

Regulation der Plasmazell-Homöostase in protektiven und autoreaktiven Immunprozessen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Immunologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Rudolf Manz

geboren am 17.04.1963.....in Loffenau

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 17.03.2004

Gutachter: 1. Prof. K. Rajewsky
2. Prof. M. Reth

Datum des öffentlich wissenschaftlichen Vortrags zum Thema "Das immunologische Gedächtnis" vor dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin: 21.11.2005

Inhaltsverzeichnis

	REGULATION DER PLASMAZELL-HOMÖOSTASE IN PROTEKTIVEN UND AUTOREAKTIVEN IMMUNPROZESSEN.....	1
1	ZUSAMMENFASSUNG.....	3
2	EINLEITUNG.....	10
	2.1 Das Immunsystem.....	10
	2.2 Antikörper.....	10
	2.3 Plasmazellen.....	11
	2.4 Das NZB/W Mausmodel für systemische Lupus erythematodes.....	13
3	ERGEBNISSE.....	14
	3.1 Die Lebensspanne von Plasmazellen ist nicht Antigen-abhängig.....	14
	Manz, et al, <i>Int Immunol</i> 1998. 10: 1703-1711.....	15
	3.2 Das Überleben von Plasmazellen wird durch synergistische Effekte von Zytokinen und Kontakt-abhängigen Signalen vermittelt.....	24
	Cassese et al., <i>J Immunol</i> 2003. 171: 1684-1690.....	25
	3.3 Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 sind an der Regulation des Wanderungsverhaltens IgG-sezernierender Zellen beteiligt.....	32
	Hauser , et al., <i>J Immunol</i> 2002. 169: 1277-1282.....	34
	3.4 Plasmazell-Homöostase in den entzündeten Nieren von NZB/W Mäusen.....	40
	Cassese et al., <i>Eur J Immunol</i> 2001. 31: 2726-2732.....	41
	3.5 Schwach CD38 ausprägende IgG-sezernierende Zellen sind die Vorläufer verschiedener Plasmazell-Populationen.....	48
	Arce et al., <i>J Leucocyte biology</i> , In Press	49
4	DISKUSSION.....	57
	4.1 Die Rolle von Antigen für die Aufrechterhaltung des B-Zell Gedächtnisses.....	57
	4.2 Plasmazell-Überlebensnischen.....	59
	4.3 Plasmazell-Homöostase im Verlauf von Autoimmunerkrankungen.....	61
	4.4 Regulation der Plasmazell-Lokalisation.....	62
	4.5 Ausblick.....	64
5	LITERATUR.....	65
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	71
7	DANKSAGUNG.....	72

1. Zusammenfassung

Die in den Körperflüssigkeiten aller Vertebraten vorhandenen Antikörper (Immunglobuline) sind wichtige Komponenten des Immunsystems. Diese Moleküle besitzen eine variable Region, in denen sich verschiedene Antikörpermoleküle unterscheiden und die eine spezifische Bindung an ein bestimmtes Antigen, z.B. ein Pathogen bzw. deren Toxine, vermitteln. Die Bindung eines Antikörpers kann die toxische Wirkung vieler bakterieller Produkte inhibieren und lenkt andere Komponenten des Immunsystems zum entsprechenden Pathogen welches hierdurch gezielt bekämpft werden kann. Humorale Antikörper schützen jedoch nicht nur effektiv vor Pathogenen, evident z.B. bei passiven Schutzimpfungen, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Ätiopathologie vieler Autoimmunerkrankungen.

Antikörper werden durch Plasmazellen gebildet und in die Körperflüssigkeiten sezerniert. Bei diesen Zellen handelt es sich um terminal differenzierte B-Zellen deren einzige Aufgabe es ist, Antikörper in großen Mengen herzustellen. Selbst Jahre nach einer Immunreaktion gegen bestimmte Immunogene können noch Plasmazellen gefunden werden, die Antikörper gegen das ursprüngliche Immunogen produzieren. Diese persistierenden Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil des immunologischen Gedächtnisses, tragen jedoch vermutlich auch zur Chronizität von Autoimmunerkrankungen bei. Ein besseres Verständnis der Regulation der Differenzierung und Homöostase von Plasmazellen kann zur Entwicklung neuer Impfkonzeppte und Therapieansätzen zur Behandlung von Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel des systemischen Lupus erythematodes (SLE), beitragen.

In der vorliegenden Schrift werden Arbeiten zur Regulation der Homöostase von Plasmazellen vorgestellt. Dies umfasst im Einzelnen die Bereiche Differenzierung, Migration und Überleben dieser Zellen. Im Ergebnissteil sind 5 unserer Originalarbeiten abgedruckt¹. Alle Artikel sind in englischer Schrift abgefasst und entstanden in dem Zeitraum von 1998 bis 2004. Jeder Originalarbeit ist eine Zusammenfassung vorangestellt, die die jeweilige Arbeit und den Zusammenhang

¹ Der Autor dieser Schrift ist der verantwortliche Autor (corresponding author) für die abgedruckten Arbeiten

mit den anderen Publikationen kurz beschreibt. Die beschriebenen Arbeiten trugen wesentlich zur Entwicklung eines Modells der Plasmazelldifferenzierung und Homöostase bei. Dieses Modell und seine Konsequenzen für die Antikörperproduktion bei protektiven Immunreaktionen einerseits und bei Autoimmunerkrankungen andererseits werden im letzten Abschnitt dieser Schrift diskutiert.

Der Ergebnisteil beinhaltet Arbeiten zur Differenzierung humaner Plasmazellen sowie zur Regulation der Homöostase von Plasmazellen in verschiedenen Tiermodellen für protektive und autoreaktive Immunreaktionen.

BALB/c Mäuse wurden mit dem Protein-Antigen Ovalbumin immunisiert und die Antigen-spezifische Immunantwort verfolgt. Die Immunisierung führt zur Bildung von anti-Ovalbumin-Antikörper sezernierenden Plasmazellen und dient als Modell für eine T-Zell-abhängige protektive Immunantwort. Wir konnten zeigen, dass Ovalbumin-spezifische Plasmazellen eine Lebensspanne vergleichbar der von Gedächtnis B-Zellen erreichen können und Gedächtnis Antikörpertiter in syngene Rezipienten transferieren (siehe 3.1). Etwas später erhielten andere Arbeitsgruppen ähnliche Ergebnisse für Plasmazellen die Antikörper anderer Spezifitäten produzieren. Dies zeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf das von uns gewählte Modellsystem oder Antigen beschränkt sind.

Es zeigte sich, dass nur ein kleiner Teil der im Verlauf einer Immunisierung erzeugten Plasmazellen langlebig wird (im Verlauf einer Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin ca. 10%). In der frühen Phase dieser Immunantwort wird in sekundären lymphatischen Geweben eine grosse Anzahl von Plasmazellen gebildet, die zur Bildung des hohen initialen Maximums des Antikörpertiters führt, wie er bei dieser, aber auch vielen anderen Immunreaktionen beobachtet wird. Die Mehrzahl dieser Plasmazellen leitet nach wenigen Tagen Apoptose ein, ohne den Ort ihrer Entstehung zu verlassen. Ein Teil der in den sekundären, lymphatischen Geweben gebildeten Plasmazellen kann jedoch in das Knochenmark wandern, um dort für lange Zeit zu überleben und Antikörper zu produzieren. Es war schon seit langem bekannt, dass die Einwanderung von Plasmazellen in das Knochenmark Voraussetzung ist für die Bildung von Langzeit-Antikörpertitern. Es besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Lebensspanne von Plasmazellen und

deren Lokalisation, bzw. dem Wanderungsverhalten dieser Zellen oder ihrer unmittelbaren Vorläufer. Da experimentell oftmals nicht zwischen reifen Plasmazellen und deren Vorläufern, sogenannten Plasmablasten unterschieden werden kann, werden beide Zelltypen im Folgenden unter dem Begriff Antikörper-sezernierende Zelle zusammengefasst.

Die Arbeitsgruppe von Jason Cyster konnte zeigen, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 eine wichtige Rolle bei der Lokalisation von Plasmazellen im Knochenmark spielen, d.h. entweder für die Migration oder das Zurückhalten in diesem Organ. Wir untersuchten das Wanderungsverhalten von Ovalbumin-spezifischen IgG-sezernierenden Zellen gegenüber Konzentrationsgradienten aller zum damaligen Zeitpunkt bekannten Chemokine zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung (siehe 3.3). Wir fanden, dass diese Zellen innerhalb eines auf wenige Tage nach der Immunisierung beschränkten Zeitintervalls zu ansteigenden Konzentrationen der Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL12 migrierten. Bei CXCL9, CXCL10 und CXCL11 handelt es sich um Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3. CXCL12 ist der einzig bekannte Ligand von CXCR4. Die von uns untersuchten Zellen zeigten keine Reaktion auf andere Chemokine. Diese Resultate legen nahe, dass beide Rezeptoren und ihre Liganden CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL12 an der Regulation der Migration von Antikörper-sezernierenden Zellen beteiligt sind. Dass die in der Immunisierung entstandenen Antikörper-sezernierenden Zellen die Fähigkeit zur Migration gegen Gradienten von CXCL12 innerhalb von 12 Tagen verlieren, deutet darauf hin, dass CXCR4 für die Migration dieser Zellen in das Knochenmark, vermutlich jedoch nicht jedoch für das Zurückhalten von reifen Plasmazellen in diesem Organ, wichtig ist.

Die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 werden der Gruppe der entzündlichen Chemokine zugeordnet. Hiermit ergibt sich ein direkter Zusammenhang zu unseren Untersuchungen zur Plasmazell-Homöostase in NZB x NZW F1 (NZB/W) Mäusen (siehe 3.4), einem Modell für den SLE. Im Verlauf der Erkrankung kann in diesen Tieren die Ausbildung einer chronischen Nephritis beobachtet werden. Autoantikörper, z.B. solche spezifisch für doppelsträngige DNA, sind wesentlich an der Pathogenese beteiligt. Die Homöostase Antikörper-sezernierender Zellen in NZB/W Mäusen wurde im Rahmen dieser Arbeit

untersucht. Wir fanden, dass die Verteilung von Plasmazellen (auch autoreaktiver) in diesen Tieren nach Ausbruch der Erkrankung im Vergleich zu Gesunden stark verändert ist. Die Anzahl von Plasmazellen in Milz und der entzündeten Niere von erkrankten NZB/W Mäusen ist etwa 50-fach erhöht, während ihre Anzahl im Knochenmark nicht signifikant verändert ist. Anti-DNA-Antikörper-sezernierende Plasmazellen finden sich präferentiell in der Milz.

Unsere Untersuchungen zeigten weiter, dass für den CXCR3-Liganden CXCL10 kodierende mRNA im chronisch entzündeten Gewebe von NZB/W Mäusen mindestens 100-mal höher ausgeprägt wird als in nicht autoimmunen Kontrolltieren. Zusammen mit unserem bereits oben beschriebenen Befund, dass Antikörper-sezernierende Zellen CXCR3 ausprägen können, legt nahe, dass über diesen Rezeptor vermittelte Signale an der Akkumulation von Plasmazellen in entzündetem Nierengewebe von NZB/W Mäusen beteiligt sind. Chemotaktische Aktivität gegenüber CXCR3-Liganden konnte auch für Antikörper-sezernierende Zellen aus diesen Tieren nachgewiesen werden.

Nach ihrer Einwanderung in entzündetes Gewebe oder Knochenmark können Antikörper-sezernierende Zellen sehr lange überleben. Die Halbwertszeit von Plasmazellen im Knochenmark von Mäusen beträgt mehrere Monate. Wir haben die Ursache für die lange Lebensspanne von Knochenmark-Plasmazellen untersucht (siehe 3.2). Hierzu haben wir diese Zellen aus dem Gewebe isoliert und die Voraussetzungen für ihr Überleben in Kultur eingehend studiert. Wir fanden, dass bestimmte im Knochenmark vorhandenen Faktoren in der Lage sind, Plasmazellen *in vitro* am Leben zu erhalten (Cassese et al 2003). Diese Faktoren sind: IL-5, IL-6, SDF-1, TNF-alpha und Liganden von CD44, wie zBsp Hyaluronsäure, ein Bestandteil von extrazellulärer Matrix, wie sie von Stromazellen gebildet wird. Ein wichtiger Befund war, dass ein optimales Überleben der Plasmazellen das synergistische Zusammenspiel einer Kombination von Überlebensfaktoren voraussetzt, zum Beispiel Stimulation von CD44 zusammen mit IL-6. Die von uns identifizierten Plasmazell-Überlebensfaktoren werden oft auch in entzündetem Gewebe in verstärkter Masse ausgeprägt.

Das zum effizienten Überleben von Plasmazellen notwendige Vorhandensein mehrerer Überlebensfaktoren und der Befund, dass nur eine begrenzte Anzahl der

in einer bestimmten Immunreaktion gebildeten Plasmazellen langlebig wird, führte zum Konzept der Plasmazell-Überlebensnischen. Diese Hypothese geht davon aus, dass im Knochenmark eine begrenzte Anzahl von Plasmazell-spezifischen Überlebensnischen zur Verfügung steht. Erreicht eine Plasmazelle oder deren Vorläufer eine solche Nische, kann diese überleben und langfristig Antikörper sezernieren. Entzündungen könnten zur transienten Bildung solcher Plasmazell-Überlebensnischen führen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Homöostase von IgG-sezernierenden Plasmazellen und ihren Vorläufer im Menschen untersucht (siehe 3.5). Die Methode der "Zellulären Affinitätsmatrix" wurde angewandt um diese Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Zellen aus Blut, Tonsille und Knochenmark wurden analysiert und verschiedene Plasmazell-Subpopulationen identifiziert und zu charakterisiert. Auf Grund dieser Daten wurde die Plasmazelldifferenzierung hypothetisch in folgende Stufen unterteilt: in der Tonsille entstehen aus kleinen, CD38-/CD19+ Plasmablasten erst mittelgroße, CD38+/CD19+ und dann CD38++/CD19+ Zellen. Diese Zellen verlassen dann dieses sekundäre lymphatische Organ über das Blut, um in das Knochenmark einzuwandern und hier zu terminal differenzierten CD19+, CD45+/- Plasmazellen zu reifen. In diesem Organ wurden zwei Subpopulationen von CD19++ und CD19+ Plasmazellen identifiziert. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit einer diskret ablaufenden terminalen Plasmazell-Differenzierung im Knochenmark.

Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Arbeiten, dass die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 sowie synergistische Effekte der Überlebensfaktoren IL-5, IL-6, SDF-1, TNF-alpha und Hyaluronsäure an der Regulation der Plasmazell-Homöostase beteiligt sind. Diese Befunde führten zur Hypothese, dass das Langzeit-Überleben von Plasmazellen durch Überlebensnischen ermöglicht wird. Das Vorhandensein von zwei Plasmazell-Subpopulationen im Knochenmark humaner Probanden ist mit dem in der Maus entwickelten Konzept der Überlebensnischen vereinbar. Dieses Konzept wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Arbeit liefert die Grundlagen zur

Entwicklung neuer Therapieansätze zur spezifischen Beseitigung autoreaktiver Plasmazellen, die im Verlauf von Autoimmunerkrankungen auftreten und zur Pathogenese beitragen können.

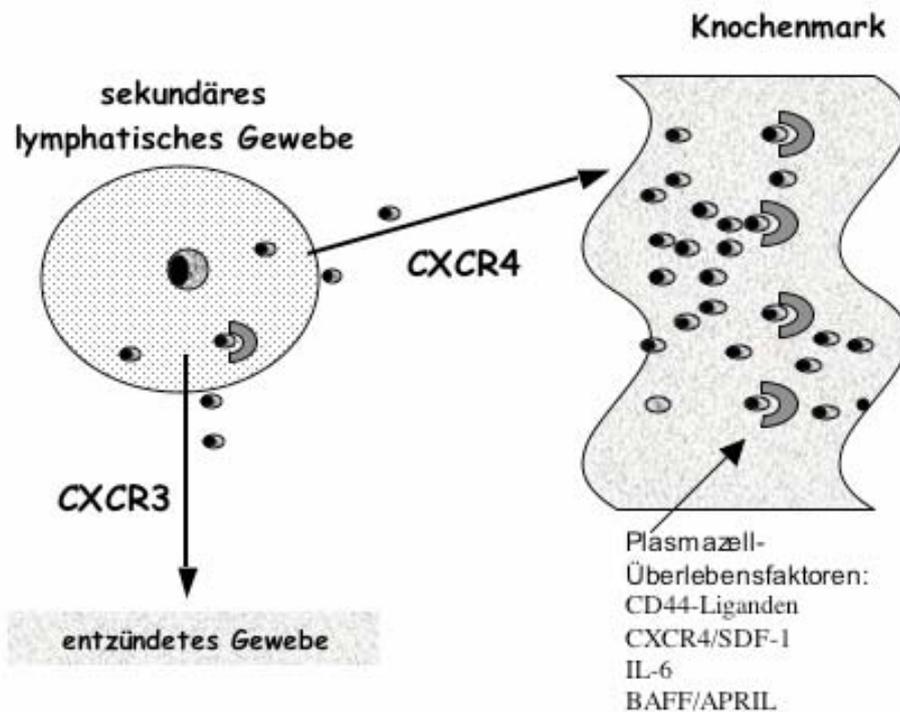


Abbildung 1. Schema der Regulation des Überlebens und des Homings von Plasmazellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit trugen wesentlich dazu bei, die hier schematisch dargestellte Hypothese der Regulation der Plasmazell-Homöostase durch Überlebensnischen aufzustellen. Die Ausprägung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 steuert die Migration von Plasmazellvorläufern (Plasmablasten) in entzündetes Gewebe und das Knochenmark. Hier befindet sich eine begrenzte Anzahl von „Nischen“, in denen eine spezifische Kombination von Plasmazell-Überlebensfaktoren gebildet wird. Die Hypothese der Regulation der Plasmazell-Homöostase durch Überlebensnischen wurde in der Literatur eingehend diskutiert (14; 32).