

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin

Eingereicht über das  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Chemotaxis von IgG-sezernierenden Zellen  
in der Maus

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anja Erika Hauser  
Tierärztin aus Bad Dürkheim

Berlin 2003

Journal-Nr. 2744

gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Radbruch

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein

Tag der Promotion: 10.11.2003

## **Meinen Eltern**

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Angeborene und adaptive Immunität</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Lymphozyten und lymphatische Organe</b> .....	<b>8</b>
2.2.1	B- und T-Lymphozyten .....	8
2.2.2	Grundstruktur lymphatischer Organe.....	9
<b>2.3</b>	<b>Die humorale Immunantwort</b> .....	<b>10</b>
2.3.1	Struktur und Funktion der Antikörper.....	11
2.3.2	Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen .....	12
2.3.3	Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen .....	14
<b>2.4</b>	<b>Chemotaxis und Migration</b> .....	<b>17</b>
2.4.1	Chemokine und ihre Rezeptoren.....	17
2.4.2	Das Mehrschrittmodell der Leukozytenextravasation.....	22
2.4.3	Funktion der Chemokine bei der Lokalisation und Homöostase von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen.....	23
2.4.4	Rolle von Chemokinen im Verlauf von Entzündungen.....	25
<b>2.5</b>	<b>Plasmazell-vermittelte Immunität in der Veterinärmedizin</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b><i>Zielsetzung dieser Arbeit</i></b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Übersicht über die verwendeten Materialien</b> .....	<b>31</b>
4.1.1	Puffer, Lösungen und Medien.....	31
4.1.2	Material für Immunisierungen.....	32
4.1.3	Material für zellbiologisches Arbeiten.....	32
4.1.4	ELISPOT-Reagenzien.....	33
4.1.5	Rekombinante Chemokine .....	33
4.1.6	Färbereagenzien für die Durchflusszytometrie .....	33
4.1.7	Material für molekularbiologisches Arbeiten.....	35
<b>4.2</b>	<b>Mäuse und Immunisierungen</b> .....	<b>36</b>
4.2.1	Mäuse des Stammes BALB/c .....	36
4.2.2	Mäuse des Stammes NZBxNZW-F1 (NZB/W) .....	36
<b>4.3</b>	<b>Vorbereitung der Zellen</b> .....	<b>36</b>
4.3.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	36
4.3.2	Gewinnung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	37

4.3.3	Zelltransfer-Experimente.....	38
<b>4.4</b>	<b>Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper-sezernierenden Zellen.....</b>	<b>38</b>
4.4.1	Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode.....	38
4.4.2	Durchführung eines ELISPOTs zum Nachweis und zur Quantifizierung Ovalbumin-spezifischer IgG-sezernierender Zellen.....	39
<b>4.5</b>	<b>Analyse der Chemotaxis.....</b>	<b>40</b>
4.5.1	Prinzip der Chemotaxisversuche im Transwell®-System .....	40
4.5.2	Analyse der Chemotaxis von Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörper sezernierenden Zellen ....	41
<b>4.6</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen.....</b>	<b>42</b>
4.6.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	42
4.6.2	Färbung von Zelloberflächenmolekülen .....	44
4.6.3	Intrazelluläre Färbung fixierter Zellen .....	44
<b>4.7</b>	<b>Analyse der Chemokinexpression im Gewebe mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion.....</b>	<b>45</b>
4.7.1	Prinzip der quantitativen Real-Time -Polymerase-Kettenreaktion mit Hybridisierungssonden.....	45
4.7.2	Durchführung einer quantitativen PCR zum relativen Vergleich der Expression von CXCL10....	47
<b>4.8</b>	<b>Graphische Darstellung und Statistik.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Anzahl IgG-sezernierender Plasmazellen in Milz und Knochenmark im zeitlichen Verlauf .....</b>	<b>50</b>
5.1.1	Kinetik der Anzahl OVA -spezifischer IgG-sezernierender Zellen in Milz und Knochenmark nach Primärimmunisierung.....	50
5.1.2	Kinetik der Anzahl OVA -spezifischer IgG-sezernierender Zellen in Milz und Knochenmark in der Sekundärantwort .....	51
<b>5.2</b>	<b>Chemotaxis von Antikörper sezernierenden Zellen aus der Milz.....</b>	<b>53</b>
5.2.1	Chemotaxis zu CXCL12 (SDF-1a) an Tag 4 nach Sekundärimmunisierung .....	55
5.2.2	Chemotaxis zu den CXCR3-Liganden CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) an Tag 4 nach Sekundärimmunisierung mit OVA .....	57
5.2.3	Chemotaxis gegen Liganden von CXCR3 und CXCR4 an Tag 6.....	60
5.2.4	Handelt es sich bei den IgG-ASC, die zu CXCR3-Liganden migrieren, um andere als die, auf die der CXCR4-Ligand CXCL12 chemotaktisch wirkt?.....	61
5.2.5	Chemotaxis gegen andere Chemokine .....	62
<b>5.3</b>	<b>Chemotaxis von Antikörper sezernierenden Zellen aus dem Knochenmark.....</b>	<b>64</b>
5.3.1	Chemotaxis an Tag 6 und Tag 12 nach Sekundärimmunisierung .....	64
<b>5.4</b>	<b>Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 an der Oberfläche der Plasmazellen....</b>	<b>67</b>
5.4.1	Identifizierung der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen im Durchflusszytometer .....	67

5.4.2	Expression von CXCR4 an der Oberfläche von Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen aus dem Knochenmark .....	70
5.4.3	Zelltransfer von Ovalbumin-spezifischen ASC aus der Milz .....	71
<b>5.5</b>	<b>Chemokinexpression im gesunden und chronisch entzündeten Gewebe .....</b>	<b>74</b>
5.5.1	Normalisierung der cDNA .....	74
5.5.2	Analyse der mRNA-Expression von CXCR3- und CXCR4-Liganden bei NZB/W(F1)- und BALB/c-Mäusen.....	76
<b>6</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>6.1</b>	<b>Diskussion der Methodik .....</b>	<b>80</b>
<b>6.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>83</b>
<b>6.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b><i>Zusammenfassung</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>7.1</b>	<b>Chemotaxis von IgG-sezernierenden Zellen.....</b>	<b>96</b>
<b>7.2</b>	<b>Summary.....</b>	<b>98</b>
7.2.1	Chemotaxis of IgG secreting cells .....	98
<b>8</b>	<b><i>Referenzen</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i>.....</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b><i>Danksagung</i>.....</b>	<b>114</b>
<b>11</b>	<b><i>Lebenslauf</i>.....</b>	<b>115</b>
<b>12</b>	<b><i>Publikationen und Kongreßbeiträge</i>.....</b>	<b>116</b>
<b>12.1</b>	<b>Erst- und Teilaufschäften.....</b>	<b>116</b>
<b>12.2</b>	<b>Kongreßbeiträge .....</b>	<b>117</b>
<b>13</b>	<b><i>Erklärung</i>.....</b>	<b>118</b>

## 10 Danksagung

Ich möchte an erster Stelle ganz herzlich Dr. Rudolf Manz für die ausgezeichnete Betreuung danken, die er mir bei der Erstellung dieser Arbeit hat zuteil werden lassen. Rudi, Du warst stets bereit, Dir Zeit zu nehmen, um mit mir zu diskutieren und meine Fragen zu klären. Dein ansteckender Enthusiasmus war wirklich sehr motivierend!

Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt danke ich für die Bereitschaft, diese externe Arbeit trotz seiner knapp bemessenen Zeit zu begutachten.

Ich danke Prof. Dr. Andreas Radbruch dafür, dass er mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin zu erstellen und für seine wissenschaftliche Unterstützung.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde und Kollegen am DRFZ für die angenehme Atmosphäre, die bei der Arbeit herrschte.

Insbesondere möchte ich mich bei Anette Peddinghaus für ihre Hilfe und technische Unterstützung bedanken, vor allem aber auch für die Freundschaft, die uns beide verbindet.

I am very grateful indeed to Dr. Giuliana Cassese and Dr. Sergio Arce for their support and help. Both of you are not only excellent teachers but also wonderful friends; your smiles have always warmed my heart in the cold “Berliner Winter”.

Bei Gwendolin Mühlinghaus, Miro Mostarac, Bimba Hoyer und Katrin Moser möchte ich mich für die Hilfe beim Korrekturlesen und für die anregenden Diskussionen in unserer Arbeitsgruppe bedanken, bei denen wir auch sehr viel Spaß hatten.

Dr. Gudrun Debes danke ich für ihre guten Ratschläge und Hilfe bei der Etablierung der Chemotaxisversuche.

Dörte Huscher sei für die Beratung bei Fragen der Statistik gedankt.

Auch Dr. Catrin Unsicker möchte ich für ihre wertvolle Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Ein ganz lieber Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir durch ihre Erziehung eine positive Lebenseinstellung vermittelt haben und mir beigebracht haben, einmal angefangene Dinge zu vollenden. Außerdem möchte ich an dieser Stelle meine Großmutter erwähnen, die immer unerschütterlich an mich geglaubt hat.

## 11 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Anja Erika Hauser

Stubbenkammerstrasse 13

10437 Berlin

Telefon/Fax: +49-30-44678792

email: anjahouser@gmx.net

Geburtsdatum: 17.12.1973

Geburtsort: Bad Dürkheim

### **Schulbildung:**

1980-84 Grundschule Landau-Arzheim

1984 Staatliches Max-Slevogt-Gymnasium Landau/Pfalz

1993 Abitur

### **Studium:**

1993 Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

1995 Physikum

1996-1997 Unterassistentin in der Pferdekllinik der Tierärztlichen Hochschule

Freisemester mit Praktika:

-Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

-University of Illinois (Champaign-Urbana) im Bereich Kleintiermedizin, Chirurgie und Reproduktionsmedizin sowie klinische Pathologie

-DVM Chet Blackey (Lexington, Kentucky), Spezialist für equine Reproduktionsmedizin

-Arizona Equine Hospital (Phoenix, Arizona)

1999 Abschluß des Studiums mit Staatsexamen und Approbation als Tierärztin

Weiterer beruflicher Werdegang:

Praktikum in der Experimentellen Anästhesiologie der Charité in Berlin.

Seit April 2000 am Deutschen Rheumaforschungszentrum in der Arbeitsgruppe Humorale Immunologie (Gruppenleiter: Dr. R. A. Manz) tätig.



## 12 Publikationen und Kongreßbeiträge

### 12.1 Erst- und Teilautorschaften

Hauser, A. E., G. F. Debes, S. Arce, G. Cassese, A. Hamann, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 169:1277.

Hauser, A. E., G. Muehlinghaus, R. A. Manz, G. Cassese, S. Arce, G. F. Debes, A. Hamann, C. Berek, S. Lindenau, T. Doerner, F. Hiepe, M. Odendahl, G. Riemekasten, V. Krenn, and A. Radbruch. 2003. Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 987:266.

Cassese, G., S. Lindenau, B. de Boer, S. Arce, A. Hauser, G. Riemekasten, C. Berek, F. Hiepe, V. Krenn, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2001. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 31:2726.

Arce, S., G. Cassese, A. Hauser, T. Dorner, M. Odendahl, R. Manz, A. Radbruch, and F. Hiepe. 2002. The role of long-lived plasma cells in autoimmunity. *Immunobiology* 206:558.

Manz, R. A., S. Arce, G. Cassese, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14:517.

Cassese G., Arce S., Hauser A. E., Lehnert K., Moewes B., Mostarac M., Muehlinghaus G., Szyska M., Radbruch A. und Manz R. A., 2003. Plasma Cell Survival is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *J Immunol* 171, im Druck befindlich

## ***12.2 Kongreßbeiträge***

1. „The role of CXCR3 and CXCR4 in plasma cell differentiation and homeostasis“  
Posterpräsentation auf dem Keystone Symposium Chemokines and Chemokine Receptors (7.-12.1.2003 in Breckenridge, Colorado, USA)
2. „The role of CXCR3 and CXCR4 in plasma cell migration and survival“  
Posterpräsentation auf dem 33rd Annual Meeting of the German Society of Immunology (25. -28.9.2002 in Marburg)
3. „Functional chemokine receptors on plasma blasts and their possible role for migration of these cells into the bone marrow“  
Vortrag und Posterpräsentation auf der International Conference of the DFG-MDC on Cell Migration in Development and Disease (28.11.-1.12 2001 in Berlin)

## **13 Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 3.7.2003

Anja Hauser