmunität dienen.

## 2.2 STAT3-Hyper-IgE-Syndrom

Das STAT3-Hyper-IgE-Syndrom (STAT3-HIES) ist eine Erkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird und auf heterozygoten Mutationen im *STAT3*-Gen beruht, die einen dominant negativen Effekt auf die STAT3-Funktion haben. Bis jetzt sind Mutationen auf drei unterschiedlichen Domänen bekannt: DNA-Binding-Domäne, SH2-Domäne, Transactivation-Domäne (14-16).

Klinisch präsentieren sich die Patienten häufig mit rezidivierenden Infektionen, die oft mit *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae* assoziiert sind, chronischen Ekzemen und Skelettabnormalitäten (15). Laborchemisch fallen erhöhte Serum-IgE-Werte und reduzierte Gedächtnis-B-Zellen auf (17, 18). Trotz erhöhter Serum-IgE-Werte ist das Vorkommen von Allergien nicht gehäuft (19).

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ist ein Transkriptionsfaktor. Er wird beeinflusst von diversen Zytokinrezeptoren, wie unter anderem dem IL-6-Rezeptor, dem IL-11-

Rezeptor oder dem IL-21-Rezeptor (20, 21). IL-21, das von T-Helferzellen produziert wird, aktiviert STAT3 im Keimzentrum von B-Zellen und bewirkt dadurch die Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels (CSR) (22). Außerdem wird vermutet, dass IL-21 die Antigen-induzierte IgE Produktion supprimiert, indem es die C $\epsilon$ -Transkription von mit IL-4 stimulierten B-Zellen hemmt (23) und für eine erhöhte Apoptoserate von IgE produzierenden B-Zellen sorgt (24).

Es wird zudem angenommen, dass das klinische Erscheinungsbild bezüglich der Entzündungssymptomatik mit rezidivierenden Infektionen unter anderem auch auf eine gestörte IL-6-Signalweiterleitung zurückzuführen ist (25).

Als Ursache des abnormalen Knochenbaus wird eine gestörte IL-11-Signaltransduktion angenommen. IL-11 wird eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Knochenaufbaus und -abbaus zugeschrieben (26, 27).

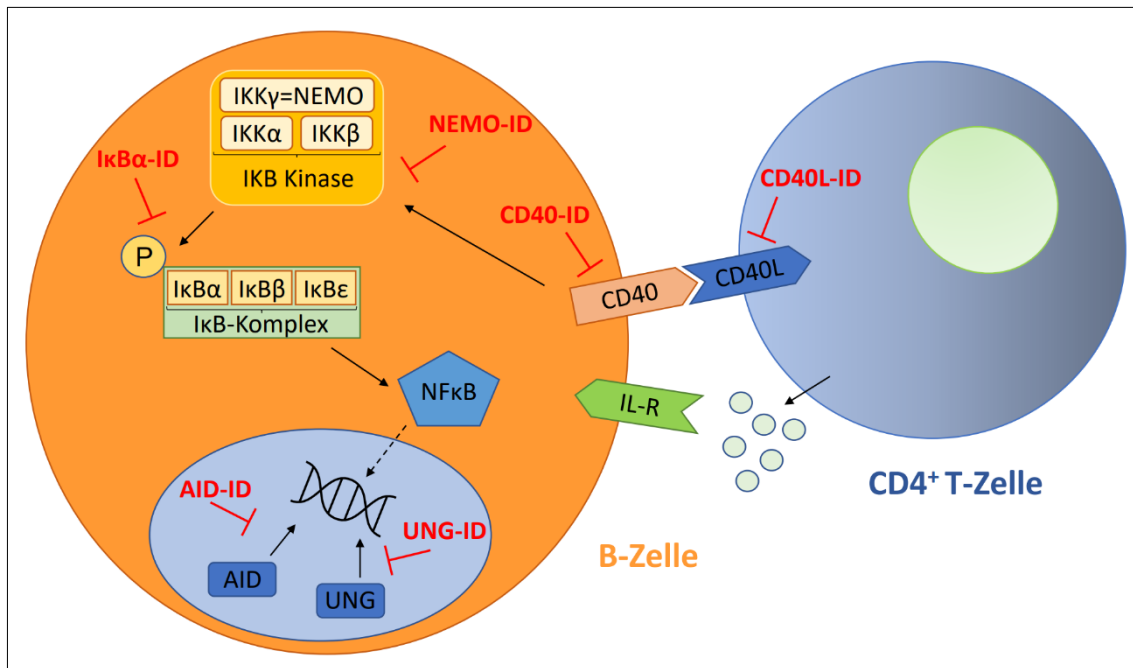
Mutationen im *STAT3*-Gen führen außerdem zu einer gestörten Entwicklung von T<sub>H</sub>17-Zellen, die wiederum bei der Elimination von Pilzinfektionen und bakteriellen Infekten eine tragende Rolle spielen. Damit verbunden ist auch eine gestörte Produktion von T<sub>H</sub>17-Zytokinen, wie IL-17A und IL-22, die für die Schleimhaut- und Hautimmunität wichtig sind (15, 28).

Insgesamt betrachtet ist STAT3 also ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion von Interleukinen und eine zentrale Schaltstelle im Bereich der B-Zellen-Reifung (21). Speziell ersichtlich werden diese Aspekte in STAT3-HIES-Patienten, bei denen der Transkriptionsfaktor nicht seine volle Funktionalität erfüllt.

### 2.3 Class Switch Recombination (CSR)-Defekte

Das gemeinsame Merkmal von Class switch recombination defects (CSRDs) besteht in einer gestörten B-Zellimmunantwort und der verminderten Produktion von Immunglobulinen, wobei vor allem IgG, IgA und IgE betroffen sind. Die Immunglobulinwerte von IgM im Serum liegen meist im Normalbereich oder sind sogar erhöht. Durch diesen Aspekt entstand der Begriff des Hyper-IgM-Syndroms, der synonym verwendet wird (29-31). Patienten mit einem CSRD leiden oft unter rezidivierenden Infektionen, Anämien, aphtösen Mundläsionen oder Diarrhoen und haben häufig ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen (32).

CSRDs lassen sich abhängig vom jeweiligen Gendefekt einteilen. Seit längerem bekannt sind Mutationen in den Genen, die für *CD40L*, *CD40*, *AID*, *UNG*, *NEMO*, *I $\kappa$ B $\alpha$* , *PIK3R1*, *PIK3CD*, *PMS2*, *ATM* und *NBN* codieren. Daraus resultieren Fehler, die in der B-Zell/T-Zell-Interaktion entstehen, die mit DNA-Reparaturdefekten einhergehen oder die einen intrinsischen B-Zelldefekt verursachen (33-41).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung verschiedener CSRDs im Überblick angelehnt an (29, 42). ID = Immundefekt, IL-R = Interleukin-Rezeptor

### 2.3.1 CD40L-Defekt

CSRDs mit einem defektem *CD40Ligand*-Gen (*CD40L*) werden X-chromosomal-rezessiv vererbt und kommen unter den Hyper-IgM-Syndromen am häufigsten vor (32, 33). *CD40L* ist ein Glykoprotein, das zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört und überwiegend auf  $CD4^+$  T-Zellen exprimiert wird (43). Das Hauptproblem besteht in einer fehlerhaften Interaktion von auf T-Zellen befindlichem *CD40L* und *CD40*-exprimierenden B-Zellen. Dadurch entsteht eine fehlerhafte Signalweiterleitung, die in einer mangelnden B-Zellaktivierung und -differenzierung mündet (44). Da auch die Kommunikation zwischen dendritischen Zellen und Monozyten/Makrophagen gestört ist, hat dies außerdem Auswirkungen auf die zytokingesteuerte Stimulation von T-Lymphozyten (45). Die *CD40L*-*CD40*-Bindung spielt zudem eine wesentliche Rolle bei der Keimzentrumbildung in Lymphknoten, die bei Patienten mit *CD40L*-Defekt zusätzlich beeinträchtigt ist (46).

### 2.3.2 CD40-Defekt

Dieser Gendefekt wird autosomal-rezessiv vererbt und kommt sehr selten vor. *CD40* gehört zur Superfamilie der Tumornekrosefaktorrezeptoren und wird auf vielen Immunzellen wie beispielsweise B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Patienten mit einem *CD40*-Defekt können diesen Rezeptor nicht ausbilden (47). Dadurch entsteht, ähnlich wie bei den *CD40L*-Defekten, eine gestörte Interaktion zwischen B- und T-Zellen, die sich wiederum auswirkt auf eine

gestörte somatische Hypermutation (SHM). Patienten mit CD40-Defekt und solche mit CD40L-Defekt haben eine ähnliche schwere klinische Symptomatik (48).

### 2.3.3 AID-Defekt

Dieser Defekt betrifft Mutationen im Gen für die Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) und wird je nach Lokalisation der Mutation autosomal-rezessiv oder autosomal-dominant vererbt (41, 49, 50). Klinisch sind die Patienten oft weniger schwer betroffen, sodass eine Erkrankung teilweise erst in der Adoleszenz oder noch später diagnostiziert wird (49). AID ist ein Enzym, das speziell in aktivierten B-Zellen exprimiert wird, auf Einzelstrang-DNA spezialisiert ist und Cytidin in Uridinreste desaminiert. Zudem wird vermutet, dass die AID mittels DNA-Methylierung auch Einfluss nimmt auf epigenetischer Ebene (51, 52). Die AID stellt somit das Schlüsselenzym der CSR und der SHM dar. Diese sind je nach Lokalisation der Genmutation in Patienten mit AID-Defekt beide oder nur einzeln betroffen (53).

### 2.3.4 UNG-Defekt

Hyper-IgM-Syndrome, die durch eine Mutation im Gen für *UNG* (*Uracil-DNA Glycosylase*) verursacht werden, werden autosomal-rezessiv vererbt. Klinisch präsentieren sich Patienten mit UNG-Defekt ähnlich zu denen mit AID-Defekt (54). UNG ist ein Bestandteil des Basen-Exzisions-Reparatur-Komplexes, indem es diesen initiiert und falsch eingebautes Uracil in der DNA entfernt. In Patienten mit UNG-Defekt ist sowohl die CSR als auch die SHM betroffen, da auch ein verzerrtes Muster der Nukleotidsubstitution beobachtet wurde. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch nicht vollends verstanden und wird kontrovers diskutiert (35, 54, 55).

### 2.3.5 NEMO-Defekt

Der NEMO-Defekt wird je nach Lokalisation der Mutation X-chromosomal-rezessiv oder autosomal-rezessiv vererbt (56, 57). Klinisch fallen Patienten mit NEMO-Defekt meist durch eine hypo-/anhidrotische ektodermale Dysplasie auf (56, 58). NEMO nimmt Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg. NF- $\kappa$ B bildet mit I $\kappa$ B einen inaktiven Komplex. Der Nuclear-factor kappa B Essential Modulator (NEMO), auch genannt IKK $\gamma$ , ist ein Bestandteil der I $\kappa$ B Kinase (IKK), die wiederum für die Phosphorylierung von I $\kappa$ B zuständig ist. Sobald I $\kappa$ B phosphoryliert ist, wird die Hemmung von NF- $\kappa$ B aufgehoben und der Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern einwandern und dort die Transkription starten. Bei Patienten mit NEMO-Defekt ist dieser Signalweg gestört (56, 59).

### 2.3.6 I $\kappa$ B $\alpha$ -Defekt

Bei Patienten mit I $\kappa$ B $\alpha$ -Defekt ist ebenfalls der NF- $\kappa$ B-Signalweg betroffen. Der Erbgang erfolgt autosomal-dominant und die Patienten präsentieren sich klinisch ebenfalls mit hypo-/anhidrotischer ektodermaler Dysplasie. I $\kappa$ B $\alpha$  bildet zusammen mit I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  den I $\kappa$ B-Komplex. Mittlerweile sind mehrere Mutationen bekannt, die die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  verhindern, sodass der hemmende Einfluss von I $\kappa$ B auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg verstärkt wird. Daraus resultiert eine

gestörte Signalweiterleitung, die im Endeffekt die Einwanderung des Transkriptionsfaktors in den Zellkern beeinträchtigt (60-63).

### 2.3.7 Weitere Gendefekte

PIK3-Defekte (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonate 3-Kinase) werden autosomal dominant vererbt und werden durch Gain-of-Function-Mutationen verursacht (37). PMS2 (Postmeiotic segregation 2) gehört zur Gruppe der Reparaturproteine, die beteiligt sind an der DNA-Mismatch-Reparatur (39). ATM-Defekte (ataxia telangiectasia mutated) wurden benannt nach ihrer führenden klinischen Manifestation mit fortschreitender zerebällerer Ataxie und dem häufigen Auftreten von Teleangiektasien. Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv (36). Das Nijmegen-Breakage-Syndrom wird verursacht durch Mutationen im *NBN*-Gen (38). Allen Patienten gemeinsam ist, dass sie eine stark erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, bereits im frühen Kindesalter maligne Erkrankungen zu entwickeln (36-39).

Darüber hinaus gibt es weitere Gendefekte, die mit den Hyper-IgM-Syndromen assoziiert werden: NKFB1 (nuclear factor kappa-B subunit 1), MSH6 (MutS Homolog 6), MSH2 (MutS Homolog 2), INO80, MRE11 (meiotic recombination 11-Like Protein A), RAG2 (recombination activating gene 2), TACI/TNFRSF13B (tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B), ICOS (inducible T-cell costimulatory), BAFF-R/TNFRSF13C (CD19, B cell-activating factor receptor), LRBA (LPS Responsive Beige-Like Anchor Protein), PLCG2 (phospholipase C gamma-2), BTK (Bruton tyrosine kinase), SAP (signaling lymphocyte activation molecule-associated protein) (42).

## 2.4 Ausblick

Sowohl Patienten mit STAT3-HIES als auch Patienten mit CSRD können von einer Immunglobulinsubstitutionstherapie profitieren. Dabei wird bei CSRD-Patienten je nach klinischer Symptomatik und Immunglobulinspiegeln eine Substitution erwogen (32). In STAT3-HIES-Patienten konnte durch eine Substitution eine verstärkte IgG-Antwort gegen *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden, sowie eine Reduktion der rezidivierenden Infektionen (64). Mit unserer Forschungsarbeit konnten wir aufzeigen, dass der STAT3-Signalweg eine wesentliche Rolle in Bezug auf eine ideale B-Zellreifung hat. Zudem konnten wir die Notwendigkeit der Immunglobulinsubstitutionstherapie bei STAT3-HIES Patienten weiter unterstreichen. Die zweite Publikation zu CSRD bietet eine Entscheidungshilfe bezüglich bestmöglicher Therapie wie beispielsweise dem Beginn der Immunglobulinsubstitution.

Unsere Arbeiten konnten somit zu einem genaueren und tiefgründigeren Verständnis der komplexen immunologischen Zusammenhänge beitragen. Durch dieses immunologische Verständnis ist es möglich, immer bessere, effizientere und spezifischere Diagnostik und Therapien zu entwickeln, um die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Patienten mit PID zu steigern.

Zusätzlich ermöglichen uns PIDs auch ein besseres Verständnis für die allgemeinen Abläufe des Immunsystems zu entwickeln. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auch auf andere Erkrankungen zu, die mit einem fehlerhaften Immunsystem assoziiert sind und die für die Gesellschaft immer relevanter werden. So stieg während der letzten 50 Jahre die Prävalenz von Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie Asthma, atopische Dermatitis und allergische Rhinokonjunktivitis signifikant an und betrifft mittlerweile mehr als 300 Millionen Menschen der Weltbevölkerung (10, 65). Ziel ist auch hier die Mechanismen der CSR, B-Zellreifung und IgE Produktion noch besser zu verstehen, um daraus - mit Hilfe der PIDs als Modell für ein nicht intaktes Immunsystem - auch für andere Erkrankungen effizientere Therapien abzuleiten.

### 3. Zusammenfassung:

Beide Publikationen dieser Promotion beschäftigen sich mit primären Immundefekten, zum einen mit dem STAT3-Hyper-IgE-Syndrom (STAT3-HIES) und zum anderen mit den Class switch recombination (CSR)-Defekten. Das zusammenfassende Ziel beider Publikationen war ein besseres Verständnis über die B-Zellimmunität und somit über die adaptive Immunität, einschließlich CSR, B-Zellreifung und IgE Produktion zu erwerben, um so auch Rückschlüsse auf andere Erkrankungen, die mit einem defekten Immunsystem assoziiert sind, ziehen zu können.

In der Publikation „Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome“ haben wir den Einfluss des STAT3-Signalweges auf die B-Zellimmunantwort untersucht. Den Schwerpunkt der Beobachtung legten wir dabei auf die Durchflusszytometrie-Analyse von B-Zellsubpopulationen und Plasmazellen, *in vitro* Proliferation und Antikörperproduktion, sowie somatische Hypermutation und die Untersuchung von Lymphknoten- und Knochenmarksgewebe in STAT3-HIES-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Zum ersten Mal konnten wir eine detaillierte Immunphänotypisierung von B-Zellen der STAT3-HIES-Patienten aufzeigen, die ergab, dass IgE<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen in STAT3-HIES-Patienten prozentual erhöht waren, während andere Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen mit Ausnahme von IgG4<sup>+</sup> vermindert waren.

Dabei stellte sich heraus, dass unter der Stimulation von CD40L und IL-4 die Proliferation von naiven B-Zellen der Patienten vergleichbar ausfiel zu der von gesunden Kontrollen. Wo hingegen sich unter der zusätzlichen Stimulation mit IL-21 eine deutlich verminderte B-Zellproliferation, sowie eine signifikant reduzierte Sekretion von Immunglobulinen bei den STAT3-HIES-Patienten abzeichnete. Wobei der Unterschied für IgE geringer ausfiel, was vermuten ließ, dass ein direkter Klassenwechsel von naiven B-Zellen zu IgE produzierenden B-Zellen unter Umgehung der Keimzentren erfolgte. Insgesamt konnten wir somit die Abhängigkeit der IL-21-Signaltransduktion von STAT3 bestätigen. Die Transkripte von IgE, IgG1, IgG3 und IgA1 zeigten eine reduzierte somatische Hypermutation im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Zudem konnten wir beobachten, dass Lymphknoten von STAT3-HIES-Patienten eine reguläre Keimzentrumarchitektur mit einer normalen Zellbeschaffenheit aufwiesen. Die Knochenmarkstruktur von STAT3-HIES-Patienten imponierte im Vergleich zu gesunden Kontrollen normal. Auffallend war allerdings der hohe Anteil an IgE<sup>+</sup> Plasmazellen im Knochenmark der STAT3-HIES-Patienten, der auch die erhöhten, niedrigaffinen IgE Immunglobuline im Serum erklären könnte.

Insgesamt betrachtet ist es also STAT3-HIES-Patienten prinzipiell möglich, trotz eines gestörten Signalweges T-Zell-abhängige B-Zell-Antworten *in vivo* zu generieren. Die Vermutung liegt nahe, dass der Grund für die teilweise erhaltene Funktion daran liegen könnte, dass STAT3-HIES eine autosomale Erkrankung ist und somit die Patienten auch eine normale Kopie des *STAT3*-Gens in sich tragen. Folglich unterstreicht unser Ergebnis die Wichtigkeit des STAT3-Signalweges im Hinblick auf eine optimale B-Zell-Reifung und B-Zell-Differenzierung. Unser Ergebnis bekräftigt außerdem die Notwendigkeit der Immunglobulinsubstitutionstherapie bei STAT3-HIES-Patienten.



Zudem konnten wir durch den Nachweis niedrigaffiner IgE Immunglobuline eine Erklärung für die hohen IgE-Serumwerte bei gleichzeitig meist fehlenden allergischen Symptomen finden.

Die Publikation „Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses“ zielte auf ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen B-Zell-Phänotyp und Antikörperproduktion in Patienten mit CSRD (Class Switch Recombination Defect) ab. Für unsere Studie untersuchten wir Patienten, die einen CSRD mit Mutationen in den Genen *CD40*, *CD40L*, *UNG*, *AID*, *IκBα* oder *IKKγ* aufwiesen.

Zu diesem Zweck immunisierten wir diese CSRD-Patienten mit dem Neoantigen Bakteriophage phiX174 und quantifizierten B-Zell-Subpopulationen, definiert als gesamte Gedächtnis-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), IgM-Gedächtnis-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), geswitchte Gedächtnis-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>) und IgM-only-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), mittels Durchflusszytometrie.

Dabei zeigte sich für die Häufigkeit der Gedächtnis-B-Zellen je nach Art des CSRD und abhängig von der jeweiligen Genvariante ein großes Spektrum, das von einzelnen B-Zellpopulationen im Normalbereich liegend bis kaum vorhanden reichte. Insgesamt betrachtet konnten wir jedoch bei allen Patienten eine stark verminderte Population von geswitchten Gedächtnis-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) feststellen.

Die Antikörperantwort auf den Bakteriophagen fiel bei den untersuchten CSRD Patienten nach der ersten Immunisierung vermindert aus. Nach der zweiten Immunisierung im Abstand von sechs Wochen konnten teilweise Werte im Normbereich erzielt werden. Dabei bestanden die Immunglobulinisotypen im Hinblick auf die Produktion von Bakteriophage-neutralisierenden Antikörpern überwiegend aus IgM mit nur einem sehr geringen Anteil an IgG, was für einen verminderten Klassenwechsel spricht.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine deutliche Korrelation zwischen der Häufigkeit von geswitchten Gedächtnis-B-Zellen und der Immunantwort auf den Bakteriophagen in CSRD-Patienten ersichtlich war. Unsere Studie, basierend auf der B-Zell-Phänotypisierung, kann somit eine Entscheidungshilfe bieten, die optimale Therapie für Patienten mit CSRD zu finden.

Somit haben unsere Forschungsarbeiten mehr Einblick und Verständnis in die einzelnen Zusammenhänge der B-Zell-Regulation und Immunantwort ermöglicht, um in Zukunft durch dieses Wissen noch bessere Diagnose- und Therapieansätze auf dem Gebiet der primären Immundefekte zu entwickeln und dieses immunologische Wissen auf andere Erkrankungen wie allergische Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen übertragen zu können.

## 4. Abstract (English):

This dissertation includes two publications on primary immunodeficiencies - the STAT3-hyper-IgE syndrome (STAT3-HIES) and the Class Switch Recombination Defects (CSRDs). Both publications aimed for a better understanding of B cell immunity and therefore of the adaptive immune system including CSR, B cell maturation and IgE production. An additional aim was to draw conclusions about other diseases associated with a defect immune system.

In the publication „Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome” we investigated the impact of STAT3 signaling on B cell immune response. For this reason, we assessed blood B and plasma cell subsets by FACS analysis, *in vitro* proliferation and antibody production, somatic hypermutations in Ig genes and lymph node and bone marrow in STAT3-HIES patients and healthy controls.

For the first time, we showed a detailed immunophenotyping of STAT3-HIES patients B cells, revealing an increased percentage of IgE<sup>+</sup> memory B cells in STAT3-HIES patients, whereas other memory B cell subsets except IgG4<sup>+</sup> were diminished.

The proliferation of naïve B cells in STAT3-HIES patients was comparable to those of healthy controls under the stimulation with CD40L and IL-4. While in additional stimulation with IL-21 a clear decrease in B cell proliferation as well as a significant reduced secretion of immunoglobulins in STAT3-HIES patients was noticed. The difference in antibody production was less for IgE which led to the hypothesis that there was a direct switch of naïve B cells to IgE producing B cells bypassing the germinal center. Taken together, we confirmed the dependence of IL-21 signaling on STAT3. The transcripts of IgE, IgG1, IgG3 and IgA1 in STAT3-HIES patients showed reduced somatic hypermutation compared to healthy controls.

Furthermore, lymph nodes of STAT3-HIES patients showed normal germinal center architecture and cellular constitution. The bone marrow structural organization was comparable to those of healthy controls, but with a remarkably high amount of IgE<sup>+</sup> plasma cells that are suspected to produce low-affinity IgE.

Overall, STAT3-HIES patients can generate T-cell-dependent B cell responses *in vivo* despite impaired STAT3 signaling. The reason for the remaining function might be that STAT3-HIES is an autosomal dominant disease and therefore patients have a normal copy of the *STAT3*-gene. Our results, however, demonstrated the importance of STAT3 signaling for optimal B cell maturation and differentiation. Furthermore, we confirmed the importance of immunoglobulin substitution therapy in STAT3-HIES patients. Moreover, our results explained the high IgE serum levels with mostly absent allergic symptoms due to reduced specified IgE production.

With the publication „Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses” we aimed for a better understanding how B cell phenotyping correlated with antigen responses in patients with CSRD (Class Switch Recombination Defect). Therefore, we investigated CSRD patients with mutations in the genes *CD40*, *CD40L*, *UNG*, *AID*, *IκBα* and *IKKγ*.

CSR D patients were immunized with the neoantigen bacteriophage phiX174 and B cell subpopulations, defined as total memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), IgM-memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), switched memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>) and IgM-only B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), were quantified by multiparameter flow cytometry analysis.

Dependent on the CSR D and affected gene variant there was a wide range in the percentage of B cell subpopulations, reaching from normal values to rarely measurable values. Overall, the population of switched memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) was severely diminished in all CSR D patients.

The immune response to bacteriophage was reduced in all investigated CSR D patients after the first immunization. After the second immunization six weeks later, normal values were detected in part. Phage neutralizing antibodies consisted predominantly of IgM and rarely of IgG as a result of reduced class switching.

Taken together, there was a clear correlation between the percentage of switched memory B cells and the immune response to bacteriophage in CSR D patients. Thus, our study, based on B cell phenotyping, offers the possibility to get a rational decision in selecting optimal treatment for CSR D patients.

Thus, our results provide more insights in the distinct correlations of B cell regulation and immune response to improve and develop novel approaches in diagnosis and treatment of patients with PID. The knowledge gained from PID may further benefit people with more common diseases such as allergic diseases or immune dysregulations.

## 5. Paper I

**Original Article: Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome**

van de Veen W\*, Krätz CE\*, McKenzie CI, Aui PM, Neumann J, van Noesel CJM, Wirz OF, Hagl B, Kröner C, Spielberger BD, Akdis CA, van Zelm MC, Akdis M, Renner ED. Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome. *Allergy*. 2019;74:2394–2405. <https://doi.org/10.1111/all.13969>

\*shared first author, contributed equally

## 6. Paper II

### **Brief Communication: Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses**

Renner ED\*, Krätz CE\*, Orange JS, Hagl B, Rylaarsdam S, Notheis G, Durandy A, Torgerson TR, Ochs HD. Class Switch Recombination Defects: impact on B cell maturation and antibody responses. *Clin Immunol.* 2021 Jan;222:108638. doi: 10.1016/j.clim.2020.108638. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33276124.

\*shared first author, contributed equally

## 7. Literaturverzeichnis

1. Conley ME, Casanova JL. Discovery of single-gene inborn errors of immunity by next generation sequencing. *Curr Opin Immunol*. 2014;30:17-23.
2. Buccioli G, Meyts I. Recent advances in primary immunodeficiency: from molecular diagnosis to treatment. *F1000Res*. 2020;9.
3. Fang M, Abolhassani H, Lim CK, Zhang J, Hammarström L. Next Generation Sequencing Data Analysis in Primary Immunodeficiency Disorders – Future Directions. *Journal of clinical immunology*. 2016;36(1):68-75.
4. Jhamnani RD, Rosenzweig SD. An update on gain-of-function mutations in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017;17(6):391-7.
5. Lin L, Wang Y, Sun B, Liu L, Ying W, Wang W, et al. The clinical, immunological and genetic features of 12 Chinese patients with STAT3 mutations. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2020;16:65.
6. Buchbinder D, Baker R, Lee YN, Ravell J, Zhang Y, McElwee J, et al. Identification of Patients with RAG Mutations Previously Diagnosed with Common Variable Immunodeficiency Disorders. *Journal of clinical immunology*. 2015;35(2):119-24.
7. Amaya-Urbe L, Rojas M, Azizi G, Anaya JM, Gershwin ME. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2019;99:52-72.
8. de Vries E, Clinical Working Party of the European Society for I. Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(2):204-14.
9. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(5):1186-205.e1-78.
10. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur Clin Respir J*. 2015;2:10.3402/ecrj.v2.24642.
11. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(1):22-33.
12. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):721-32.
13. de Villartay J-P, Fischer A, Durandy A. The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(12):962-72.
14. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2007;448(7157):1058-62.
15. Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, et al. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;122(1):181-7.
16. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(16):1608-19.
17. Speckmann C, Enders A, Woellner C, Thiel D, Rensing-Ehl A, Schlesier M, et al. Reduced memory B cells in patients with hyper IgE syndrome. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;129(3):448-54.
18. Buckley RH, Wray BB, Belmaker EZ. Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics*. 1972;49(1):59-70.
19. Boos AC, Hagl B, Schlesinger A, Halm BE, Ballenberger N, Pinarci M, et al. Atopic dermatitis, STAT3- and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern. *Allergy*. 2014.
20. Béziat V, Tavernier SJ, Chen YH, Ma CS, Materna M, Laurence A, et al. Dominant-negative mutations in human IL6ST underlie hyper-IgE syndrome. *J Exp Med*. 2020;217(6).

21. Kane A, Deenick EK, Ma CS, Cook MC, Uzel G, Tangye SG. STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr Opin Immunol.* 2014;28:49-57.
22. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med.* 2013;210(12):2739-53.
23. Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S-i, Seto Y, et al. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C transcription of IL4-stimulated B cells. *Blood.* 2003;100:4565-73.
24. Wood N, Bourque K, Donaldson DD, Collins M, Vercelli D, Goldman SJ, et al. IL-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13. *Cellular Immunology.* 2004;231(1):133-45.
25. Puel A, Casanova J-L. The nature of human IL-6. *Journal of Experimental Medicine.* 2019;216(9):1969-71.
26. Hill PA, Tumber A, Papaioannou S, Meikle MC. The Cellular Actions of Interleukin-11 on Bone Resorption in Vitro. *Endocrinology.* 1998;139(4):1564-72.
27. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 1999;274(27):19301-8.
28. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2008;452(7188):773-6.
29. Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, Durandy A. Defects of class-switch recombination. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2006;117(4):855-64.
30. Cooper MD, Faulk WP, Fudenberg HH, Good RA, Hitzig W, Kunkel HG, et al. Meeting report of the Second International Workshop on Primary Immunodeficiency Disease in Man held in St. Petersburg, Florida, February, 1973. *Clin Immunol Immunopathol.* 1974;2(3):416-45.
31. Rosen FS, Kevy SV, Merler E, Janeway CA, Gitlin D. Recurrent bacterial infections and dysgamma-globulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins. Report of two cases. *Pediatrics.* 1961;28:182-95.
32. Leven EA, Maffucci P, Ochs HD, Scholl PR, Buckley RH, Fuleihan RL, et al. Hyper IgM Syndrome: a Report from the USIDNET Registry. *Journal of clinical immunology.* 2016;36(5):490-501.
33. DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchatt JF, Fischer A, Saint Basile Gd. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;361(6412):541-3.
34. Korthäuer U, Graf D, Mages HW, Brière F, Padayachee M, Malcolm S, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;361.
35. Kracker S, Gardes P, Mazerolles F, Durandy A. Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clinical Immunology.* 2010;135(2):193-203.
36. Etzioni A, Ben-Barak A, Peron S, Durandy A. Ataxia-telangiectasia in twins presenting as autosomal recessive hyper-immunoglobulin M syndrome. *Isr Med Assoc J.* 2007;9.
37. Crank MC, Grossman JK, Moir S, Pittaluga S, Buckner CM, Kardava L, et al. Mutations in PIK3CD can cause hyper IgM syndrome (HIGM) associated with increased cancer susceptibility. *Journal of clinical immunology.* 2014;34(3):272-6.
38. Piatosa B, van der Burg M, Siewiera K, Pac M, van Dongen JJ, Langerak AW, et al. The defect in humoral immunity in patients with Nijmegen breakage syndrome is explained by defects in peripheral B lymphocyte maturation. *Cytometry A.* 2012;81(10):835-42.
39. Péron S, Metin A, Gardès P, Alyanakian M-A, Sheridan E, Kratz CP, et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine.* 2008;205(11):2465.

40. Jhamnani RD, Nunes-Santos CJ, Bergerson J, Rosenzweig SD. Class-Switch Recombination (CSR)/Hyper-IgM (HIGM) Syndromes and Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Defects. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2172.
41. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000;102.
42. Yazdani R, Fekrvand S, Shahkarami S, Azizi G, Moazzami B, Abolhassani H, et al. The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. *Clinical Immunology*. 2019;198:19-30.
43. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:881-922.
44. Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(3):1097-102.
45. Jain A, Atkinson TP, Lipsky PE, Slater JE, Nelson DL, Strober W. Defects of T-cell effector function and post-thymic maturation in X-linked hyper-IgM syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(8):1151-8.
46. Facchetti F, Appiani C, Salvi L, Levy J, Notarangelo LD. 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. *The Journal of Immunology*. 1995;154(12):6624.
47. Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaium A, Soresina AR, Loubser M, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98.
48. Kutukculer N, Moratto D, Aydinok Y, Lougaris V, Aksoylar S, Plebani A, et al. Disseminated cryptosporidium infection in an infant with hyper-IgM syndrome caused by CD40 deficiency. *The Journal of Pediatrics*. 2003;142(2):194-6.
49. Minegishi Y, Lavoie A, Cunningham-Rundles C, Bedard PM, Hebert J, Cote L, et al. Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2000;97(3):203-10.
50. Imai K, Zhu Y, Revy P, Morio T, Mizutani S, Fischer A, et al. Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2005;115.
51. Kumar R, DiMenna LJ, Chaudhuri J, Evans T. Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID). *Biomed J*. 2014;37(5):269-83.
52. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52353-60.
53. Ta VT, Nagaoka H, Catalan N, Durandy A, Fischer A, Imai K, et al. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*. 2003;4.
54. Imai K, Slupphaug G, Lee W-I, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, et al. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nature Immunology*. 2003;4:1023.
55. Yousif AS, Stanlie A, Begum NA, Honjo T. Opinion: uracil DNA glycosylase (UNG) plays distinct and non-canonical roles in somatic hypermutation and class switch recombination. *Int Immunol*. 2014;26(10):575-8.
56. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet*. 2001;27.
57. Munoz F, Lestringant G, Sybert V, Frydman M, Alswaini A, Frossard PM, et al. Definitive evidence for an autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia clinically indistinguishable from the more common X-linked disorder. *American journal of human genetics*. 1997;61(1):94-100.



58. Frans G, van der Werff Ten Bosch J, Moens L, Gijsbers R, Changi-Ashtiani M, Rokni-Zadeh H, et al. Functional Evaluation of an IKBKG Variant Suspected to Cause Immunodeficiency Without Ectodermal Dysplasia. *Journal of clinical immunology*. 2017;37(8):801-10.
59. Orange JS, Geha RS. Finding NEMO: genetic disorders of NF- $\kappa$ B activation. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):983-5.
60. McDonald DR, Mooster JL, Reddy M, Bawle E, Secord E, Geha RS. Heterozygous N-terminal deletion of IkappaBalpha results in functional nuclear factor kappaB haploinsufficiency, ectodermal dysplasia, and immune deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(4):900-7.
61. Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, Cancrini C, Bonnet M, et al. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):1108-15.
62. Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC, Leo H, Jain N, Ma CA, et al. A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum Mutat*. 2008;29(6):861-8.
63. Boisson B, Puel A, Picard C, Casanova J-L. Human IkappaB $\alpha$  Gain of Function: a Severe and Syndromic Immunodeficiency. 2017;37(5):397-412.
64. Stentzel S, Hagl B, Abel F, Kahl BC, Rack-Hoch A, Bröker BM, et al. Reduced Immunoglobulin (Ig) G Response to Staphylococcus aureus in STAT3 Hyper-IgE Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2017;64(9):1279-82.
65. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12:204.

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei allen Patienten und deren Familien sowie den Kontrollpersonen bedanken, die sich dazu bereitklärten, an unseren Studien teilzunehmen.

Ein herzliches Dankeschön an meine Doktormutter Frau Prof. Ellen Renner, die mich mit enormer Kraft und Ausdauer auf dem gesamten Weg begleitete, die sämtliche E-Mails innerhalb kürzester Zeit beantwortete und auf die immer 100% Verlass war.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei Frau Dr. Beate Hagl, die mir im Labor das „Laufenlernen“ beigebracht hat und bei der ich immer ein offenes Ohr gefunden habe.

Mein herzlicher Dank gilt auch dem Team vom SIAF. Ganz besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. Willem van de Veen und ihm für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz ausdrücklich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Hans Ochs und Frau Dr. Anne Durandy für das Einbringen ihrer fachlichen Kompetenz und konstruktiven Vorschlägen.

Leider ist es nicht möglich alle hier namentlich aufzuführen, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben, denn das würde den Rahmen eindeutig sprengen, trotzdem möchte ich mich auch bei allen restlichen Koautoren bedanken. Mein Dank gilt besonders auch Herrn Benedikt Spielberger und Frau Daniela Kreiling, die mich in die ersten Schritte der Zellisolation und Durchflusszytometrie eingeweiht haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer wieder motivierte und auf dem gesamten Weg mit vereinten Kräften unterstützte.