

#### **4. Diskussion**

Bis 1997 wurde allgemein davon ausgegangen, dass die Produktion von Serumantikörper-Titern im Wesentlichen während der Phase der Aktivierung und terminalen Differenzierung von B-Zellen reguliert wird [3]. Dies beruhte hauptsächlich auf der Vermutung, dass die eigentlichen Antikörper-sezernierenden Zellen, d.h. Plasmazellen und ihre unmittelbaren Vorläufer generell eine sehr kurze Lebensspanne aufweisen. Diese Annahme wurde vor wenigen Jahren durch mehrere Arbeiten widerlegt. Tatsächlich besitzt der grösste Teil der Plasmazellen in den sekundären lymphatischen Geweben eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Plasmazellen im Knochenmark eine Lebensspanne ähnlich der von Gedächtnis B-Zellen erreichen können [15, 31, 33]. Die von diesen Zellen produzierten Antikörper im Serum spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen und in der Pathologie von Autoimmunerkrankungen [67, 68]. Damit ergab sich die Frage, wie die Homöostase von Plasmazellen in protektiven und autoreaktiven Immunreaktionen reguliert wird. Diese Fragestellung war Ausgangspunkt und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

##### **4.1 Die Rolle von Antigen für die Aufrechterhaltung des B-Zell Gedächtnisses**

Persistierendes Antigen und eine daraus resultierende kontinuierliche Aktivierung der für dieses Antigen spezifischen Zellen wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch als Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des B-Zell-Gedächtnisses angesehen [3, 69, 70]. Natives Proteinantigen kann in Form von Immunkomplexen auf der Oberfläche von folliculären dendritischen Zellen (FDC) monatelang in sekundären lymphatischen Organen gespeichert werden.

Nachdem B-Zellen eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben und der von ihnen produzierte Antikörper hierdurch eine Änderung seiner Affinität erfahren hat, findet eine Kompetition dieser Zellen um die Bindung des gespeicherten Antigens statt. B-Zellen mit einer erhöhten Affinität können das nur in einer begrenzten Menge vorhandenen Antigen binden und bekommen so ein notwendiges Signal, um in den Pool der Gedächtnis B-Zellen einzutreten [21, 37]. Stimulation durch

Antigen ist also entscheidend für die Initiierung einer spezifischen Immunantwort und der Bildung von Gedächtniszellen.

Man ging lange davon aus, dass das Vorhandensein von Antigen auch für ein persistierendes B-Zell Gedächtnis notwendig ist [69]. Dabei wurde oftmals nicht zwischen dem Überleben von einzelnen Gedächtnis B-Zellen, dem Fortbestehen einer Gedächtniszell-Population oder der Aufrechterhaltung eines spezifischen Antikörpertiters unterschieden.

Wir testeten, ob Antigen für das Überleben langlebiger Plasmazellen und des durch diese Zellen produzierten Gedächtnis-Antikörpertiter benötigt wird, durch Transfer von Ovalbumin-spezifischen, langlebigen Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen in syngene Rezipienten, die zuvor noch keinen Kontakt zu diesem Antigen hatten [33]. Der Befund, dass transferierte Gedächtnis B-Zellen nur bei gleichzeitigem Co-Transfer von Ovalbumin in der Lage waren Gedächtnis-Antikörpertiter zu transferieren, ist in Übereinstimmung mit der erwarteten Antigenabhängigkeit der Initiierung von B-Zell Gedächtnisantworten. Ausserdem zeigte dieses Resultat, dass ohne Co-Transfer von Ovalbumin die Konzentration dieses Proteins in den Rezipienten die kritische Konzentration nicht überschreitet, die zur Aktivierung von Gedächtnis B-Zellen nötig ist. Der Transfer von langlebigen Plasmazellen ohne Co-Transfer dieses Antigens führte jedoch zur Bildung von persistierenden Ovalbumin-spezifischen Antikörpertitern in den Rezipienten. Damit war gezeigt, dass das Überleben von langlebigen Plasmazellen nicht von der Stimulation durch Antigen abhängt. Etwas später konnte von der Arbeitsgruppe Rajewsky gezeigt werden, dass Gedächtnis B-Zellen ebenfalls in der Abwesenheit von Antigen überleben können [60]. Antigen ist offensichtlich an der Selektion von Gedächtnis B-Zellen im Keimzentrum beteiligt und führt zur Aktivierung von Gedächtnis B-Zellen und zur Differenzierung in Plasmazellen. Die Aufrechterhaltung des B-Zell-Gedächtnisses, d.h. das Überleben von Gedächtnis B-Zellen und langlebigen Plasmazellen ist jedoch Antigen-unabhängig. Dies schliesst nicht aus, dass persistierendes Antigen das Immunsystem permanent stimulieren und zur Bildung von Plasmazellen anregen kann. Eine solche Situation könnte etwa bei chronischen Infektionen gegeben sein [71-73]. Nach vereinzelter Stimulation mit Antigen, z.B. nach einer Immunisierung bzw. Impfung, verschwindet das Antigen mit einer Halbwertszeit die

viel kürzer ist als die der spezifischen Antikörpertiter. Dies spricht dafür, dass in diesen Fällen persistierendes Antigen nicht wesentlich zur Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses beiträgt.

#### **4.2 Plasmazell-Überlebensnischen**

Es war bereits seit langem bekannt, dass die Bildung von persistierenden Gedächtnis-Antikörpertitern in protektiven Immunantworten von der Einwanderung von Plasmazellen in das Knochenmark begleitet wird [27-29, 62, 74-76]. Sowohl wir als auch andere Arbeitsgruppen konnten zwar langlebige Plasmazellen auch in der Milz nachweisen, jedoch ist ihre Anzahl in diesem Organ in gesunden Mäusen etwa 10 bis 100-mal niedriger als im Knochenmark [33, 77]. Es lag daher nahe, dass Faktoren, die das Überleben von Plasmazellen unterstützen, hauptsächlich im Knochenmark produziert werden. Diese Hypothese wurde sowohl durch die hier beschriebenen, als auch durch andere Arbeiten bestätigt [61, 78, 79]. Wir konnten zeigen, dass "Feederzellen" aus dem Knochenmark und die Knochenmarks-Stromazelllinie ST-2, jedoch in weit geringerer Masse "Feederzellen" aus der Milz das Überleben von isolierten Plasmazellen unterstützen können. Die Arbeitsgruppe Kansas fand etwa zeitgleich mit unserer Arbeit, dass adhärente Zellen aus dem Knochenmark, vermutlich Stromazellen, das Überleben von Plasmazellen unterstützen [79].

Einige Plasmazell-Überlebensfaktoren, die von Knochenmark-Stromazellen produziert werden können und das Überleben von Plasmazellen in Kultur unterstützen, konnten von uns identifiziert werden [61]. Dies sind IL-5, IL-6, SDF-1, TNF-alpha, und Hyaluronsäure. Keiner dieser Faktoren allein konnte jedoch das Überleben von isolierten Plasmazellen über Zeiträume von länger als 3 Tagen sicherstellen. Wir konnten allerdings zeigen, dass verschiedene Überlebensfaktoren synergistisch zusammenwirken können, um Plasmazellen auch über längere Zeiträume am Leben zu erhalten. Dies legt nahe, dass das Überleben von Plasmazellen im Knochenmark durch die Produktion einer spezifischen Kombination von Überlebensfaktoren unterstützt wird. Zusammen mit dem Befund, dass nur eine bestimmte Anzahl von Plasmazellen in einem Organ

langfristig überleben kann ergibt sich die Hypothese, dass die Homöostase von Plasmazellen durch Konkurrenz um eine bestimmte Anzahl von "Überlebensnischen" reguliert wird [14, 32]. Eine Regulation der Homöostase durch Nischen wird auch für andere hämatopoetische Zellarten als wahrscheinlich angesehen [80-82]. Mit diesem Modell ist auch unser Resultat vereinbar, dass im Falle der von uns als Modellsystem verwendeten Gedächtnis-Immunantwort gegen Ovalbumin 3 Wochen nach der Immunisierung nur etwa 10% der gebildeten Plasmazellen in das langlebige Kompartiment dieser Zellen im Knochenmark gefunden wurden [63]. Geht man davon aus, dass alle in diesem Immunisierungsprotokoll gebildeten Plasmazellen von Gedächtniszellen abstammen, kann gefolgert werden, dass ein Selektionsmechanismus vorliegt, der es nur einem Teil der ursprünglich gebildeten Plasmazellen erlaubt, in das Kompartiment langlebiger Plasmazellen einzutreten. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Überlebensnischen stellt einen nahe liegenden Selektionsmechanismus dar.

Die von uns identifizierten Plasmazell-Überlebensfaktoren werden häufig auch in chronisch entzündetem Gewebe gefunden. Es ist daher möglich, dass eine chronische Entzündung die Anzahl von Plasmazell-Überlebensnischen erhöht [14]. Biologisch würde dies insoweit einen Sinn ergeben, als eine chronische Entzündung auf eine lokale Infektion zurückzuführen sein kann. Protektive Plasmazellen können entweder lokal oder in einem nahe gelegenen Lymphknoten gebildet werden und in das entzündete Gewebe einwandern. Wie von uns gezeigt wurde, können Plasmazell-Vorläufer mit dem entsprechenden Chemokinrezeptor CXCR3, ausgestattet sein [63]. Die Akkumulation von Plasmazellen in chronisch entzündetem Gewebe ist seit langem bekannt [22, 83, 84]. Das Überleben dieser Zellen kann durch die Bildung lokal erhöhter protektiver Antikörper dazu beitragen, die Infektion zu beseitigen. Nach Beseitigung der Infektion werden diese Plasmazellen nicht mehr benötigt. In Konsequenz hat das Abklingen der Entzündungsreaktion das Verschwinden der transienten Überlebensnischen, und damit der Plasmazellen zur Folge.

Dass das Überleben von langlebigen Plasmazellen auch *in vivo* tatsächlich massgeblich vom Vorhandensein von Überlebensfaktoren, in diesem Fall von

Liganden des Rezeptors "B cell maturation antigen" (BCMA), abhängig ist, wurde kürzlich in BCMA-defizienten Mäusen demonstriert [78]. Das Vorhandensein von spezifischen Nischen welche die Homöostase verschiedener Zelltypen regulieren, wird seit einiger Zeit diskutiert [85-90]. Stammzellnischen konnten erst kürzlich im Knochenmark identifiziert werden [91, 92].

Die Identifizierung von zwei Plasmazell-Subpopulationen in humanem Knochenmark ist damit vereinbar, dass die für das Überleben von Plasmazellen benötigten Faktoren nur in einer begrenzten Anzahl von "Nischen" vorhanden sind. Bei den Zellen der beiden Knochenmarkspopulationen könnte es sich um Plasmazellen handeln, die in Überlebensnischen lokalisiert sind und um solche, die noch nach solchen Nischen suchen oder die diese wieder verlassen haben, z.B. weil sie daraus durch andere Plasmazellen verdrängt wurden. Die Untersuchung der Rolle der verschiedenen Subpopulationen Antikörper-sezernierender Zellen im Menschen bedarf jedoch noch eingehender Studien.

#### **4.3 Plasmazell-Homöostase im Verlauf von Autoimmunerkrankungen**

Wir testeten eine durch eine systemische chronische Entzündung möglicherweise hervorgerufene Störung der Plasmazell-Homöostase im NZB/W Mausmodell des SLE [65]. Die Erkrankung war offensichtlich begleitet mit einem ca. 50-fachen Anstieg der Zahl von Plasmazellen in der Milz und in der entzündeten Niere. Die Bildung von Plasmazellen fand jedoch grösstenteils in der Milz statt. Wie später noch diskutiert (siehe Abschnitt 4.4) wird die Einwanderung von Antikörper-sezernierenden Zellen in das entzündete Nierengewebe sehr wahrscheinlich durch den Chemokinrezeptor CXCR3 vermittelt. Die dort beobachtete Akkumulation von Plasmazellen unterstützt die Hypothese, dass in chronisch entzündetem Gewebe Plasmazell-Überlebensnischen gebildet werden können.

Vorläufige Untersuchungen zur Lebensspanne der Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen ergaben, dass es sich bei etwa 60% der Plasmazellen in diesem Organ um kurzlebige Plasmazellen handelt. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung, dass eine chronische Aktivierung von Immunzellen an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. Etwa 40% der Plasmazellen in der Milz

haben jedoch eine Halbwertszeit von mindestens 6 Monaten (Hoyer et al, Manuskript unter Revision). Die Lebensspanne der Plasmazellen in den entzündeten Nieren dieser Tiere konnte aus technischen Gründen bislang nicht bestimmt werden.

Es fällt auf, dass nach einer Immunisierung bereits erkrankter Tiere die für das entsprechende Antigen spezifischen Plasmazellen in das Knochenmark und die Nieren wandern, während DNA-spezifische Plasmazellen präferenziell in der Milz zu finden sind. Wie von Mark Shlomchiks Arbeitsgruppe gezeigt wurde, können autoreaktive B-Zellen extrafollikulär aktiviert werden [93]. Dies könnte zu Unterschieden im Wanderungsverhalten dieser Zellen zu den im Follikel aktivierten Ovalbumin-spezifischen Zellen führen. Es gibt jedoch auch alternative Erklärungsmöglichkeiten. Unsere Studien wurden an älteren Tieren durchgeführt, in denen sich die Autoimmunerkrankung bereits manifestiert hatte. Zum Zeitpunkt der Immunisierung könnten zuvor in der Milz gebildete DNA-spezifische Plasmazellen die hier vorhandenen Überlebensnischen bereits besetzt haben.

Der Befund, dass Plasmazellen in sekundären lymphatischen Geweben gebildet werden und dann entweder sterben oder in das Knochenmark wandern um hier langfristig zu überleben, hat offensichtlich im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen keine Gültigkeit. Speziell die Biologie autoreaktiver, langlebiger Plasmazellen die im Verlauf von Autoimmunerkrankungen gebildet werden könnten, bedarf weiterer Untersuchungen [14, 67, 68].

#### **4.4 Regulation der Plasmazell-Lokalisation**

Die Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass das Überleben von Plasmazellen vom Vorhandensein von Überlebensfaktoren in ihrer Umgebung, vermutlich in spezifischen Überlebensnischen, bestimmt wird [14, 61, 79]. In Individuen die nicht an einer Autoimmunerkrankung erkrankt sind, ist das Überleben von Plasmazellen abhängig von der Fähigkeit dieser Zellen in das Knochenmark zu wandern. In an murinem SLE leidenden Tieren findet sich eine stark erhöhte Anzahl langlebiger autoreaktiver Plasmazellen in der Milz. In diesen Tieren wandern Plasmazellen jedoch auch in die entzündeten Nieren um dort für

lange Zeit zu überleben [65]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Regulation der Migration von Plasmazellen oder ihrer direkten Vorläufern, Plasmablasten, eine zentrale Rolle für die Homöostase dieser Zellen spielt.

Von der Arbeitsgruppe von Jason Cyster wurde gezeigt, dass eine Deletion des CXCL12-Rezeptors, CXCR4, auf Plasmazellen zu einer stark erniedrigten Anzahl dieser Zellen im Knochenmark führt [64]. Dies ist zu erklären durch eine reduzierte Wanderung dieser Zellen in das Knochenmark, ein schwächeres Zurückhalten in diesem Organ, oder durch eine verkürzte Lebensspanne dieser Zellen. Wir konnten zeigen, dass sich das Wanderungsverhalten von IgG-sezernierenden Plasmazellen und Plasmablasten im Verlauf ihrer Differenzierung verändert [63]. Im Verlauf einer Gedächtnisimmunantwort wandern diese Zellen transient gegen Konzentrationsgefälle der Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL12. Zusammen mit den Resultaten aus Jason Cysters Gruppe ergibt sich, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 an der Regulation der Wanderung von Plasmazellen in das Knochenmark beteiligt sind. Obwohl diese Zellen nicht mehr gegen Konzentrationsgradienten des CXCR4 Liganden CXCL12 (SDF-1) wandern, wird CXCR4 noch von reifen Knochenmarks-Plasmazellen ausgeprägt. Wie unsere Untersuchungen zur Regulation des Überlebens dieser Zellen zeigen (siehe 3.2 und 4.2), kann die Stimulation von CXCR4 jedoch das Überleben dieser Zellen *in vitro* verlängern. Es liegt nahe, dass die Ausprägung von CXCR4 auf terminal differenzierten Plasmazellen dazu dient, diesen Zellen Überlebenssignale zu vermitteln.

Die Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11 binden alle an den Rezeptor CXCR3 und gehören zur Gruppe der entzündlichen Chemokine. Es wurde gezeigt, dass CXCR3 die Einwanderung aktivierter T-Zellen in entzündetes Gewebe vermitteln kann. Wir konnten zeigen, dass CXCL10 in erkrankten NZB/W Mäusen systemisch mindestens 100-fach stärker ausgeprägt wird als in Mausstämmen ohne autoimmune Vorprägung. Diese Resultate legen nahe, dass diese Überproduktion von CXCL10 an der gestörten Plasmazell-Lokalisation in NZB/W Mäusen mitverantwortlich ist. Der potentielle therapeutische Effekt einer CXCR3 Blockade auf die Entstehung oder den Verlauf des systemischen Lupus in NZB/W Mäusen, wird im Moment in unserem Labor getestet.

#### **4.5 Ausblick**

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Plasmazell-Homöostase vom Zusammenspiel von Faktoren reguliert wird, die die Migration und das Überleben dieser Zellen steuern. Die Ausprägung bestimmter Chemokinrezeptoren ist an der Regulation der Plasmazell-Lokalisation beteiligt. Um langfristig überleben zu können, müssen diese Zellen, bzw. ihre Vorläufer, die sekundären lymphatischen Gewebe verlassen und in das Knochenmark oder chronisch entzündete Gewebe einwandern.

Die Bedeutung einer möglichen Regulation spezifischer Serum-Antikörpertiter auf der Ebene der Plasmazell-Homöostase wurde erst in den letzten Jahren in Betracht gezogen. Entsprechend haben konventionelle Therapieansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zum Ziel, die Aktivierung von T- und B-Zellen zu unterdrücken, bzw. aktivierte Zellen zu eliminieren. Oftmals sind diese Therapien, z.B. die Behandlung mit Cyclophosphamid, nicht in der Lage bereits bestehende Autoantikörpertiter zu beseitigen. Diese werden jedoch wahrscheinlich zumindest zum Teil von langlebigen Plasmazellen gebildet. Diese Zellen sind konventionellen Therapien gegenüber sehr resistent [14, 15]. Die Identifizierung von Plasmazell-Überlebensfaktoren und der Chemokinrezeptoren, die die Lokalisation von Plasmazellen regulieren, können die Grundlage bilden für neue Therapieansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, in denen Autoantikörper eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zukommt, wie etwa dem systemischen Lupus erythematoses.