

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie  
Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin  
und  
dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin

DISSERTATION

**Einwanderung von B-Lymphozyten und Plasmazellen in  
entzündetes Gewebe am Beispiel der murinen  
Lupusnephritis**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Panne  
aus Schwerte

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. F. Hiepe
2. Prof. Dr. med. H.-M. Lorenz
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Voll

Datum der Promotion: 16.05.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Das angeborene und das erworbene Immunsystem . . . . .	5
1.1.1	Lymphozyten und lymphatische Organe . . . . .	6
1.1.2	Migration von B-Lymphozyten und Plasmazellen . . . . .	8
1.2	Systemischer Lupus Erythematoses . . . . .	10
1.2.1	Lupus-Nephritis . . . . .	12
1.3	Das NZB/W Mausmodell des SLE . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Übersicht über die verwendeten Materialien . . . . .	16
3.2	Mäuse . . . . .	18
3.3	Gewinnung der Zellen . . . . .	18
3.3.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension . . . . .	18
3.3.2	Dichtegradientenzentrifugation . . . . .	20
3.4	ELISPOT . . . . .	20
3.4.1	Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot-Methode . . . . .	20
3.4.2	Durchführung des ELISPOT . . . . .	21
3.5	Durchflusszytometrie . . . . .	21
3.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie . . . . .	21
3.5.2	Färbung von Zelloberflächenmolekülen . . . . .	23
3.5.3	Ermittlung absoluter Zellzahlen mit Hilfe von TruCOUNT™ Tubes . . . . .	24
3.6	Immunhistologie . . . . .	25
3.6.1	Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	25
3.6.2	Verarbeitung des Gewebes . . . . .	26
3.6.3	Färbung des Gewebes . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1	Anzahl der B und T-Lymphozyten in den Nieren von NZB/W-Mäusen . . . . .	29
4.2	Lokalisation der B- und T-Lymphozyten in entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen . . . . .	29
4.3	Phänotyp der infiltrierenden B-Lymphozyten . . . . .	30
4.3.1	Isotyp des B-Zell-Rezeptors der infiltrierenden B-Lymphozyten . . . . .	31
4.3.2	Anteil der CD5 positive B-Lymphozyten . . . . .	34
4.3.3	Anteil der PNA positiven B-Lymphozyten . . . . .	34
4.4	Chemokinrezeptoren auf B-Lymphozyten in Niere und Milz von NZB/W-Mäusen . . . . .	35
4.5	Anzahl der IgG und IgM sezernierenden Zellen in den Nieren von NZB/W-Mäusen . . . . .	35
4.6	Lokalisation der Plasmazellen im Nierengewebe von NZB/W-Mäusen . . . . .	38

4.7	Chemokinrezeptoren auf Plasmazellen bzw. Plasmablasten in Niere, Milz und Knochenmark von NZB/W-Mäusen . . . . .	38
4.8	Produktion von Chemokinen in der entzündeten Niere von NZB/W-Mäusen	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
5.1	Nachweis von B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen . . . . .	44
5.2	Phänotyp der Lymphozyteninfiltrate in den entzündeten Nieren . . . . .	44
5.3	Lokalisation und Anordnung der B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Nieren . . . . .	46
5.4	Nachweis von Plasmazellen in den entzündeten Nieren der NZB/W-Maus . .	47
5.5	Produktion von Chemokinen in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen	49
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>54</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>65</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>
	<b>Curriculum vitae</b>	<b>68</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>69</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

*Immunität* wird definiert als der Schutz vor (Infektions-) Krankheiten. Die Zellen und Moleküle die diesen Schutz vermitteln werden zusammenfassend als das *Immunsystem* bezeichnet. Aufgabe des *Immunsystems* ist es Neuinfektionen zu verhindern und bestehende Infektionen zu beseitigen. Daneben spielt das *Immunsystem* eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Beseitigung von körpereigenen entarteten Zellen. Die Bedeutung des Immunsystems für die Gesundheit des Menschen wird deutlich bei der Beobachtung der regelmässig vorkommenden angeborenen Immundefekte und seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts durch die Ausbreitung der Immunschwächekrankheit AIDS. Beide Erkrankungen führen häufig zu lebensbedrohlichen Infektionen der betroffenen Personen.

Die Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus bestehen aus der *angeborenen Immunantwort*, die einen unmittelbaren Schutz vor eindringenden Krankheitserregern bietet, und der *erworbenen Immunantwort*, die bei einer Erstinfektion langsamer reagiert, im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort aber potentiell gegen jedes mögliche Pathogen reagieren und durch den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses eine wiederholte Infektion verhindern kann.

Die Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind besonders die physikalischen und chemischen Grenzen wie z.B. Epithelien und von diesen gebildete antimikrobielle Substanzen (1). Ausserdem gehören phagozytierende Zellen (z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und NK-Zellen zu diesem System. Löslicher Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist das Komplementsystem.

Die angeborene Immunantwort stellt die erste Abwehrreaktion des Organismus dar. Überwinden Pathogene die epitheliale Barriere und dringen in das Gewebe ein, werden sie aufgrund bestimmter Oberflächenmoleküle von Makrophagen als fremd erkannt, aufgenommen, prozessiert und an der Zelloberfläche präsentiert (2). Neben diesem Mechanismus kommt es gleichzeitig zu einer Erkennung bestimmter wiederkehrender Strukturen, die vielen Pathogene eigen sind, durch die sog. Toll-like Rezeptoren (TLR)(3). So signalisiert z.B. TLR-4 das Vorhandensein von Lipopolysaccharid (LPS) das in der äusseren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt.

Gleichzeitig kommt es zu einer Sekretion von Zytokinen, darunter auch Chemokine, die eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen (4). Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion steuern die Chemokine (chemotaktisch wirksame Zytokine) die Einwanderung bestimmter Lymphozyten in das betroffene Gewebe (5). Dazu gehören auch die B-Lymphozyten und Plasmazellen.

Die Effekte der erworbenen Immunität folgen denen der angeborenen Immunität mit einer Latenz von ca. 4–6 Tagen. Ein zentraler auslösender Mechanismus ist die Aktivierung von pathogen-spezifischen T- und B-Lymphozyten durch antigenpräsentierende dendritische Zellen in einem das Gebiet der Infektion drainierenden Lymphknoten (6; 7). In Folge dieser Aktivierung kommt es zu einer Differenzierung der spezifischen B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmablasten und Plasmazellen. Die Antikörper vermitteln einen Teil der Effektormechanismen die zu einer Neutralisation der eingedrungenen Pathogene führen, die sog. humorale Immunität (8).

### 1.1.1 Lymphozyten und lymphatische Organe

#### B- und T-Lymphozyten

Die wesentlichen Zellen der erworbenen Immunantwort sind die B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten können während einer Immunreaktion zu Plasmazellen ausdifferenzieren. Sie sind die Vermittler der humoralen Immunität durch ihre einzigartige Fähigkeit, Antikörper zu produzieren.

Im Unterschied dazu sind die T-Lymphozyten für zellvermittelte Immunreaktionen verantwortlich. So sind z.B.  $CD8^+$ -T-Zellen an der Lyse virusinfizierter Zellen und an der Tötung von entarteten Körperzellen beteiligt.  $CD4^+$ -T-Zellen besitzen wichtige regulatorische Eigenschaften. Sie können u.a. die Proliferation anderer Zellen oder die Sekretion von Zytokinen anregen oder hemmen.

Charakteristisch für alle Lymphozyten ist die Eigenschaft, Antigenrezeptoren auszubilden. Das Spektrum an Rezeptoren eines Individuums ist sehr gross, wobei der einzelne Rezeptor spezifisch für ein Antigen ist und jeder Lymphozyt nur eine Art von Antigenrezeptoren auf der Oberfläche trägt. Dadurch wird klar, dass ein einzelner Lymphozyt nur ein bestimmtes Antigen erkennen kann. Die Möglichkeit des Immunsystems gegen fast jedes mögliche Antigen zu reagieren, beruht auf der grossen Anzahl der sich im Körper befindenden Lymphozyten.

Die Entwicklung der B- und T-Lymphozyten beginnt im Knochenmark. Beide Arten entstehen durch Proliferation und Differenzierung aus einer pluripotenten hämatopoetischen

Stammzelle. Die Reifung der B- und T-Lymphozyten geschieht jedoch an unterschiedlichen Orten, nach denen sich die Nomenklatur dieser Zellen richtet. Die B-Lymphozyten wurden erstmals in der „Bursa fabricii“, einem lymphoiden Organ in der Kloake von Vögeln, entdeckt. Inzwischen steht die Abkürzung auch für den Begriff „bone marrow derived“, da die Reifung der B-Lymphozyten der Säugetiere im Knochenmark stattfindet. Die unreifen Vorläuferzellen der T-Lymphozyten dagegen wandern in den Thymus, um dort bis zum T-Lymphozyten auszdifferenzieren. Die Abkürzung T-Lymphozyt leitet sich von "thymus derived" ab. Nach der Phase der Reifung zirkulieren B- und T-Lymphozyten durch die sekundären lymphatischen Organe und werden dort aktiviert, wenn ihnen das für ihren Antigenrezeptor spezifische Molekül präsentiert wird.

### **Aufbau und Funktion lymphatischer Organe**

Die lymphatischen Organe werden in primäre/zentrale und in sekundäre/periphere unterschieden. Die primär lymphatischen Organe sind der Ort der Entwicklung und Reifung der Zellen des Immunsystems. Beim Menschen sind dies das Knochenmark und der Thymus.

In den sekundär lymphatischen Organen findet dagegen keine Entstehung oder Reifung von Lymphozyten statt. Sie sind der Ort, in denen die ausgereiften B- und T-Lymphozyten mit dem Antigen in Kontakt treten und so, eine antigenspezifische Immunreaktion beginnt. Durch Interaktionen mit dem Grundgewebe werden auch die weitere Entwicklung, das Überleben und die Lokalisation der Lymphozyten innerhalb des sekundär lymphatischen Organs reguliert. Zu den sekundär lymphatischen Organen gehören Lymphknoten, Milz und mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT). Die Grundstruktur dieser Organe ist sehr ähnlich, obwohl sie sich äusserlich stark von einander unterscheiden. Sie besitzen ein bindegewebiges Stützgerüst aus sog. Stromazellen, das im Falle der Milz und der Lymphknoten eine Kapsel bildet. Innerhalb dieser sind die B-Lymphozyten in Follikeln angeordnet. Die T-Lymphozyten befinden sich grössten Teils getrennt davon in den die Follikel umgebenden T-Zell-Zonen. Innerhalb der B-Zell-Follikel bilden sich im Rahmen einer Antigenreaktion Keimzentren aus, in denen die aktivierten B-Lymphozyten stark proliferieren. Gleichzeitig fügen sich in die Antikörpergene der entstandenen B-Zellen Mutationen ein, die die Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor verändern (somatische Hypermutation). Durch die anschliessenden Selektionsprozesse wird nur den B-Lymphozyten das Überleben ermöglicht, die eine hohe Affinität des Rezeptors besitzen (klonale Selektion). Auf diese Weise entwickeln sich in dem Keimzentrum viele antigenspezifische B-Lymphozyten.

Die Bezeichnung MALT fasst mehrere verschiedene lymphatische Gewebe zusammen die in enger Beziehung zu den Schleimhäuten des Körpers stehen. Einen grossen Teil des MALT

macht das GALT (gut associated lymphoid tissue) aus; zu diesem Gewebe gehören u.a. Tonsille, Appendix und Peyersche-Plaques des Krummdarms.

## 1.1.2 Migration von B-Lymphozyten und Plasmazellen

### Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

Für die Funktion des Immunsystems ist es essentiell, daß sich die Zellen dieses Systems auf sehr differenzierte und zielgerichtete Weise durch den Organismus bewegen können. Dabei beeinflusst diese Fähigkeit alle Bereichen des Systems. Sowohl bei der Entwicklung und Reifung von der hämatopoetischen Stammzelle zur Effektorzelle des Immunsystems als auch bei der Ausübung der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr durch die ausdifferenzierten Zellen spielt die gezielte Wanderung, eine wichtige Rolle. Die Mechanismen, die diese Wanderung steuern, interessieren die Wissenschaft schon seit einigen Jahrzehnten. So hat Sir James L. Gowans bereits 1964 eine wichtige Arbeit über die Rezirkulation und Extravasation von Lymphozyten in der Ratte publiziert (9).

An der Regulation dieser Bewegungen und an der Positionierung der Zellen sind viele verschiedene Botenstoffe beteiligt. Die in den hier dargestellten Experimenten untersuchten Moleküle und deren Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Chemokine. Neben diesen gibt es weitere Botenstoffe, die zu den Gruppen der Selektine (10), der Integrine (11) und der Immunglobuline (12) gezählt werden.

Zurzeit sind 45 humane Chemokine bekannt. Es sind 8–10 kDa große Polypeptide, die aus 70–125 Aminosäuren bestehen und eine starke strukturelle Ähnlichkeit besitzen. In Bezug zu ihrer Aminosäuresequenz werden sie in 4 verschiedene Gruppen geordnet (CC, CXC, CX3C, und C) (13; 14). Die beiden größten Familien unterscheiden sich durch die Anordnung von zwei Cysteinresten im aminoterminalen Bereich. Diese liegen entweder direkt nebeneinander (CC-Chemokin) oder sind durch eine einzelne Aminosäure voneinander getrennt (CXC-Chemokin). Letztere können je nach An- oder Abwesenheit eines Glutaminsäure-Leucin-Arginin-Tripeptides (ELR-Motiv) weiter unterteilt werden. Die ELR<sup>+</sup> CXC-Chemokine sind hauptsächlich in der Lage, neutrophile Granulozyten anzulocken und zu aktivieren. Außerdem fördern sie die Bildung neuer Blutgefäße. Im Gegensatz dazu wirken ELR<sup>-</sup> CXC-Chemokine tendenziell stärker auf nicht-myeloide Leukozyten (NK-Zellen, Lymphozyten) und wirken einer Angiogenese und der Proliferation von Endothelzellen entgegen (15).

Außer diesen beiden Hauptgruppen gibt es noch Chemokine mit zwei anderen Strukturformen. Die kleine Gruppe der C-Chemokine besteht aus zwei Vertretern (XCL1 und XCL2), die im aminoterminalen Bereich nur ein Cystein enthalten. Diese stellen eine Splicevarian-

te des gleichen Gens dar und unterscheiden sich in nur einer Aminosäure (16). Daneben ist CX3CL1 (Fractaline) das bisher einzige bekannte CX3C-Chemokin mit 3 Aminosäuren zwischen den zwei aminoterminalen Cysteinen (17).

Zusätzlich zu der strukturellen Einteilung gibt es noch eine Unterscheidung in „homeostatische“ und „inflammatorische“ Chemokine. „Homeostatische“ Chemokine werden konstitutiv in lymphoiden Geweben exprimiert und haben zum Teil großen Einfluss auf die Entstehung von sekundär lymphatischen Organen und auf die physiologische Positionierung der unterschiedlichen Lymphozyten in diesen Geweben, z.B. den Aufbau von B- und T-Zell-Zonen in Lymphknoten und Milz (18). Im Gegensatz dazu können „inflammatorische“ Chemokine im Rahmen einer Entzündung von Parenchymzellen vieler verschiedener Gewebe gebildet werden. Auch aktivierte Blutplättchen können diese freisetzen. Die Produktion von „inflammatorischen“ Chemokinen kann als Reaktion auf verschiedene Stimuli stark hochreguliert werden (19). Diese umfassen z.B. Lipopolysaccharid (LPS), verschiedene Zytokine, Tumornekrose-Faktor und Interferone. Die Hauptaufgabe der „inflammatorischen“ Chemokine ist die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort einer Entzündung und Infektion (20).

**Tabelle 1.1**  
2 Beispiele für Chemokine und ihre Rezeptoren

systematischer Name	humaner Ligand	muriner Ligand	Rezeptor
CXCL10	IP10	IP10	CXCR3
CXCL13	BCA-1/BLC	BCA-1/BLC	CXCR5

## Migration von B-Lymphozyten und Plasmazellen

Wie bei den meisten anderen Zellen des Immunsystems hängt auch die Funktion der B-Lymphozyten und der Plasmazellen von ihrer Fähigkeit ab, sich zielgerichtet bewegen zu können. Sowohl der Aufbau der sekundär lymphatischen Organe als auch die Reaktion des Immunsystems auf eingedrungene Krankheitserreger wird stark durch diese Kompetenz beeinflusst.

Ausgereifte naive B-Lymphozyten verlassen die Milz mit dem Blut und rezirkulieren durch verschiedene lymphatische Organe in denen sie nach Kontakt mit einem für sie spezifischen Antigen aktiviert werden können. Wichtig für die Steuerung dieses Verhaltens sind die beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 und ihre jeweiligen Liganden (CXCR5–CXCL13 und CCR7–CCL21 und CCL19) (18; 21; 22). Sie sind hauptverantwortlich für die Einwanderung von B- und T-Zellen in sekundär lymphatische Organe und für die Positionierung

dieser Zellen in sog. B-Zell-Follikeln und T-Zell-Zonen. Naïve B-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR5. CXCL13, der Ligand dieses Rezeptors, wird von Stromalen Zellen innerhalb des B-Zell-Follikels nicht aber in der T-Zell Zone gebildet und sichert dadurch die Wanderung der naiven B-Zellen in den B-Zell-Follikel (23). CCR7 wird sowohl auf B-Zellen als auch auf T-Zellen exprimiert. Aber im Gegensatz zu den T-Zellen wandern die B-Zellen nur schwach gegen die Liganden CCL19 und CCL21. Diese Chemokine werden in den T-Zell-Zonen nicht aber in den B-Zell-Follikeln produziert. Nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen und der Kreuzvernetzung des B-Zell-Rezeptors verstärkt sich die Wanderung der B-Zellen gegen CCL19 und CCL21. Die nun aktivierten B-Lymphozyten wandern dadurch in Richtung T-Zell-Zone zur Grenze zwischen B- und T-Lymphozyten (24). Dort können die B-Zellen Antigen präsentieren und von den T-Zellen Signale erhalten die ihre weitere Differenzierung beeinflussen.

## 1.2 Systemischer Lupus Erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) gehört zu den generalisierten Autoimmunerkrankungen, in dessen Verlauf es zu einer Beteiligung aller Organsysteme des Körpers kommen kann. Typisch für die Erkrankung ist das Vorkommen von Autoantikörpern (25; 26). Dies sind Antikörper die als Antigen körpereigene Strukturen erkennen und in Folge dessen zu einer Schädigung an den jeweiligen Geweben bzw. Zellen führen können. Beim SLE werden besonders häufig Autoantikörper nachgewiesen, die spezifisch für verschiedene Zellkernbestandteile sind. Typisch sind z.B. Antikörper die sich gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) richten. Neben diesen sind Anti-Sm-Antikörper besonders spezifisch für die Diagnose SLE (Sm-Antikörper erkennen das sog. Smith-Antigen, ein nukleäres Ribonukleoprotein und Bestandteil der Spleissosomen) (27; 28). Die Höhe des Titers der beiden genannten Antikörper korreliert mit der Krankheitsaktivität. Weiterhin ist ihr Nachweis mit besonders schweren Organmanifestationen wie der Lupus-Nephritis oder einer ZNS-Beteiligung assoziiert (29).

Neben diesen zwei Antikörperspezifitäten gibt es noch eine Reihe weiterer Autoantikörper, die häufig bei Patienten mit SLE nachgewiesen werden können. Im Gegensatz zu den Anti-ds-DNA und Anti-Sm-Antikörpern sind diese allerdings nicht spezifisch für den SLE. Sie kommen auch häufig bei anderen verwandten Autoimmunerkrankungen wie Sjögren-Syndrom, systemischer Sklerose oder MCTD vor. Ein Nachweis bei Patienten mit SLE dient allerdings der Charakterisierung von Subgruppen mit bestimmter klinischer Symptomatik.

Die Grundlagen der Erkrankung und was genau zu den beobachteten Veränderungen führt konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Sicher ist ein genetischer Einfluss,

der u.a. durch Zwillingsstudien belegt werden konnte (30). Gezeigt wurde, dass bei 24% der untersuchten eineiigen Zwillingen beide Geschwister an SLE erkrankten. Dem gegenüber kam es bei den zweieiigen Zwillingen nur in 2% der Fälle zu einer gleichzeitigen Erkrankung beider Geschwister. Weiterhin ist die Erkrankung positiv mit dem HLA-Haplotyp DR3 assoziiert, was auch für einen genetischen Einfluss auf die Erkrankung spricht. Das Humane-Leukozyten-Antigen (HLA) ist direkt an der Präsentation von Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen beteiligt.

Anomalien im Bereich der B-Zell-Homöostase sind bekannt (31; 32; 33). Eine allgemeine Hyperaktivität der B-Zellen von Lupuspatienten könnte die regelmäßig nachzuweisende Hypergammaglobulinämie erklären (34; 35; 36). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Serum von Lupus Patienten hohe Spiegel von Faktoren vorkommen, die für das Überleben von B-Zellen wichtig sind (37; 38; 39).

Für einige Erkrankungen wie die Immunkomplex-Nephritis oder die durch Autoantikörper vermittelte Zytopenie besteht kein Zweifel an der Rolle der Autoantikörper in der Pathogenese. Wie wichtig die Produktion und Sekretion von Autoantikörpern für die Entstehung und den Verlauf der Lupus-Nephritis sind, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß eine Glomerulonephritis auch entsteht wenn die B-Zellen nicht in der Lage sind Antikörper zu sezernieren (40). Bei völliger Abwesenheit der B-Zellen bleiben dagegen alle Symptome des SLE aus (41; 42). Schon früher konnte gezeigt werden, dass mit einem Transfer von Vorläufer-B-Zellen auch die Entstehung von SLE auf Mäuse übertragen wird die diese Krankheit normalerweise nicht entwickeln (43).

Bei allen Veränderungen die im Bereich der B-Zellen beobachtet werden können scheint auch eine Beteiligung der T-Zellen an den krankheitsauslösenden Prozessen sicher zu sein (44). Beschrieben wurde ein gestörtes Verhältnis von regulatorischen zu zytotoxischen T-Zellen und parallel zu den B-Zellen eine Hyperreaktivität der T-Zellen (45; 46). Möglicherweise kommt es zu einem sich selbst verstärkenden Kreislauf einer Interaktion zwischen genetisch hyperreaktiven B-Zellen und T-Zellen die im Rahmen des SLE schon durch schwache Stimuli von Autoantigenen aktiviert werden (47).

Auch im Bereich der ausdifferenzierten B-Zellen, der Plasmazellen, kommt es zu Veränderungen. So konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass es eine Population von langlebigen und z.T. autoreaktiven Plasmazellen gibt, die einer üblichen hochdosierten Therapie mit Cyclophosphamid widersteht und durch diese nicht depletiert werden kann. Auffällig ist auch das Vorkommen dieser Zellen in der Milz der erkrankten Tiere. Normalerweise kommen langlebige Plasmazellen im Knochenmark vor und sorgen für die Aufrechterhaltung von Antikörpertitern nach Impfungen oder Infektionen (48). Langlebige (autoreaktive) Plasmazellen

werden für die Existenz therapieresistenter Autoantikörpertiter bei Autoimmunerkrankungen wie SLE verantwortlich gemacht (49). Auf die Bedeutung von Plasmazellen weisen auch Studien an SLE Patienten hin. So findet man im Blut von SLE-Patienten, besonders in aktiven Krankheitsphasen, eine pathologisch erhöhte Anzahl an Plasmablasten und Plasmazellen (31; 50).

### 1.2.1 Lupus-Nephritis

Die Beteiligung der Nieren im Rahmen des SLE ist eine häufige und ernste Komplikation. Die Prävalenz der Nephritis bei Patienten mit einem SLE wird mit ungefähr 40% angegeben (51). Es sind bereits histologische Veränderungen in einer Nierenbiopsie festzustellen, obwohl klinische Parameter wie Serumkreatinin (bzw. glomeruläre Filtrationsrate) oder Proteinausscheidung im Urin normal sind (52). Eine differenzierte Einteilung der histologischen Veränderungen bietet die Klassifikation der Lupus Nephritis der International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) von 2003 (53). Sie berücksichtigt hauptsächlich glomeruläre Veränderungen die unter Anwendung von Licht-, Immunofluoreszenz- und Elektronenmikroskopie gemacht werden können.

Neben diesen kommt es häufig zu Veränderungen der Gefäße innerhalb der entzündeten Nieren. Beobachtet werden z.B. intravaskuläre Thrombosen, Arterio- und Arteriolsklerose und nekrotisierende Vaskulitis (54). Letztere findet sich z.T. vergesellschaftet mit perivaskulären Leukozyteninfiltrationen und Ablagerungen von Immunkomplexen in den Gefäßwänden (55; 56). Weitere häufige Veränderungen im Rahmen der Lupus nephritis sind tubulointerstitielle Entzündungszeichen und Fibrose (57; 58). Dabei wird die lokale Entzündung durch Lymphozyten und Plasmazellen, regelmäßig aber auch durch neutrophile und eosinophile Granulozyten vermittelt. Den Hauptanteil der infiltrierenden Lymphozyten bilden die T-Zellen. Neben diesen kommen aber auch B-Lymphozyten in hoher Frequenz vor ((59) und eigene Daten siehe Abbildung 4.1).

## 1.3 Das NZB/W Mausmodell des SLE

Für alle Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden weibliche Mäuse des Stammes NZB/W (auch BWF1 genannt) verwendet. Mäuse dieses nicht transgenen Stammes entwickeln spontan eine Autoimmunerkrankung die große Ähnlichkeit mit dem SLE des Menschen besitzt. Die NZB/W wurden im Jahre 1961 erstmals beschrieben und gelten seit langem als besonders geeignetes Modell zur Erforschung des SLE (60; 61; 62).

**Tabelle 1.2**

Vereinfachte Klassifikation der Lupus Nephritis (LN) der International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) von 2003. (aus Weening et al. 2004)

---

<b>Klasse I</b>	<b>Minimale mesangiale LN</b> lichtmikroskopisch normale Glomeruli, aber in der Immunfluoreszenz feststellbare Immunkomplexe
<b>Klasse II</b>	<b>Mesangiale proliferative LN</b> mesangiale Hyperzellularität oder Vergrößerung der mesangialen Matrix und mesangiale Immunkomplexe in der Lichtmikroskopie feststellbar. Isolierte subepitheliale oder subendotheliale Immunkomplexe nur in der Immunfluoreszenz oder der Elektronenmikroskopie feststellbar
<b>Klasse III</b>	<b>Fokale LN</b> aktive oder inaktive fokale, segmentale oder globale Glomerulonephritis die weniger als 50% der Glomeruli betrifft. Typisch ist das Vorkommen von fokalen subendothelialen Immunkomplexen mit oder ohne mesangiale Veränderungen. Diese Klasse wird in eine LN mit aktiven (A), chronischen (C) oder beiden Arten von Läsionen unterteilt.
<b>Klasse IV</b>	<b>Diffuse LN</b> aktive oder inaktive diffuse, segmentale oder globale Glomerulonephritis die mehr als 50% der Glomeruli betrifft. Typisch ist das Vorkommen von diffusen subendothelialen Immunkomplexen mit oder ohne mesangiale Veränderungen. Diese Klasse wird in eine diffuse segmentale (IV-S) und eine diffuse globale (IV-G) Lupus-Nephritis unterteilt. Es weisen dabei mehr als 50% der Glomeruli entweder diffuse segmentale oder diffuse globale Läsionen auf.
<b>Klasse V</b>	<b>Membranöse LN</b> Globale oder segmentale subepitheliale Immunkomplexe oder daraus resultierende Folgeerscheinungen sind lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch oder per Immunfluoreszenz nachweisbar. Es finden sich Zeichen einer fortgeschrittenen Sklerose.
<b>Klasse VI</b>	<b>(Fortgeschrittene) sklerosierende LN</b> Mehr als 90% der Glomeruli erscheinen sklerosiert.

---

Bei den NZB/W handelt es sich um die erste Tochtergeneration einer Kreuzung aus Mäusen der Stämme New Zealand Black (NZB) und New Zealand White (NZW). Mäuse dieser Kreuzung haben eine deutlich verkürzte Lebenserwartung, wobei Weibchen früher und stärker erkranken als ihre männlichen Geschwister, was zu einer mittleren Überlebenszeit von 245 Tagen (Weibchen) gegenüber 406 Tagen (Männchen) führt (63).

Klinisches Leitsymptom der Erkrankung ist die Glomerulonephritis mit begleitender Proteinurie, die zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt und bei den weitaus meisten Tieren die Todesursache darstellt (64). Eine starke Proteinurie (ca. 300 mg Eiweiß /dl Urin) manifestiert sich zwischen dem 5. und 6. Monat. Andere Parameter als Zeichen einer pathologischen Veränderung des Immunsystems können schon sehr viel früher nachgewiesen werden. So können z.B. als Folge einer B-Zell-Hyperaktivität schon im ersten Lebensmonat erhöhte Gammaglobulinwerte im Serum gemessen werden. Histologisch betrachtet handelt es sich bei der Glomerulonephritis um eine chronisch obliterative Form mit Proliferation von Endothel und Mesangiumzellen. Es kommt zu einer Infiltration durch mononukleären Zellen und granulären Ablagerungen von C3 und IgG (v.a. IgG2a) in den Glomeruli, mesangial und tubulointerstitiell (65). Im Blut der NZB/W finden sich hohe Titer von IgG Anti-dsDNA-Antikörpern, Anti-Chromatin-Antikörpern und antinukleären Antikörpern (ANA). Weitere klinische Veränderungen, die beobachtet werden können, sind eine Atrophie des Thymus (66), Vaskulitis (67) und Hyperplasie der Lymphknoten (62).

Auch NZB-Mäuse zeigen Symptome einer autoimmunen Erkrankung (68). Sie entwickeln eine autoimmune hämolytische Anämie und ab einem Alter von 12 Monaten eine chronische Glomerulonephritis, die insgesamt aber milder als die der NZB/W ist. Die Lebenserwartung der NZB-Mäuse beider Geschlechter ist verkürzt, wobei Weibchen aufgrund eines geringgradig beschleunigten Krankheitsverlaufes ca. 1 Monat früher sterben als die Männchen (Lebenserwartung zwischen 430 und 470 Tagen). Todesursache ist meist eine schwere Anämie. Ursache der Anämie ist die Bildung von Anti-Erythrozyten-Antikörpern. Sie erscheinen ab einem Alter von 3 Monaten im Serum der NZB-Mäuse und können bei 100% der 12–15 Monate alten Mäuse nachgewiesen werden (66; 69).

Im Gegensatz zu den NZB-Mäusen sind die NZW-Mäuse klinisch gesund. Im Serum mancher Tiere können zeitweise nicht pathogene Autoantikörper nachgewiesen werden, die hauptsächlich gegen ssDNA und Histone gerichtet sind (70). Trotz dieses unauffälligen Phänotypes besitzt sie viele Gene die im Falle einer Kreuzung mit einem anderen Mausstamm zu einer lupusähnlichen Erkrankung führen (71; 72; 73).

## 2 Ziel der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von immunologischen Prozessen, die im Rahmen einer Lupusnephritis in den Nieren stattfinden. Beispielhaft wird dieses an einem etablierten Mausmodell des systemischen Lupus erythematodes durchgeführt.

Besonderes Augenmerk wird dabei auf die beteiligten Zellen des Immunsystems, speziell B-Lymphozyten und Plasmazellen, gelegt. Die Einwanderung von Lymphozyten in entzündete Organe, auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wurde schon früher beschrieben. Welche Steuerungsmechanismen dem zugrunde liegen, konnte bisher allerdings nicht vollständig aufgeklärt werden. Ziel der Arbeit ist es, mehr darüber herauszufinden, welche Zellen an der Entzündung beteiligt sind und welche Chemokine das Wanderungsverhalten in die Niere und innerhalb dieses Organes bestimmen.

# 3 Material und Methoden

Der Beschreibung der einzelnen Methoden ist eine Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Medien vorangestellt. Die im Einzelnen verwendeten Materialien sind bei der Beschreibung der Methoden aufgeführt.

## 3.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

**Tabelle 3.1**  
Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8,00 g/l NaCL 0,20 g/l KCL 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
PBS + Bovines Serum Albumin (PBS/BSA)	PBS 0,5 % BSA	Biomol
ELISPOT Blockierungspuffer	PBS 3 % BSA	Biomol
ELISPOT Waschpuffer	PBS 3 % BSA 0,01 % Tween 20	Sigma-Aldrich
AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol 0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl <sub>2</sub> 900 ml Wasser pH 10,25 eingestellt mit HCL	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Komplettes Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % Fetales Kälberserum (FCS) 10 mM L-Glutamat 20 μM β-Mercaptoethanol	Life Technologies Invitrogen Invitrogen Invitrogen
Percoll™	Kieselgel	Amersham Biosciences

**Tabelle 3.2**  
Immunfluoreszenzfärbung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Roth
Mausserum	Sigma-Aldrich
HCL 1 N	Merck
Fluoreszenz Eindeckmedium	DakoCytomation

**Tabelle 3.3**  
Material für zellbiologisches Arbeiten

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Glasflaschen 0,2l/0,5l/1,0l	Schott
Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml	Eppendorf
Zellröhrchen 15 ml/50 ml	Greiner bio-one
FACS Röhrchen	BD Biosciences
Pipetten	Corning Costar
Spritzen	Henke Sass Wolf
Kanülen	Braun
Pipettenspitzen	Corning Costar
Zellsiebe (70 $\mu$ m)	BD Biosciences
96er Mikrotiterplatten (flachbodig & hochbindend)	Corning Costar

**Tabelle 3.4**  
ELISPOT-Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Detektionsantikörper</i>	
Ziege-Anti-Maus-IgG-Biotin	Southern Biotech
Ziege-Anti-Maus-IgM-Biotin	Southern Biotech
<i>Sekundärreagenz</i>	
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Roche
<i>Substrat</i>	
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
<i>Trägersubstanz für das Substrat</i>	
Agarose	Sigma-Aldrich

## 3.2 Mäuse

Die untersuchten Gewebe stammen von weiblichen Mäusen aus der ersten Filialgeneration der Kreuzung von New Zealand Black Männchen mit New Zealand White Weibchen (NZB/W). Alle Mäuse wurden im Bundesamt für Risikobewertung, in Berlin-Marienfelde, unter spezifisch pathogen freien Bedingungen gezüchtet.

## 3.3 Gewinnung der Zellen

### 3.3.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden Zellen aus den Nieren, der Milz und dem Knochenmark von NZB/W Mäusen verwendet. Um die Zellen zu gewinnen, wurden die Mäuse durch cervicale Dislokation getötet. Das Fell der Mäuse wurde vor der Eröffnung des Bauchraumes mit 50 % Ethanol besprüht, um eine Kontamination der präparierten Organe durch Keime zu reduzieren. Unmittelbar danach wurden die Nieren, die Milz und beide Oberschenkelknochen entnommen und in 4 °C kaltes PBS/BSA gelegt. Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Milz und die Nieren mit einer Schere grob zerkleinert und danach in einer mit PBS/BSA gefüllten Petrischale mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70  $\mu\text{m}$  gedrückt. Die in einem 50 ml Röhrchen aufgefangene Zellsuspension wurde mit einer Beschleunigung von 400  $g$  bei 4 °C für 10 min. zentrifugiert und das Zellpellet danach in einem beliebigen Volumen PBS/BSA resuspendiert.

**Tabelle 3.5**  
Reagenzien für die Durchflusszytometrie

<b>Bezeichnung</b>	<b>Klon</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Blockierung von Fc-Rezeptoren</i>			
anti-Maus-Fc $\gamma$ Rez.II/III	2.4G2/75	—	ATCC
<i>Blockierung unspez. Bindungsstellen</i>			
Ratten IgG		—	Biotrend
<i>Färbeantikörper (monoklonal)</i>			
CD3	KT3	Alexa 488	Serotec
CD5	53-7.3	PE	BD Pharmingen
CD21	7G6	Cy5	ATCC
CD23	B3B4	PE	BD Pharmingen
CD45	13/2.3	PE	Southern Biotech
CD138	281-2	PE	BD Pharmingen
B220 (CD45R)	RA3.6B2	Biotin, Cy5, Dig	ATCC
CXCR3	220803	APC	R&D Systems
CXCR5	2G8	Biotin	BD Pharmingen
IgM	Biotin, PE	R6-60.2	BD Pharmingen
IgD	11-26	Biotin, FITC	BD Pharmingen
$\kappa$ light chain	187.1	FITC	BD Pharmingen
MHCII	M5/114	FITC	ATCC
<i>Färbeantikörper (polyklonal)</i>			
Ziege-anti-Maus CXCL13		—	R&D Systems
<i>Sekundärantikörper/-reagenzien</i>			
anti-Digoxigenin		Alexa 546	Roche
Esel-anti-Ziege-IgG		Alexa 647	Molecular Probes
Streptavidin (SA)		FITC	BD Pharmingen
DAPI			Southern Biotech
<i>Sonstiges</i>			
TruCOUNT™ Tubes			BD Biosciences

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde jeder der beiden Femuren eines Tieres unter Zuhilfenahme einer Pinzette gefasst, mittels Skalpell von anhängenden Muskel- und Sehnenanteilen befreit und der Femurkopf sowie die Femurkondylen abgetrennt. Mit einer 5 ml Spritze, die zuvor mit PBS/BSA gefüllt und mit einer 25-Gauge Kanüle bestückt worden war, wurde von einer Seite in den eröffneten Röhrenknochen eingegangen, der Knochenmarkspopf sorgfältig herausgespült und in einer Petrischale aufgefangen.

### **3.3.2 Gewinnung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Zur Gewinnung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung der Zellzahlen und die genauere Bestimmung des Phänotyps der B-Zellen und Plasmazellen wurden diese in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten zentrifugiert. Während der Dichtegradientenzentrifugation positionieren sich die Bestandteile der Einzelzellsuspension entsprechend ihrer Dichte in dem Gradienten aus Kieselgel-Polymeren. Auf diese Weise können die mononukleären Zellen von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und von Zellfragmenten getrennt werden. Die isolierten Zellen werden danach für die Durchflusszytometrie weiterverarbeitet.

In dem konkreten Fall wurde ein diskontinuierlicher Gradient aus zwei Phasen benutzt. Dazu wurden 5 ml einer Mischung aus 70 % Percoll<sup>TM</sup> und 30 % RPMI Medium in einem 15 ml Röhrchen vorgelegt und darauf 10 ml einer Mischung aus 40 % Percoll<sup>TM</sup> und 60 % Zellsuspension in RPMI geschichtet. Danach wurde das Tube für 25 min. bei Raumtemperatur und einer Beschleunigung von 550 *g* ohne Rotorbremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen befinden sich nach der Zentrifugation gut sichtbar in der Ebene zwischen den Phasen unterschiedlicher Konzentration und können mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in ein separates Röhrchen gegeben werden. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Zellen zweimal in 50 ml PBS/BSA gewaschen.

## **3.4 ELISPOT**

### **3.4.1 Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot-Methode**

Der ELISPOT ist eine Methode um Antikörper-sezernierende Zellen (ASC) nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Detektion der Antikörper die von Plasmazellen sezerniert werden. Diese werden während einer Sekretionsphase auf einer festen Matrix immobilisiert und anschließend durch spezifisch bindende Antikörper (anti-Ig-Antikörper; siehe Tab. 3.4) detektiert. Durch die Kopplung dieser Detektion an eine Enzymreaktion wird die Antikörper-

sekretion schließlich sichtbar gemacht.

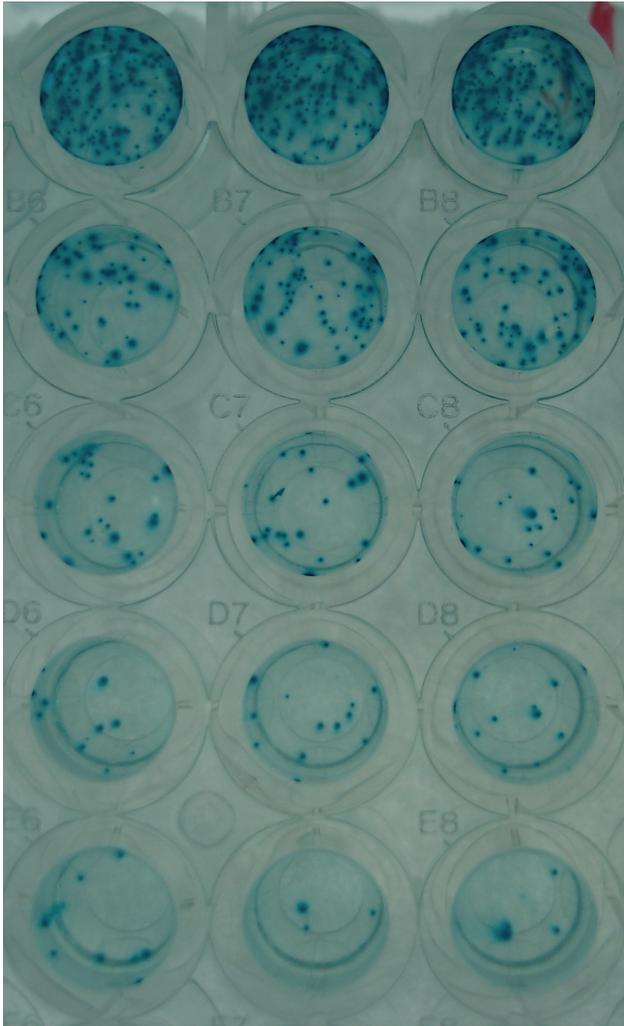
### 3.4.2 Durchführung des ELISPOT

Die in dieser Arbeit dargestellten ELISPOTs wurden in flachbodigen, hochbindenden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Diese wurden im ersten Arbeitsschritt für ca. 12 Stunden entweder mit anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) oder anti-Maus-Immunglobulin M (IgM) inkubiert, um den Boden mit diesen Antikörpern zu beschichten. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBS/3% BSA abgesättigt. Danach wurden die in RPMI-Medium resuspendierten Zellen in die Reihe A der Platte gegeben und schrittweise bis Reihe H verdünnt. Dabei wurde jeweils nur ein Drittel der Zellen in die nächste Reihe von Vertiefungen weitergegeben. Die Sekretion der Antikörper erfolgte für 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen durch gründliches Waschen mittels PBS/3% BSA/0,01% Tween 20 (Waschpuffer) vollständig entfernt. Dieser Puffer wurde auch zum Waschen zwischen allen nachfolgenden Arbeitsschritten sowie zur Herstellung der Gebrauchslösungen für die Reagenzien verwendet. Zur Detektion wurde ein polyklonaler biotinylierter Ratte-anti-Maus-IgG- (bzw. IgM-) Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt und die Platten damit für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten für 30 min. bei Raumtemperatur mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat inkubiert und dann das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat hinzugefügt. Dieses war zuvor in einer Konzentration von 1 mg/ml in AMP-Puffer gelöst worden. Die Lösung wurde dann mit geschmolzener Agarose vermischt, so dass die Gebrauchskonzentration der Agarose 0,6% betrug, und für 30 min. bei 65 °C im Wasserbad erwärmt. Die Verfestigung der Agarose geschah für 10 min. bei Raumtemperatur, nach weiteren 10 min. bei 4 °C wurde die Farbreaktion für 2 Stunden bei 37 °C entwickelt. Die ELISPOTs ließen sich dann unter einem Invertmikroskop (Olympus CK30) auszählen (siehe Abbildung 3.1). Alle Proben wurden mindestens in Doppelansätzen analysiert.

## 3.5 Durchflusszytometrie

### 3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, auch bezeichnet als **FACS** (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting), können Zellen nach ihrer Größe und Granularität und aufgrund von bestimmten Oberflächenmerkmalen oder intrazellulären Molekülen (meist Antigene der CD Nomenklatur - Cluster of **D**ifferentiation) unterschieden und charakterisiert werden. Da die Messung auf



**Abbildung 3.1**  
**Elispotassay zur Detektion von IgG und IgM sezernierenden Zellen.** Bild eines ELISPOTs zur Detektion von IgG und IgM sezernierenden Zellen. In die oberste Reihe von Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde eine definierte Anzahl von Knochenmarkszellen einer Maus gegeben. Die Zellsuspension wurde in vertikaler Richtung 1:3 verdünnt. Die Anzahl der blauen „Spots“ ist identisch mit der Anzahl der Plasmazellen in der Kammer während der Inkubationsphase.

der Ebene einzelner Zellen stattfindet und es möglich ist in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Zellen aufzunehmen, ist die Methode besonders dazu geeignet statistisch sichere quantitative Aussagen (über Zellpopulationen) zu machen.

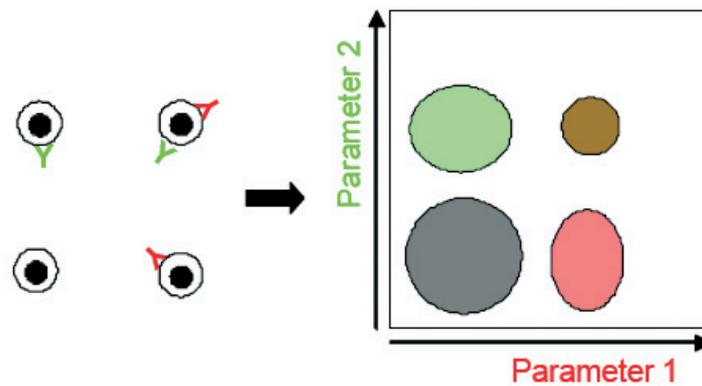
Bei der Analyse passieren die einzelnen Zellen Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen. Dabei wird das Vorwärtsstreulicht in einem Winkel von  $3-10^\circ$  und das Seitwärtsstreulicht in einem Winkel von  $90^\circ$  gemessen, wobei das Vorwärtsstreulicht mit der Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität der Zelle korreliert ist. Um Aussagen über bestimmte Antigene auf der Oberfläche von Zellen machen zu können, müssen diese vor der zytometrischen Messung mit spezifisch bindenden Antikörpern markiert werden, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Diese sog. Fluorochrome haben die Eigenschaft, Licht in einem begrenzten Wellenlängenbereich zu emittieren, wenn sie durch den Laserstrahl des Zytometers fließen. Die Wellenlänge der Anregung und der Emission ist für jedes Fluorochrom spezifisch, wodurch es möglich ist, gleichzeitig mehrere Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb der Zelle zu analysieren. Die Stärke des emittierten Lichtes steigt mit der Menge des auf oder in der Zelle gebundenen Antikörpers bzw. Fluorochroms und ist damit proportional zur Konzentration des gemessenen Antigens auf oder in der Zelle. Bei dem hier verwendeten Zytometer handelt es sich um ein LSRII der Firma BD Biosciences.

Nach der Aquisition der Messparameter müssen die Daten analysiert und in geeigneter Form graphisch dargestellt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der Software CellQuest<sup>TM</sup> (BD Biosciences) analysiert.

Graphisch werden die Daten in zweidimensionalen Punktediagrammen abgebildet. In diesen sog. Dot Plots erscheint jede gemessene Zelle als ein Punkt der über die Position auf der x- und der y-Achse Information über die gemessene Signalintensität (Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht, Fluoreszenzintensität) gibt. Das Streulicht wird dabei auf einer linearen Skala, die Fluoreszenzintensität auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Ein Schema eines solchen zweidimensionalen Punktediagramms ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

### 3.5.2 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Die Färbung der in Kapitel 4.3 auf Seite 30 genannten Oberflächenmoleküle wurde in PBS/BSA durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Färbeantikörper zu verringern wurde die Zellsuspension mit spezifische Antikörpern gegen Fc $\gamma$ Rez.II/III (CD16 & CD32) und mit Ratten-Immunglobulin vorinkubiert. Für die eigentliche Färbung der Zellen wurden pro Ansatz  $100\ \mu\text{l}$  der Suspension in ein  $1,5\ \text{ml}$  Eppendorf-Röhrchen gegeben und die Primärantikörper hinzu pipettiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  und soweit möglich in Dunkelheit gehalten. Nach  $10-15\ \text{min.}$  Inkubationszeit wurden



**Abbildung 3.2**

**Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen im zweidimensionalen Punktediagramm (Dot Plot).** Je nachdem, ob eine Zelle positiv für Parameter 1, Parameter 2 oder für beide ist, erscheint sie als Einzelpunkt im rechten unteren (rot dargestellt), im linken oberen (grün dargestellt) oder im rechten oberen Bereich des Diagramms. Mehrere Zellen zusammen ergeben dann die hier dargestellten Punktwolken, die auch als Populationen bezeichnet werden. Die Zellen, die die Punktwolke im linken unteren Bereich bilden (grau dargestellt), sind für keinen der dargestellten Parameter positiv.

die Zellen in 1000–1500  $\mu\text{l}$  PBS/BSA gewaschen und bei 400  $g$  für 10 min. zentrifugiert. Falls nötig wurde dieser Schritt mit einer Sekundärreagenz oder einem Sekundärantikörper wiederholt. Nach der Färbung wurden die Zellen am Zytometer gemessen. Tote Zellen wurden durch die Zugabe von DAPI unmittelbar vor der Messung markiert und konnten auf diese Weise von der Analyse ausgeschlossen werden.

### 3.5.3 Ermittlung absoluter Zellzahlen mit Hilfe von TruCOUNT™

#### Tubes

Die in Kapitel 4.1 auf Seite 29 genannten absoluten Zellzahlen für B220 positive B-Zellen und CD3 positiven T-Zellen wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung von TruCOUNT™ Tubes ermittelt. Diese vorgefertigten FACS-Röhrchen enthalten eine bekannte Anzahl von sog. fluoreszierenden „Beads“ die parallel zu den Zellen durch das Zytometer aufgenommen werden. Bei der Auswertung der zytometrischen Daten kann die Zahl der aufgenommenen „Beads“ durch setzen eines geeigneten Gates ermittelt werden. Da man das Volumen der in das Tube eingesetzten Zellsuspension kennt, kann man das während der Messung aufgenommene Volumen und damit auch die absolute Zahl an Zellen in der Zielpopulation errechnen. Folgende Formel wurde dazu benutzt:

$$(1) \frac{\text{Zahl der aufgenommenen Zellen}}{\text{Anzahl der aufgenommenen „Beads“}} \times \frac{\text{Zahl der „Beads“ pro Röhrchen}}{\text{Testvolumen}} = \text{Zellzahl im Testvolumen}$$

Ein Beispiel für die Ermittlung der B- und T-Zellzahlen in einer entzündeten Niere ist in

Abbildung 3.3 dargestellt. Vor der Messung der Zellzahlen werden die Niere, wie in Abschnitt 3.3.1 erklärt wird, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und die B- und T-Zellen angereichert (siehe Abschnitt 3.3.2).

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in einem bekannten Volumen PBS/BSA resuspendiert (meist in ca. 500  $\mu\text{l}$ ). Von dieser Zellsuspension wurden 100  $\mu\text{l}$  in ein TruCOUNT™ Tube gegeben und mit Antikörpern gegen CD45, B220 und CD3 für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe mit 500–700  $\mu\text{l}$  PBS aufgefüllt und am Zytometer gemessen.

### Beispielrechnung für Abbildung 3.3:

folgende Werte werden benötigt:

Anzahl der gemessenen B-Zellen (R2)	3196
Anzahl der gemessenen „Beads“ (R4)	8004
Gesamtzahl der „Beads“ pro Tube	50000
eingesetztes Volumen	100 $\mu\text{l}$

eingesetzt in Gleichung (1) ergibt sich:

$$\frac{3196 \text{ B-Zellen}}{8004 \text{ „Beads“}} \times \frac{50000 \text{ „Beads“}}{100 \mu\text{l}} = 199,65 \text{ B-Zellen}/\mu\text{l} \text{ (Zellsuspension)}$$

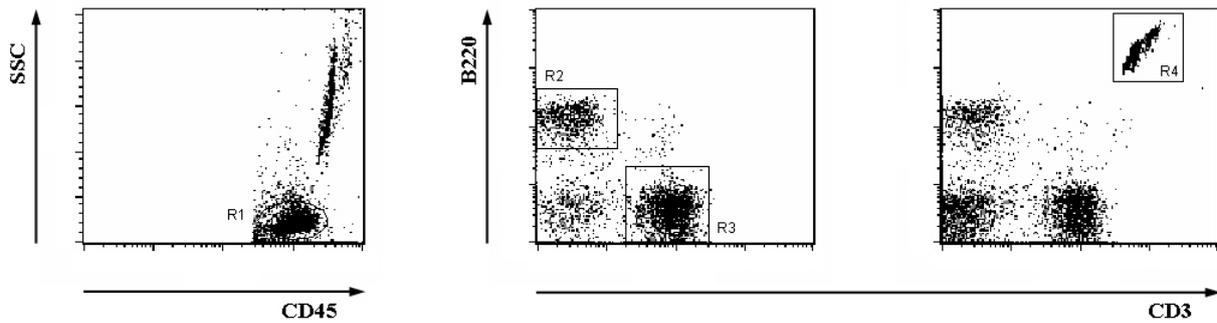
Da in diesem Fall die Zellen einer Niere in insgesamt 250  $\mu\text{l}$  resuspendiert wurden, muß das Ergebnis noch mit 250 multipliziert werden und es ergibt sich die Zahl von **49913** B-Zellen pro Niere.

## 3.6 Immunhistologie

### 3.6.1 Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes (CLSM) des Types TCS SP2 der Firma Leica erstellt.

Die Technologie der konfokalen Mikroskopie ermöglicht es hochauflösende Abbildungen aus relativ dicken Gewebeschnitten zu produzieren. Grundsätzlich besteht das CLSM aus einer Lichtquelle, einem dichroitischen Spiegel, einem Objektiv, einer Detektionsblende und einem Detektor (siehe Abbildung 3.4). Durch den Einsatz einer Lochblende vor dem Detektor wird



**Abbildung 3.3**

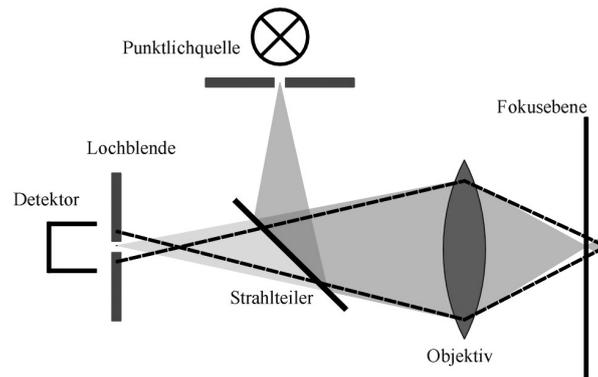
**Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl an B- und T-Zellen in einer Zellsuspension aus den entzündeten Nieren einer 6–8 Monate alten NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft das Vorgehen zur Ermittlung der absoluten Zellzahl einer Zielpopulation. Mit Hilfe des linken Diagramms (x-Achse: CD45; y-Achse: Seitwärtsstreulicht/SSC) wird ein Gate um die CD45 positiven Zellen gesetzt. Im mittleren Dot Plot (x-Achse: CD3; y-Achse: B220) werden ausschließlich die Zellen innerhalb dieses Gates angezeigt, so daß die Zahl der B- und T-Zellen möglichst gering verfälscht ist. Das rechte Dot Plot zeigt die Anzahl der bei der Messung aufgenommenen „Beads“ an. Hier sind wieder alle Ereignisse abgebildet, was wegen der sehr hohen und eingengen Fluoreszenzintensität der „Beads“ kein Problem darstellt.

reflektiertes Licht, das nicht aus der Fokusebene stammt, fast vollständig unterdrückt, so dass es nicht zu der bei einem konventionellen Durchlicht-/ bzw. Auflichtmikroskop unvermeidlichen Überlagerung von Lichtsignalen aus mehreren Fokusebenen kommt. Zur Erzeugung eines Bildes wird das Objekt Punkt für Punkt abgerastert. Durch den Einsatz verschiedener Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge ist es möglich, die Probe mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und diese, zum Teil gleichzeitig, anzuregen und zu detektieren. Wie bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie und bei der Durchflusszytometrie werden spezifisch bindende Antikörper genutzt, um die Farbstoffe an die Zellen anzulagern und so eine phänotypische Charakterisierung zu ermöglichen. Für diese Arbeit wurden die Fluorochrome FITC bzw. Alexa 488, Alexa 546 und Cy5 bzw. Alexa 647 eingesetzt. Zur Anregung wurde monochromatisches Licht der Wellenlängen 488 nm, 543 nm und 633 nm genutzt.

### 3.6.2 Verarbeitung des Gewebes

Zur Gewinnung der Gewebe für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die jeweiligen Organe direkt nach Tötung der Maus entnommen und bei 4 °C in PBS/BSA gelagert bis diese eingefroren wurden. Dazu wurden die Organe in O.C.T. Compound Medium eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert. Das Gewebe wurde durch Einwickeln in Alufolie vor dem Austrocknen bewahrt.

Je nach Bedarf wurden von den eingefrorenen Organen mit einem Mikrotom Schnitte in einer Dicke von 6–10  $\mu\text{m}$  angefertigt und auf beschichtete Objektträger aus Glas übertragen.



**Abbildung 3.4**  
**Prinzip der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie.**

Nach einer Trocknungszeit von ca. einer Stunde wurden die Schnitte in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton für 5 min. fixiert und anschliessend noch einmal für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dieser Prozedur werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.3 Färbung des Gewebes

Die gesamte Färbung der Gewebeschnitte findet in einer selbstgebauten Färbekammer mit hoher Luftfeuchtigkeit statt, damit die Schnitte nicht austrocknen und es zu keiner Konzentrationsveränderung der Färbelösungen durch Verdunstung kommt. Im ersten Schritt wurde das Einbettmedium durch PBS abgewaschen und das Gewebe rehydriert. Je nach Bedarf und Möglichkeit werden danach unspezifische Bindungsstellen durch eine 15 min. dauernde Inkubation mit Antikörpern gegen Maus-Fc $\gamma$ Rez.II/III und mit Ratten-IgG blockiert. Anschliessend wird das Gewebe mit den jeweiligen Färbeantikörpern und Sekundärreagenzien inkubiert. Dies findet falls nötig in mehreren Schritten nacheinander statt. Die Antikörper verbleiben dabei für ca. 60 min. auf dem Gewebe. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Schnitte 3 mal für ca. 5 min. mit PBS/BSA inkubiert, um überschüssige Antikörper oder Sekundärreagenzien herauszuwaschen. Nach der Färbung des Gewebes wird dieses mit Eindeckmedium und einem Deckglas verschlossen.

**Tabelle 3.6**  
Materialien für die Immunfluoreszenz-Färbung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Einbettmedium	O.C.T. <sup>TM</sup> Compound	Sakura Finetek
Einbettform	Cryomold <sup>®</sup> 15×15×5 mm	Sakura Finetek
Objektträger	Superfrost <sup>®</sup> Plus	Menzel GmbH
Deckgläser	22×22 mm	Menzel GmbH
Eindeckmedium	Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (mind. 99,8 %)	Carl Roth GmbH

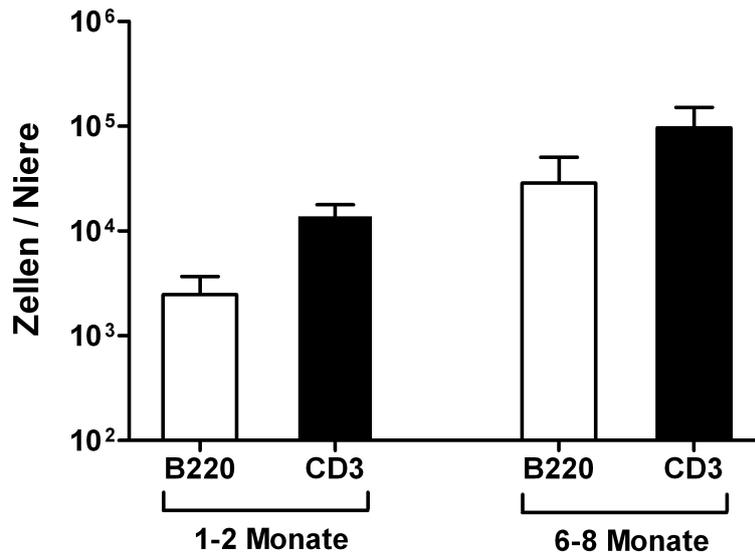
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Anzahl der B und T-Lymphozyten in den Nieren von NZB/W-Mäusen

Um eine mögliche Infiltration der Nieren mit B- und T-Lymphozyten im Rahmen einer systemischen Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf es zu einer Entzündung dieses Organes kommt, zu analysieren, wurden diese zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt untersucht. Die Tiere des frühen Untersuchungszeitpunktes waren 1–2 Monate alt, die des späten Untersuchungszeitpunktes waren 6–8 Monate alt. Aufgrund der spontanen Erkrankung und des bekannten zeitlichen Verlaufes der Krankheit gehen wir davon aus, dass 6–8 Monate alte Tiere eine Gruppe von erkrankten Individuen bilden, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an einer Nephritis leiden. Im Gegensatz dazu sind NZB/W-Mäuse im Alter von 1–2 Monaten noch nicht an einer manifesten Nephritis erkrankt (63; 62). Die Zahl der infiltrierenden B- und T-Zellen wurde mit Hilfe von TruCOUNT™ Tubes durchflusszytometrisch ermittelt. Wie in Abbildung 4.1 auf Seite 30 dargestellt, stieg die Zahl der B220 positiven B-Zellen im Mittel von 2462 im Alter von 1–2 Monaten auf durchschnittlich 28586 im Alter von 6–8 Monaten. Die Zahl der CD3 positiven T-Zellen stieg in den gleichen Gruppen von 13828 auf 96411. Im Mittel konnte in den erkrankten Organen im Vergleich zu den noch nicht pathologisch veränderten eine ca. zehnfach höhere Zahl an B- und T-Zellen festgestellt werden.

### 4.2 Lokalisation der B- und T-Lymphozyten in entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen

Wie in Abschnitt 4.1 dargestellt akkumulieren B- und T-Lymphozyten in den Nieren von NZB/W Mäusen im Verlaufe der Entzündung. Um Informationen über die Lokalisation und die Anordnung der Zellen im Gewebe dieses Organs zu erhalten, haben wir konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten der Niere angefertigt. B-Lymphozyten wurden dazu mit einem Antikörper gegen B220, T-Lymphozyten mit einem Antikörper gegen CD3 markiert. Die Antikörper sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, so dass B- und T-Lymphozyten unter dem Mikroskop verschiedenfarbig erscheinen. Ab-



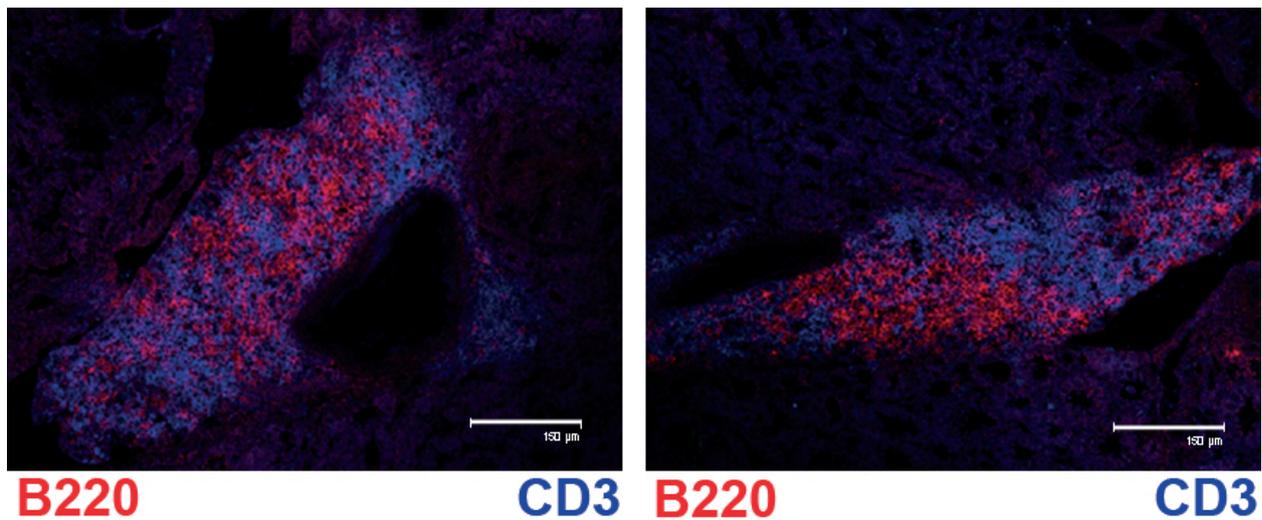
**Abbildung 4.1**

**Anzahl der B- und T-Lymphozyten in den Nieren von NZB/W-Mäusen im Alter von 1–2 bzw. 6–8 Monaten.** Die Anzahl der Zellen wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Die Zellen sind zuvor durch eine Dichtegradientenzentrifugation aus den Nieren isoliert worden. B-Lymphozyten wurden mit  $\alpha$ -B220 und T-Lymphozyten mit  $\alpha$ -CD3 Antikörpern gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Altersgruppe. Gegenübergestellt sind eine Gruppe 1–2 Monate alter (n=4) und 6–8 Monate alter Tiere (n=8).

Abbildung 4.2 auf Seite 31 zeigt ein typisches Bild aus einem Bereich der Niere, der von B- und T-Lymphozyten infiltriert ist. Wie zu sehen ist, bilden B220 positive und CD3 positive Zellen ein zusammenhängendes Infiltrationsfeld, innerhalb dessen sich ein Blutgefäß befindet. Typisch für solche Infiltrationsfelder ist das gemeinsame Vorkommen von B- und T-Lymphozyten, wobei diese eine geschlossene Zone bilden, in denen keine Zellen des Nierenparenchyms zu finden sind. Bei genauerer Betrachtung dieser Zonen kann man Bereiche feststellen, in denen mehr B-Lymphozyten vorkommen und andere in denen hauptsächlich T-Lymphozyten liegen. Insgesamt sind die B- und T-Lymphozyten nicht zufällig über das Infiltrat verteilt, sondern bilden einen geordneten Zellverband, der an folliculäre Strukturen in sekundär lymphatischen Organen erinnert.

### 4.3 Phänotyp der infiltrierenden B-Lymphozyten in nephritischen Nieren von NZB/W-Mäusen

Nach der Analyse der Zellzahlen in den Nieren sollte im nächsten Schritt der Phänotyp der infiltrierenden B-Lymphozyten näher untersucht werden. Um mehr über den Isotyp des B-Zell-Rezeptors und die Differenzierungsstufe der B-Lymphozyten zu erfahren, wurden weitere



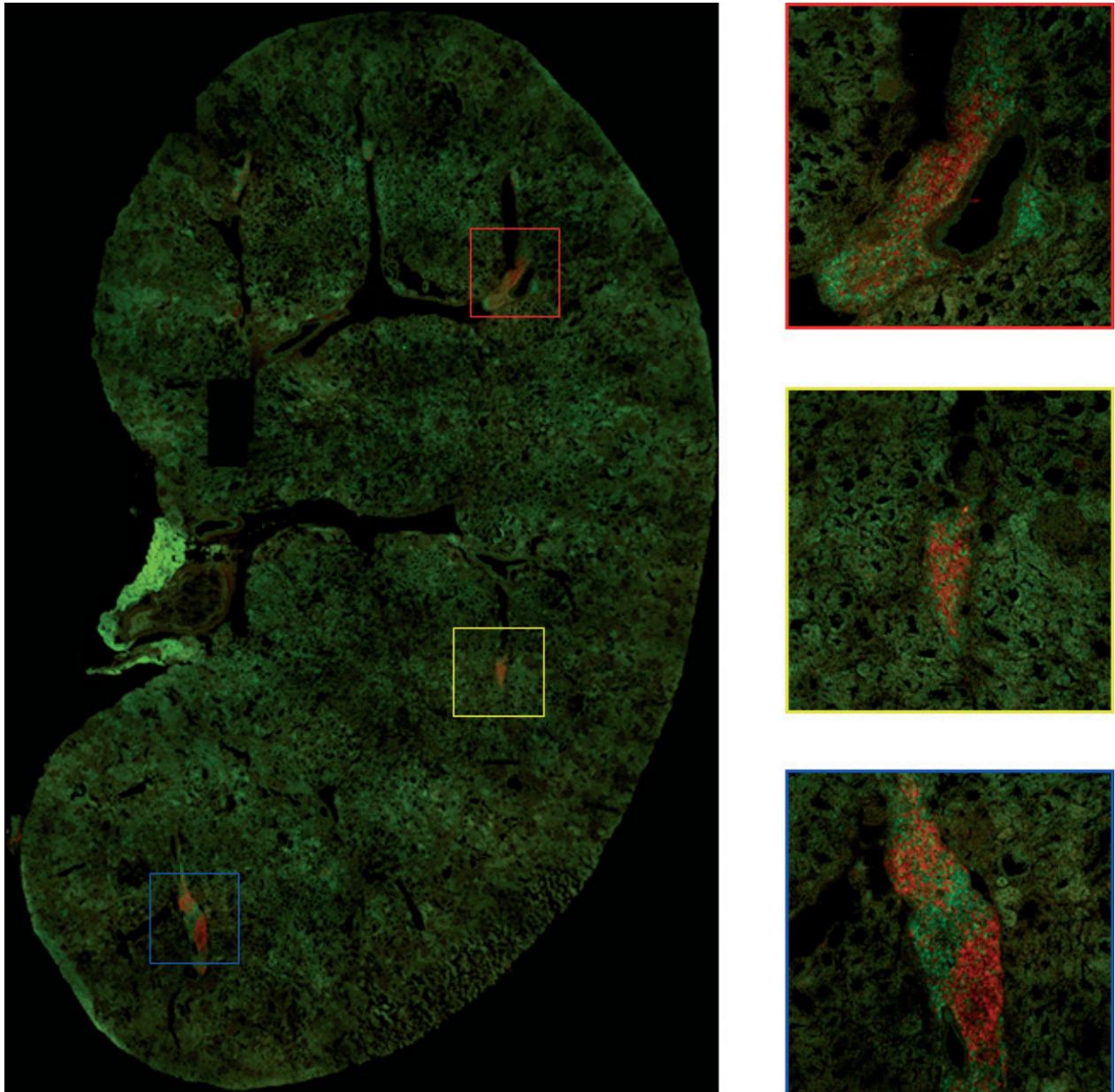
**Abbildung 4.2**

**B- und T-Lymphozyten bilden einen geschlossenen Zellverband innerhalb entzündeter Nieren von NZB/W-Mäusen.** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei Lymphozyteninfiltraten in der Niere einer 7 Monate alten NZB/W-Maus. Das Präparat wurde mit  $\alpha$ -B220 (rot) und  $\alpha$ -CD3 (blau) angefärbt. Beide Kanäle wurden als Overlay dargestellt. In beiden Bildern sind die Lymphozyten um ein Blutgefäß angeordnet. Ursprüngliche Vergrößerung  $\times 240$ , Maßstab entspricht  $150\mu\text{m}$ .

durchflusszytometrische Untersuchungen sowie histologische Färbungen angefertigt.

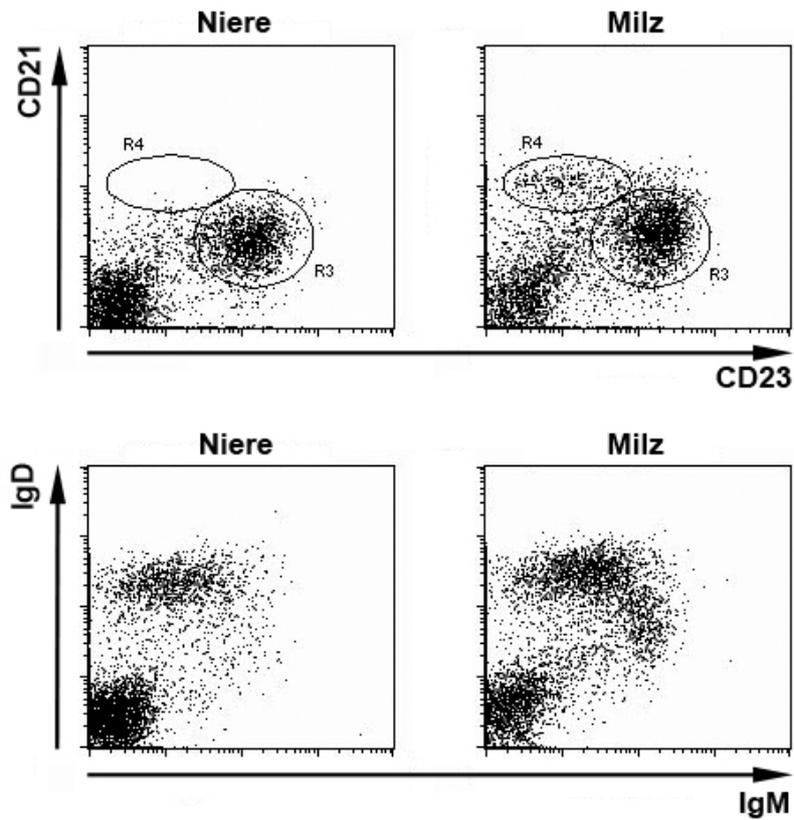
#### 4.3.1 Isotyp des B-Zell-Rezeptors der infiltrierenden B-Lymphozyten

FACS-Analysen ergaben dabei, dass ein großer Teil der B-Zellen einen  $\text{CD23}^{\text{high}} \text{CD21}^{\text{low}}$  Expressionstypus besitzt. Dieser gleicht dem von folliculären B-Zellen in der Milz. Genauso wie diese exprimieren die B-Zellen in den Nieren  $\text{IgD}^{\text{high}} \text{IgM}^{\text{low/neg}}$  (siehe Abbildung 4.4); ein Muster, durch das in sekundär lymphatischen Organen naive folliculäre B-Lymphozyten identifiziert werden. Um Informationen über die Lokalisation der naiven B-Lymphozyten im Nierengewebe zu erhalten, haben wir konfokale fluoreszenzmikroskopische Bilder von Gewebeschnitten der Nieren von 6–8 Monate alten NZB/W Mäusen angefertigt. Abbildung 4.5 auf Seite 34 zeigt zwei verschiedene Lymphozyteninfiltrate innerhalb einer Niere. B220 positive Zellen sind rot dargestellt, IgD positive Zellen grün. Die Bilder zeigen, dass ein Großteil der B220 positiven B-Lymphozyten gleichzeitig IgD positiv ist und damit dem Phänotyp von folliculären naiven B-Lymphozyten entspricht. Gedächtnis-B-Lymphozyten wechseln während des Differenzierungsprozesses die Isotypklasse ihres B-Zell-Rezeptors und sind nach diesem Prozess IgD negativ.



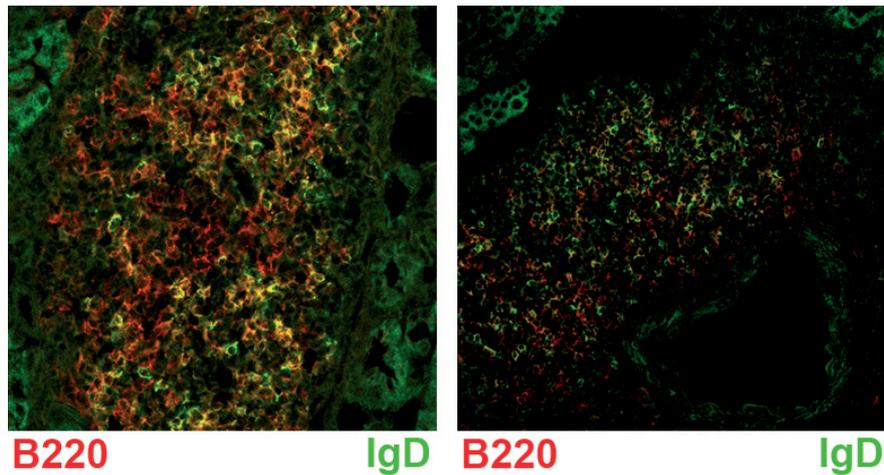
**Abbildung 4.3**

**Lokalisation der Lymphozyteninfiltrate in der Niere einer NZB/W-Maus.** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Nierenpräparates einer 6 Monate alten NZB/W-Maus. Die Ausschnittvergrößerungen zeigen die drei größten entzündlichen Läsionen dieser Schnittebene. Das Präparat wurde mit  $\alpha$ -B220 (rot) und  $\alpha$ -CD3 (grün) angefärbt. Das restliche Nierenparenchym erscheint aufgrund von Autofluoreszenz dunkelgrün.



**Abbildung 4.4**

**Durchflusszytometrische Analyse von Subtypen von B-Lymphozyten in Niere und Milz einer 6 Monate alten NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von B-Lymphozyten, die aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen CD21 und CD23 bzw. gegen IgD und IgM markiert. Mit beiden Kombinationen von Antikörpern lassen sich B-Zellen der marginalen Zone ( $CD21^{high} CD23^{low}$  bzw.  $IgM^{high} IgD^{low}$ ) und folliculäre B-Zellen ( $CD21^{low} CD23^{high}$  bzw.  $IgM^{low} IgD^{high}$ ) identifizieren. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 4.5**

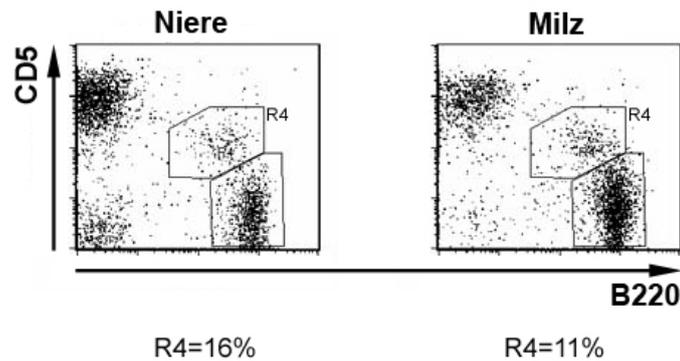
**Ein großer Teil der B-Lymphozyten in der Niere von NZB/W-Mäusen exprimiert IgD.** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei Lymphozyteninfiltraten in der Niere einer 6 Monate alten NZB/W Maus. Das Präparat wurde mit  $\alpha$ -B220 (rot) und  $\alpha$ -IgD (grün) angefärbt. Beide Kanäle wurden als Overlay dargestellt. Doppelt positive Zellen erscheinen gelb. Die Bilder wurden mit einem 20x Objektiv gemacht.

### 4.3.2 Anteil der CD5 positive B-Lymphozyten

Es ist bekannt, dass sog. B1 B-Zellen die Fähigkeit besitzen, nach einem adoptiven Transfer in die entzündete Niere einzuwandern (74). Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob es sich bei den infiltrierenden B-Lymphozyten um B1 B-Zellen handelt, wurden diese auf die Expression von CD5 durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4.6 auf Seite 35 ist der Anteil der B1 B-Lymphozyten an der Gesamtheit der B-Lymphozyten dargestellt. Der Prozentsatz der B2 Zellen an den gesamten B-Zellen ist in der Niere leicht erhöht und beträgt 16% im Gegensatz zu 11% in der Milz. Insgesamt kommt es aber zu keiner starken Anreicherung von B1 B-Zellen.

### 4.3.3 Anteil der PNA positiven B-Lymphozyten

Um auszuschließen, dass es sich bei den B-Lymphozyten um Zellen einer Keimzentrumsreaktion handelt, wurden die aus den nephritischen Nieren isolierten Zellen in der Durchflusszytomtrie auf ihre Fähigkeit untersucht das Lektin Peanut agglutinin (PNA) auf der Oberfläche zu binden. Abbildung 4.7 zeigt, dass der Anteil der PNA bindenden B-Lymphozyten innerhalb der aus der Niere isolierten Zellen nicht höher ist als in der Milz. In der Niere beträgt er 4,38% und in der Milz 4,39%. In histologischen Schnitten von entzündeten Nieren des gleichen Alters (6–8 Monate) erschienen B-Lymphozyten immer negativ für PNA. Insgesamt gab es keine Hinweise für eine Anreicherung von Keimzentrums-B-Lymphozyten in den entzündeten Nieren oder dafür, dass eine Keimzentrumsreaktion dort stattfindet.



**Abbildung 4.6**

**Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD5 auf B-Lymphozyten in Niere und Milz einer 6 Monate alten NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von B-Lymphozyten, die aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen CD5 und gegen B220 markiert. So konnte gemessen werden, wie hoch der Anteil der sog. B1 B-Lymphozyten (R4) an den gesamten B-Zellen (R3+R4) ist. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.

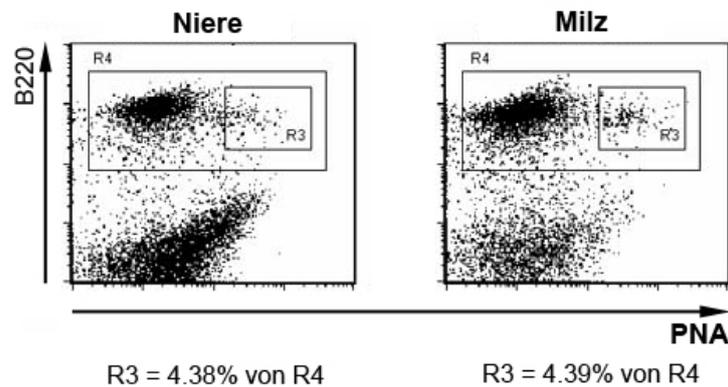
#### 4.4 Expression von Chemokinrezeptoren auf B-Lymphozyten in Niere und Milz von NZB/W-Mäusen

Das Vorkommen von B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Niere von NZB/W-Mäusen wirft die Frage auf, über welche Chemokine/Chemokinrezeptoren die Zellen in das Gewebe einwandern. Um mögliche Hinweise darüber zu bekommen, haben wir die Zellen auf ihre CXCR3 Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass B-Lymphozyten aus beiden Geweben CXCR3 gleich stark auf ihrer Oberfläche exprimieren (siehe Abbildung 4.8).

Ein anderer Chemokinrezeptor, der möglicherweise einen Einfluss auf die Einwanderung von naiven B-Lymphozyten in das entzündete Gewebe hat, ist CXCR5. Die durchflusszytometrische Analyse dieses Chemokinrezeptors zeigt, dass auch CXCR5 in gleicher Stärke auf B-Lymphozyten aus Niere und Milz exprimiert wird (siehe Abbildung 4.9).

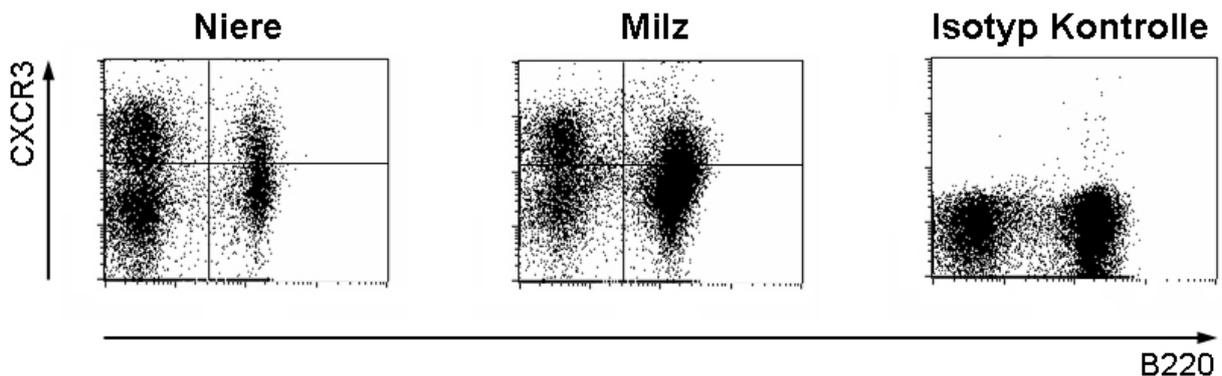
#### 4.5 Anzahl der IgG und IgM sezernierenden Zellen in den Nieren von NZB/W-Mäusen

Frühere Untersuchungen Von NZB/W-Mäusen haben gezeigt, dass nach einer Immunisierung eine große Anzahl von Antigen-spezifischen Plasmazellen in den Nieren detektiert werden kann (75).



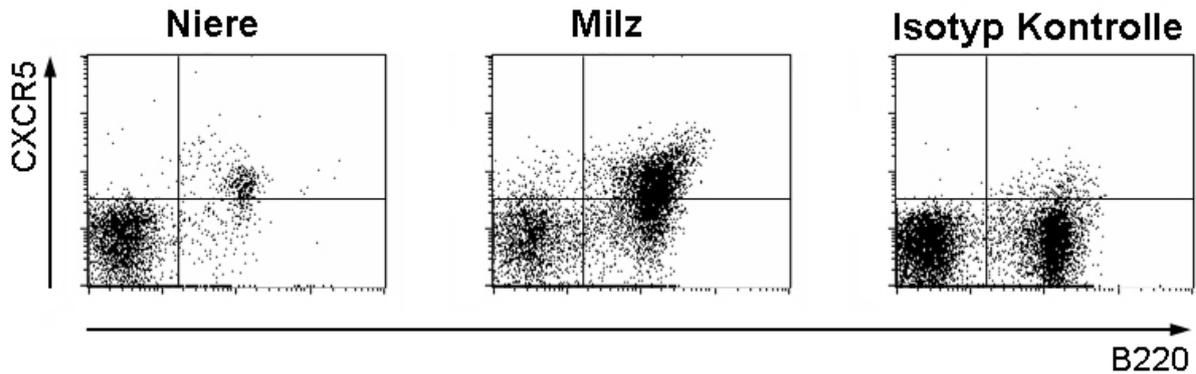
**Abbildung 4.7**

**Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von PNA auf B-Lymphozyten in Niere und Milz einer 6 Monate alten NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von B-Lymphozyten, die aus Niere und Milz einer NZB/W isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen B220 und dem Lektin PNA markiert. So konnte gemessen werden, wie hoch der Anteil der PNA bindenden B-Lymphozyten (R3) an den gesamten B-Zellen (R4+R3) ist. PNA wird zur Identifizierung von Keimzentrums-B-Zellen genutzt. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 4.8**

**Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CXCR3 auf der Oberfläche von B-Lymphozyten aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von B-Lymphozyten, die aus Niere und Milz einer NZB/W isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen B220 und CXCR3 markiert, um die Stärke der Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf B-Lymphozyten zu untersuchen. Die Abbildung zeigt, dass die Stärke der Expression auf B-Zellen aus der Niere und Milz gleich ist. Die Isotypkontrolle (IgG2a-APC) schließt eine unspezifische Bindung des Antikörpers gegen CXCR3 aus. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.



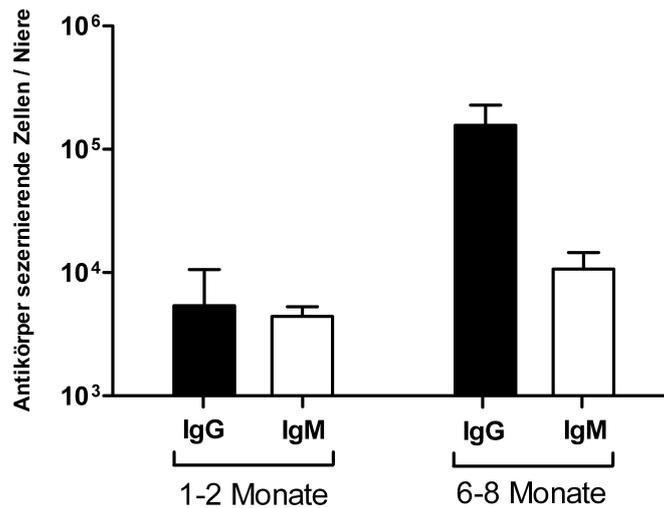
**Abbildung 4.9**

**Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CXCR5 auf der Oberfläche von B-Lymphozyten aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von B-Lymphozyten, die aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen B220 und CXCR5 markiert um die Stärke der Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 auf B-Lymphozyten zu untersuchen. Die Abbildung zeigt, dass die Stärke der Expression auf B-Zellen aus der Niere und Milz gleich ist. Die Isotypkontrolle (IgG2a-Biotin/SA-Cy5) schließt eine unspezifische Bindung des Antikörpers gegen CXCR3 aus. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.

Um mehr über die Akkumulation von Antikörper sezernierenden Zellen in den Nieren von NZB/W-Mäusen zu erfahren und um einen möglichen Zusammenhang mit dem Verlauf der Entzündung der Nieren zu ermitteln, haben wir diese mit Hilfe der ELISPOT-Methode analysiert. Dazu wurden Nieren von 1–2 Monate alten und 6–8 Monate alten nicht immunisierten NZB/W-Mäusen auf IgG- und IgM-sezernierende Zellen untersucht (siehe Abbildung 4.10).

Die Messungen für IgG zeigen, dass die Anzahl der Antikörper sezernierenden Zellen in den Nieren von 1–2 Monate alten Tieren zwischen  $10^3$  und  $10^4$  liegt. Dagegen können in den Nieren von 6–8 Monate alten NZB/W-Mäusen zwischen  $10^5$  und  $10^6$  IgG sezernierende Zellen nachgewiesen werden.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Analyse der IgM sezernierenden Zellen. In der Gruppe der 1–2 Monate alten Mäuse lagen die Zahlen, wie bei den IgG sezernierenden Zellen auch zwischen  $10^3$  und  $10^4$ , wobei die Anzahl der IgM sezernierenden Zellen immer höher als die Zahl der IgG sezernierenden Zellen war. Im Gegensatz dazu konnten in der Gruppe der 6–8 Monate alten NZB/W-Mäuse durchschnittlich nur etwas mehr als  $10^4$  IgM sezernierende Zellen festgestellt werden, was einer nur geringfügigen Erhöhung entspricht.



**Abbildung 4.10**

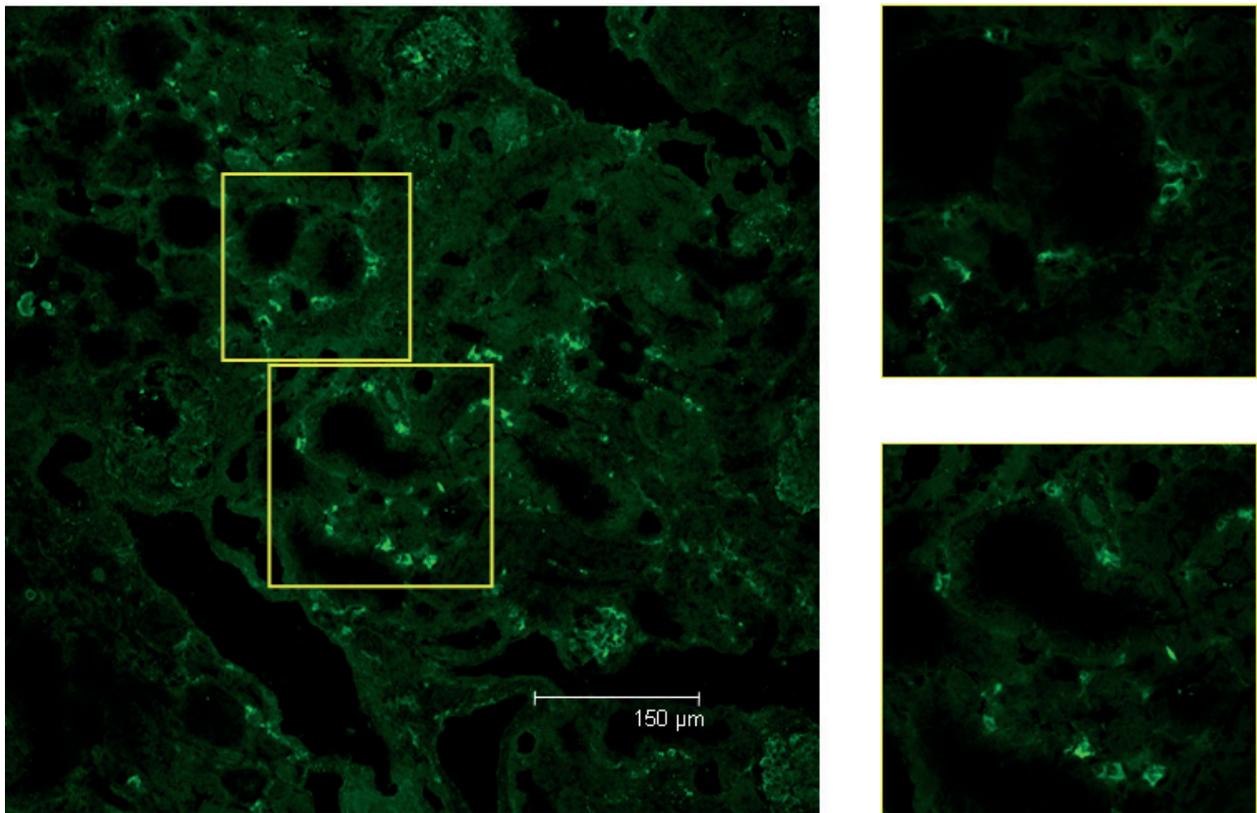
**Anzahl der IgG bzw. IgM sezernierender Zellen in den Nieren von NZB/W-Mäusen im Alter von 1–2 bzw. 6–8 Monaten.** Die Zahl der Antikörper sezernierenden Zellen in den Nieren von NZB/W-Mäusen aus zwei Altersgruppen wurde mit Hilfe der ELISPOT-Methode ermittelt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von 7 Messungen (1–2 Monate) bzw. 5 Messungen (6–8 Monate) an. Die schwarzen Balken geben die Zahlen der IgG sezernierenden Zellen an, die weißen die der IgM sezernierenden Zellen.

## 4.6 Lokalisation der Plasmazellen im Nierengewebe von NZB/W-Mäusen

Die hohe Anzahl an Plasmazellen in den entzündeten Nieren wirft die Frage auf, wo sie im Nierengewebe lokalisiert sind. Um das zu beantworten, wurden konfokale fluoreszenzmikroskopische Bilder von Nierenschnitten angefertigt. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, liegen die Plasmazellen im Gegensatz zu den B- und T-Lymphozyten nicht nur in bestimmten Infiltrationsfeldern, sondern sind über weite Teile des Nierengewebes verteilt und kommen meist in kleinen Gruppen mit ca. 2–4 Zellen oder vereinzelt vor.

## 4.7 Expression von Chemokinrezeptoren auf Plasmazellen/Plasmablasten in Niere, Milz und Knochenmark von NZB/W-Mäusen

Parallel zu der Expression von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten haben wir die Expression von CXCR3 und CXCR5 auf Plasmablasten bzw. Plasmazellen gemessen. Zu diesem Zweck haben wir aus den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen Plasmablasten bzw. Plasmazellen isoliert, durchflusszytometrisch untersucht und mit den



**Abbildung 4.11**

**Immunhistologische Analyse von Plasmazellinfiltraten in der Niere einer 7 Monate alten NZB/W.** Ein  $8\mu\text{m}$  dicker Gewebeschnitt wurde mit Antikörpern gegen die  $\kappa$ -leichte Kette von Immunglobulinen der Maus gefärbt. Die Plasmazellen erscheinen als relativ große Zellen mit einem angefärbten Zytoplasma. Die Zellen befinden sich sowohl im Bereich des Nierenmarkes als auch in der Nierenrinde. Die Abbildung zeigt den Übergangsbereich zwischen beiden Zonen. Ursprüngliche Vergrößerung  $\times 240$ .

entsprechenden Zellen aus der Milz und dem Knochenmark der gleichen Maus verglichen. Das Ergebnis der Analyse der Expression von CXCR3 auf der Oberfläche dieser Zellen ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

Es zeigt sich, dass der größte Teil der CD138<sup>pos</sup> Plasmablasten bzw. Plasmazellen in der Niere auch deutlich positiv für CXCR3 ist. Im Gegensatz dazu exprimieren nur die Hälfte der entsprechenden Zellen aus der Milz CXCR3, wohingegen die andere Hälfte ein deutlich niedrigeres Niveau aufweist. Ein wiederum anderes Bild ergibt sich im Knochenmark, wo der überwiegende Teil der Zellen CXCR3 nicht exprimiert und nur eine geringe Zahl an CXCR3-positiven Plasmablasten bzw. Plasmazellen gefunden werden kann.

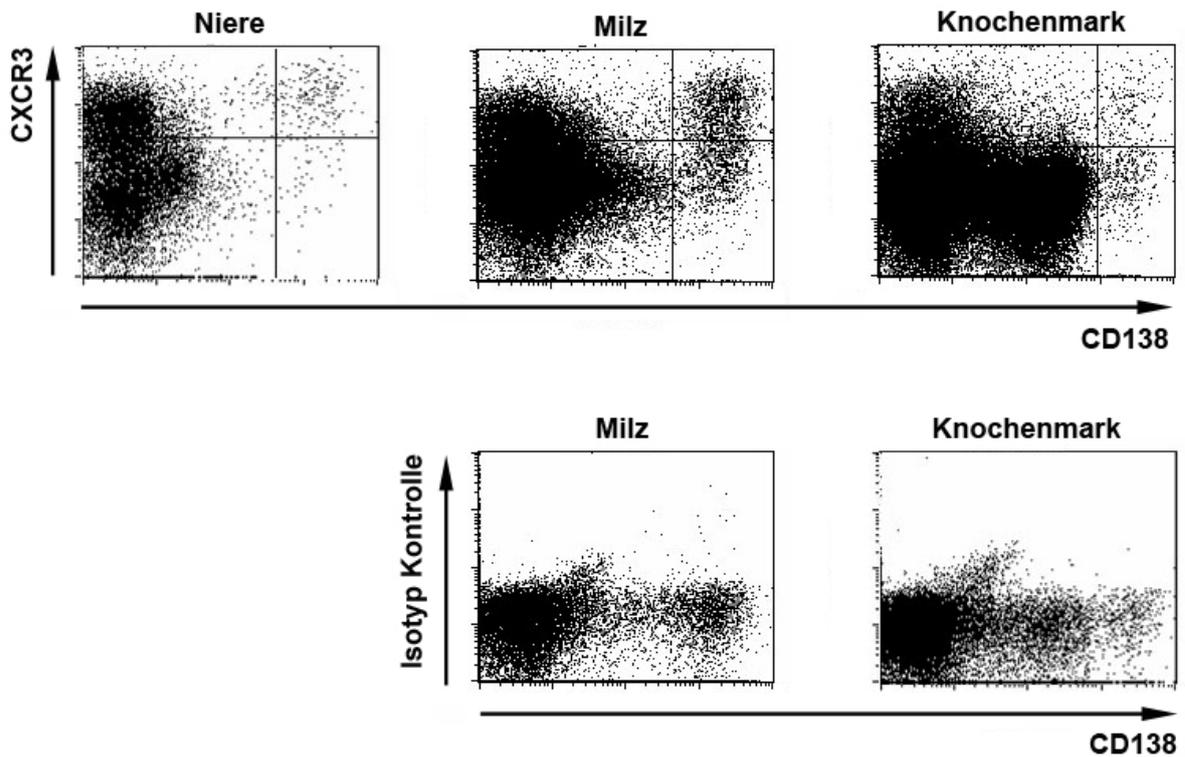
Die Ergebnisse mehrerer Messungen sind in Abbildung 4.13 dargestellt. In diesem Falle wurden nur die CD138<sup>pos</sup>, MHCII<sup>pos</sup> Plasmablasten analysiert, um eine Verfälschung der Daten durch einen möglichen selektiven Verlust von reifen Plasmazellen bei der Isolation auszuschliessen. Wie man der Abbildung entnehmen kann, sind in der Niere knapp 75% der Plasmablasten CXCR3 positiv. Plasmablasten aus der Milz sind dagegen nur zu ca. 60% positiv. Im Knochenmark sind es nur ca. 45%. Diese Messungen zeigen eine Anreicherungen von CXCR3<sup>pos</sup> Plasmablasten in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen.

Weiterhin haben wir die Plasmablasten bzw. Plasmazellen der Milz auf die Expression von CXCR5 untersucht. Die Dot Plots in Abbildung 4.14 zeigen, dass CD138<sup>pos</sup> Plasmablasten bzw. Plasmazellen in der Milz, wie erwartet kein CXCR5 exprimieren.

## 4.8 Produktion von Chemokinen in der entzündeten Niere von NZB/W-Mäusen

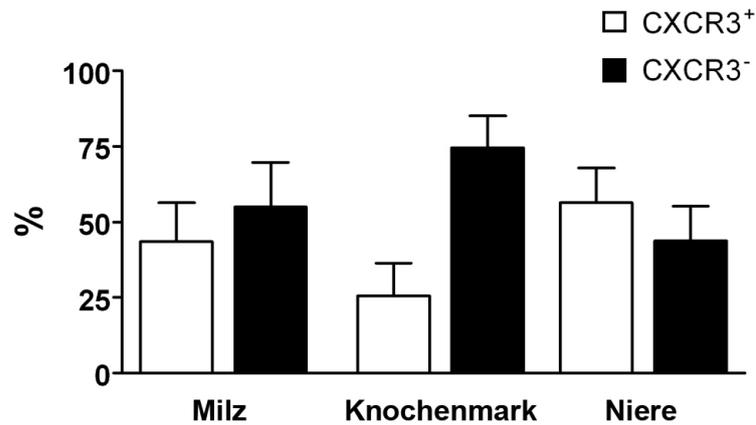
Untersuchungen mit Hilfe der quantitativen PCR haben gezeigt, dass in den Nieren von NZB/W eine ca. 1000mal höhere Menge an mRNA des CXCR3 Liganden CXCL10 gebildet wird als in den Nieren von gesunden Mäusen (76; 19). Außerdem ist bekannt, dass CXCL13, der Ligand für CXCR5, in den Nieren und im Thymus von NZB/W-Mäusen gebildet wird (77). Um eine mögliche Beteiligung dieser beiden Chemokine an der Einwanderung von B-Lymphozyten und Plasmazellen zu untersuchen, haben wir fluoreszenzmikroskopische Färbungen von CXCL10 und CXCL13 durchgeführt.

Die Färbung von CXCL13 hat gezeigt, dass die Expression dieses Chemokins eng mit dem Vorkommen von B- und T-Zellen in der nephritischen Niere kolokalisiert ist. Es ist zu beobachten, dass in allen Bereichen von B- und T-Zellinfiltraten auch das Chemokin CXCL13 exprimiert wird. Dies ist nicht so wenn man die Verteilung von Plasmazellen im Gewebe betrachtet. Zwar kommen diese auch innerhalb der Infiltrate vor, aber ein großer Teil der



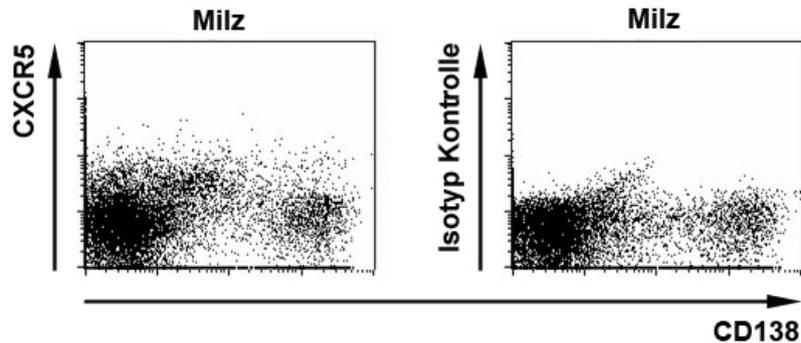
**Abbildung 4.12**

Durchflußzytometrische Analyse der CXCR3-Expression von  $CD138^{pos}$  Plasmablasten/ Plasmazellen in Niere, Milz und Knochenmark einer 6 Monate alten NZB/W-Maus. Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS-Analyse von Plasmablasten bzw. Plasmazellen, die aus Niere und Milz einer NZB/W-Maus isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen CD138 und CXCR3 markiert, um die Stärke der Expression von CXCR3 auf diesen Zellen zu untersuchen. Das Verhältnis von  $CXCR3^{pos}$  zu  $CXCR3^{neg}$  Zellen in der Niere ist sehr viel größer als in der Milz und im Knochenmark. Die Isotypkontrolle (IgG2a-APC) schließt eine unspezifische Bindung des Antikörpers gegen CXCR3 aus. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 4.13**

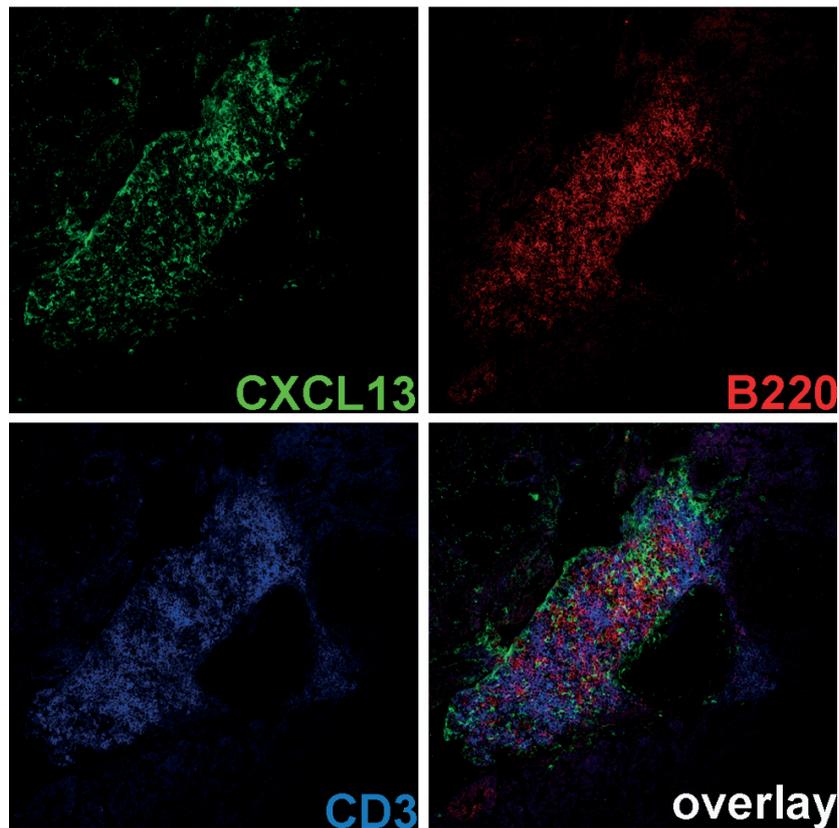
**Verhältnis von CXCR3<sup>pos</sup> und CXCR3<sup>neg</sup> Plasmablasten in Niere, Milz und Knochenmark von 6–8 Monate alten NZB/W–Mäusen.** Das Verhältnis von CXCR3<sup>pos</sup> und CXCR3<sup>neg</sup> Plasmablasten wurde mittels FACS Analyse ermittelt. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen CD138, MHCII und CXCR3 gefärbt. Plasmablasten wurden durch die Expression von CD138 und MHCII identifiziert und dann auf die Expression von CXCR3 untersucht. Das Verhältnis der positiven und negativen Zellen für diesen Marker wird in Prozent angegeben (n=7). Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 4.14**

**Durchflußzytometrische Analyse der CXCR5 Expression von CD138<sup>pos</sup> Plasmablasten/ Plasmazellen in der Milz einer 6 Monate alten NZB/W–Mäus.** Die Dot Plots zeigen beispielhaft eine FACS–Analyse von Plasmablasten bzw. Plasmazellen, die aus der Milz einer NZB/W isoliert wurden. Die Zellen der genannten Organe wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen CD138 und CXCR5 markiert, um die Höhe der Expression von CXCR5 auf diesen Zellen zu untersuchen. Die Isotypkontrolle (IgG2a-APC) schließt eine unspezifische Bindung des Antikörpers gegen CXCR5 aus. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI von der Analyse ausgeschlossen.

Plasmazellen ist nicht zusammenhängend über das Gewebe verteilt. CXCL13 produzierende Zellen können nicht in der Nähe dieser verteilt liegenden Plasmazellen gefunden werden.



**Abbildung 4.15**

**CXCL13 wird im Bereich der entzündlichen Läsionen innerhalb der Nieren sezerniert und ist mit B-Lymphozyten kolokalisiert.** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyteninfiltrats in der Niere einer 6 Monate alten NZB/W-Maus. Das Präparat wurde mit  $\alpha$ -B220 (rot),  $\alpha$ -CD3 (blau) und  $\alpha$ -CXCL13 (grün) angefärbt. Die Bilder wurden mit einem 20x Objektiv gemacht.

# 5 Diskussion

## 5.1 Nachweis von B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen

Lymphozyten können in gesunden nicht entzündeten Geweben nur in sehr niedriger Frequenz nachgewiesen werden. Dagegen ist es typisch, dass sie im Falle einer Entzündung die Blutgefäße verlassen und sich im Gewebe ansammeln. Dort führen sie die ihnen eigenen Aufgaben im Rahmen der Immunantwort aus. Diese Beobachtung gilt nicht nur für akut bakteriell entzündete Gewebe, die durch Infektionen entstehen, sondern auch für chronisch entzündetes Gewebe im Rahmen von Autoimmunprozessen. Es ist bekannt, dass eine Infiltration von entzündetem Gewebe durch Lymphozyten bei vielen Grundkrankheiten in den verschiedensten Organen vorkommt. So werden beispielsweise bei der Multiplen Sklerose Ansammlungen von Lymphozyten im Gehirn gefunden (78) oder es kommt bei der Rheumatoiden Arthritis zu einem Einwandern von B- und T-Zellen in den Knorpel der entzündeten Gelenke (79).

Die im Rahmen dieser Versuche beschriebene ca. 10 fach höhere Anzahl von B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen verglichen mit nicht entzündeten Nieren des gleichen Mausstammes deckt sich mit früheren Ergebnissen (75). Auch, dass die Mehrheit der infiltrierenden Lymphozyten T-Zellen sind, wurde schon früher so beschrieben (80). Die Analysen von Biopsien humaner Nieren kommen zu ähnlichen Ergebnissen, unabhängig von der Genese der Nephritis (81; 59). Welche genaue Rolle Lymphozyteninfiltrate haben bzw. welchen Einfluss sie auf den Verlauf der Lupusnephritis oder die physiologische Funktion der Niere nehmen ist bisher ungeklärt.

## 5.2 Phänotyp der Lymphozyteninfiltrate in den entzündeten Nieren

In der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp der B-Lymphozyten weiter analysiert, um eine Vorstellung zu bekommen, welchen Regelmechanismen diese Zellen unterworfen sind und um ihre Rolle in der Entzündungspathologie besser zu verstehen.

Genauere Studien der infiltrierenden T-Zellen wurde schon früher veröffentlicht. Untersucht wurden diese beispielsweise hinsichtlich Aktivierungszustand, Proliferationsaktivität,

naiver oder Memory-/Effektor-Phänotyp und Zuordnung zum Th1-Th2 Typ (80; 82; 83).

Eine der Untersuchungen zum Phänotyp der akkumulierten B-Lymphozyten bezieht sich auf den Isotyp des B-Zellrezeptors dieser Zellen. Die gewonnenen Daten stützen sich auf FACS-Analysen und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Die FACS-Analysen zeigen, dass ein grosser Teil der B-Zellen in den Nieren Immunglobuline des Isotyps D und M auf ihrer Oberfläche tragen. Das gleichzeitige Expressionsmuster  $CD23^{high}$   $CD21^{low}$  (s. Abb. 4.4) bestätigt, dass es sich bei diesen B-Zellen um naive folliculäre B-Zellen handelt (84; 85). Auch die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen in der IgD/B220 Doppelfärbung, dass viele B-Zellen diesen Isotyp auf der Zelloberfläche exprimieren (s. Abb. 4.5). Im Gegensatz zu naiven folliculären B-Zellen geht man davon aus, dass  $IgD^{neg}$   $IgG^{pos}$  Gedächtnis-B-Zellen vorwiegend in entzündete Gewebe wandern und sich dort ansammeln (86). Die hier beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass es für naive folliculäre B-Zellen genauso möglich ist in entzündetes Gewebe einzuwandern.

Zusätzlich zur Analyse des Isotyps der Immunglobuline auf der Zelloberfläche untersuchten wir den Anteil der sog. B1-B-Zellen, die durch die Expression von CD5 identifiziert werden können. Diese Zellen unterscheiden sich von den konventionellen B-2 Zellen z.B. durch ihr bevorzugtes Vorkommen im Bauchfell, durch ihre Unabhängigkeit von hämatopoetischen Stammzellen und ihr Repertoire an Antikörpern (87). Es zeigt sich, dass 10-30% der B-Zellen in den entzündeten Nieren diesem Phänotyp entsprechen. Der Anteil dieser Zellen ist damit nicht höher als in der Milz dieser Tiere. Wir nehmen deshalb an, dass B1-B-Zellen gegenüber den naiven folliculären B-Zellen keinen Vorteil haben, in die entzündeten Nieren einzuwandern. Bekannt ist, dass im Thymus und in den entzündeten Nieren der erkrankten NZB/W-Mäuse vermehrt CXCL13 produziert wird. Gleichzeitig ist die Oberflächenexpression von CXCR5 auf B1-B-Zellen höher als auf konventionellen B2-B-Zellen, so dass vermutet wurde, dass B1-B-Zellen gegenüber B2-B-Zellen einen Vorteil haben, in diese Organe einzuwandern (77). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass adoptiv transferierte B1-B-Zellen (gewonnen aus der peritonealen Höhle von NZB/W-Mäusen) zu einem höheren Anteil in entzündete Organe wie Niere, Lunge oder Thymus wandern als konventionelle B2-B-Zellen (74). Eine in vivo Akkumulation von B1-B-Zellen konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden. Auch die hier dargestellten Ergebnisse lassen nicht vermuten, dass B1-B-Zellen gegenüber konventionellen B2-Zellen einen Vorteil haben in die entzündeten Nieren einzuwandern.

In weiteren Versuchen wurde das Vorkommen von PNA positiven (Keimzentrums-) B-Zellen in der Niere der erkrankten NZB/W Mäuse untersucht. Insgesamt fanden sich keine Hinweise für die Ausbildung von Keimzentren und für eine erhöhte Anzahl PNA positiver B-Zellen in den entzündeten Nieren der NZB/W-Mäuse. Wir schliessen deshalb aus, dass die

gefundenen B-Zellen aus einer Keimzentrumsreaktion innerhalb der Niere stammen. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein (75).

### 5.3 Lokalisation und Anordnung der B- und T-Lymphozyten in den entzündeten Nieren

Mikroskopische Aufnahmen von lymphatischen Organen zeigen einen komplizierte Aufbau des Gewebes mit zum Teil sehr geordneten Strukturen die durch die verschiedenen Zellarten gebildet werden. Auch T- und B-Zellen unterliegen einer bestimmten Ordnung die auch für die Funktion dieser Organe und letztendlich für die Funktion des gesamten Immunsystems wichtig ist (88). Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen, dass auch die in die entzündeten Nieren eingewanderten B- und T-Lymphozyten nicht wahllos über das Nierengewebe verteilt sind. Sie bilden abgegrenzte Zonen, die in direktem Kontakt zu Blutgefäßen stehen. Die normale Struktur des Nierenparenchyms wird durch diese Zonen unterbrochen. Auch wenn man die Anordnung der Lymphozyten innerhalb dieser Infiltrationsfelder betrachtet, kann man eine Ordnung erkennen. So gibt es Bereiche mit einer höheren Dichte von B-Zellen und andere, in denen mehr T-Zellen vorkommen. Diese Anordnung erinnert an den Aufbau der Follikel in sekundär lymphatischen Organen. Welche Funktion diese Infiltrate haben und welchen Einfluss sie auf die Nierenfunktion oder den Verlauf der Nephritis nehmen ist nicht bekannt.

Solche entzündlichen Läsionen sind schon von anderen Autoimmunerkrankungen aber auch von chronisch entzündlichen Erkrankungen, die durch Bakterien oder Viren hervorgerufen werden, bekannt. Im Rahmen von Abstoßungsreaktionen werden sie ebenfalls beobachtet (s.Tabelle 5.1). Drayton et al. sprechen in ihrem Review von „tertiary lymphoid tissues“ (89). Diese den sekundär lymphoiden Geweben sehr ähnlichen Läsionen bilden sich typischerweise im Rahmen von chronischen Entzündungen in Geweben, die nicht zu den lymphatischen Geweben gezählt werden. Sie beherbergen die gleichen Zellen und produzieren Chemokine die typischerweise in sekundär lymphatischen Organen sezerniert werden. Auch spezielle Gefäße wie „high endothelial venules“ (HEVs) (90) und sogar Lymphgefäße konnten nachgewiesen werden (91). Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass in den entzündlichen Läsionen die B-Zellen mit dem Vorkommen von CXCL13, dem Liganden von CXCR5, kolokalisiert sind. Diese Anordnung findet sich physiologischerweise auch in den Follikeln der Milz (92; 23).

In der entzündeten Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis und in den entzündeten Speicheldrüsen von Patienten mit Sjögren-Syndrom konnten sogar Keimzentrumsreaktionen nachgewiesen werden (93; 94). Die molekulargenetischen Untersuchungen

von B-Zellen, die durch Mikromanipulation aus der entzündeten Synovialmembran von Patienten gewonnen wurden, die an einer Rheumatoiden Arthritis leiden, zeigten, dass es zu einer Akkumulation von Punktmutationen im Bereich der variablen Region der schweren Kette der Immunglobuline kommt. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die synovialen B-Zellen nur eine eingeschränkte Anzahl an Rearrangements der Gene besitzen, die die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline kodieren. Dies wird als Nachweis für das Vorkommen von somatischer Hypermutation und klonaler Selektion innerhalb der inflammatorischen Infiltrate gewertet.

In der hier beschriebenen Analyse der entzündlichen Läsionen fand sich kein Anhalt für eine Keimzentrumsreaktion. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Veröffentlichungen von Studien an NZB/W-Mäusen überein (75).

**Tabelle 5.1**  
"Lymphoide Neogenese" bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen

<b>Erkrankung/Erreger</b>	<b>betroffenes Gewebe</b>	<b>Referenz</b>
<b>Autoimmunerkrankungen</b>		
Rheumatoide Arthritis	Synovialmembran	(95; 96; 93)
Sjögren-Syndrom	Speicheldrüsen	(97; 98)
Myasthenia Gravis	Thymus	(99; 100)
Multiple Sklerose	ZNS	(101; 102; 103)
Morbus Crohn	GIT	(104; 105)
<b>Infektionskrankheiten</b>		
Borrelia burgdorferi (Lyme Disease)	Gelenke	(106; 107)
HCV	Leber	(108; 109)
Helicobacter spp.	Leber	(110)
<b>Transplantatabstoßung</b>		
Niere		(91; 111)
Herz		(111)

## 5.4 Nachweis von Plasmazellen in den entzündeten Nieren der NZB/W-Maus

Normalerweise befindet sich die Mehrheit der Plasmazellen im Knochenmark. Dort können sie, in speziellen zellulären Nischen, sehr lange überleben und durch die kontinuierliche Produktion von Antikörpern die humorale Immunität aufrechterhalten (112; 113). Im Rahmen

einer akuten Infektion und der damit verbundenen Entzündung, beispielsweise eines speziellen Organsystems wie der Lunge, kommt es zu einer Einwanderung und einem zeitlich begrenzten Überleben von Plasmazellen in dem betroffenen Gewebe. Dieser Mechanismus ermöglicht eine hohe lokale Konzentration der spezifischen Antikörper in unmittelbarer Nähe des Entzündungsherdes, was zu einer schnellen Elimination des Erregers beiträgt. Nach Abklingen der Entzündung können die dort angesammelten Plasmazellen nicht mehr überleben und sind in der Folge nicht mehr nachweisbar (114).

Im Falle einer Autoimmunerkrankung, wie z.B. der Lupusnephritis ist es möglich, dass es durch die Ansammlung von Plasmazellen in den Nieren zu einer hohen lokalen Konzentration von Autoantikörpern und einer verstärkten lokalen Schädigung des Gewebes kommt. Im Gegensatz zu den Prozessen im Rahmen einer akuten Infektion kommt es allerdings nicht zu einem Abklingen der Entzündung nach Klärung des Antigens, sondern zu einer chronischen Entzündung.

Das oben genannte Überleben der Plasmazellen im Knochenmark führt dazu, dass das Individuum bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger in der Lage ist, diesen sehr schnell zu eliminieren. Plasmazellen und deren Vorstufe, die Plasmablasten entstehen nach Antigenkontakt, z.B. nach einer Immunisierung, aus aktivierten B-Zellen oder aus Gedächtnis-B-Zellen. Dieser Vorgang findet in den sekundären lymphatischen Organen, z.B. in der Milz, statt. Nach ihrer Entstehung wandern diese Zellen in verschiedene Gewebe, besonders in das Knochenmark, in Schleimhautepithelien oder in chronisch entzündetes Gewebe. Gesteuert wird dieser Prozess durch das Zusammenspiel von verschiedenen Chemokinen und deren Rezeptoren. Neugebildete Plasmazellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche unter anderem den Chemokinrezeptor CXCR4. Der Ligand dieses Rezeptors, das Chemokin CXCL12, wird z.B. von stromalen Zellen des Knochenmarks gebildet, in deren Nachbarschaft Plasmazellen im Knochenmark gefunden werden (115). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Plasmablasten während einer kurzen Zeitspanne nach ihrer Entstehung sensibel auf Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 reagieren (76). Einer der Liganden, das proinflammatorische CXCL10 wird in entzündeten Geweben sezerniert. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass es Plasmazellen/-blasten in diese Gewebe lenkt. Auch im Rahmen der Lupusnephritis wird CXCL10 in hohem Maße im entzündeten Gewebe produziert (116; 19). Ausserdem konnte in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen 2001 von Cassese et al. gezeigt werden, dass Plasmazellen in einer Anzahl in der entzündeten Niere der NZB/W-Maus vorkommen, die mit der in der Milz vergleichbar ist. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die nach einer Immunisierung mit Ovalbumin in der Milz entstandenen Plasmazellen in der Lage sind, in die entzündeten Nieren der Mäuse zu migrieren (75). Da ausdifferenzierte Plasma-

zellen den Chemokinrezeptor CXCR5 nicht auf ihrer Zelloberfläche tragen (siehe Abb. 4.14 auf S. 42) und auch im Migrationsversuch nicht auf das Chemokin CXCL13 reagieren, kann dieses Rezeptor-Liganden-Paar nicht für die Migration der Plasmazellen verantwortlich gemacht werden. Im Gegensatz zu CXCR5 wird CXCR3 in hohem Maße auf der Zellmembran von Plasmazellen exprimiert, die aus entzündeten Nieren der NZB/W-Mäuse isoliert wurden (siehe Abb. 4.12 auf S. 41). Es ist deshalb anzunehmen, daß CXCR3 in Interaktion mit einem seiner Liganden, dem CXCL10, eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von Plasmazellen im entzündeten Gewebe spielt. Das von uns beschriebene Verteilungsmuster mit einer Akkumulation von B-Lymphozyten in ganz bestimmten Bereichen und das eher verstreute Vorkommen von Plasmazellen in den entzündeten Nieren der NZB/W-Mäuse, passt zu der Annahme, dass das Migrationsverhalten durch verschiedene Chemokin-Chemokin-Rezeptor-Paare gesteuert wird. Leider war es uns nicht möglich das durch PCR nachgewiesene, proinflammatorische Chemokin CXCL10 (19) fluoreszenzmikroskopisch darzustellen.

Welche Relevanz Plasmazellen für die Entwicklung der murinen Lupusnephritis haben, konnte vor kurzem von Neubert et al. gezeigt werden (117). Durch die Gabe des selektiven Inhibitors des 26S Proteasoms Bortezomib konnten sehr spezifisch Plasmazellen depletiert werden. Bei Versuchen an NZB/W-Mäusen wurde gezeigt, dass 48 Stunden nach Gabe des Inhibitors die Anzahl der Plasmazellen in der Milz um 60% und im Knochenmark um 95% reduziert war. Die Gabe des Proteasom-Inhibitors war mit einer deutlichen Verlängerung des Überlebens der NZB/W-Mäuse verbunden. Im Alter von etwas mehr als einem Jahr lebten noch alle 20 mit Bortezomib behandelten NZB/W-Mäuse, wohingegen 90% der Mäuse der unbehandelten Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht mehr lebten. Neben diesen Befunden wurde der Verlauf der Konzentration von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA im Serum der Tiere untersucht und es konnte gezeigt werden, dass, in Abhängigkeit vom Beginn der Gabe des Proteasominhibitors, die Titer auf der Höhe der gesunden Kontrollgruppe blieben oder wieder auf diese abfielen und während des gesamten Untersuchungszeitraumes nicht wieder anstiegen.

## **5.5 Produktion von Chemokinen in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen**

Die Migration von Lymphozyten zwischen verschiedenen Organen und innerhalb verschiedener Gewebe wird durch das Zusammenspiel von Chemokinen und den für sie jeweils spezifischen Chemokin-Rezeptoren gesteuert (118). Zwei wichtige Chemokin-Chemokin-Rezeptor-Paare, von denen bekannt ist, dass sie auf die Verteilung von B-Zellen und Plasmazellen

einwirken, sind die Chemokine CXCL10 und CXCL 13 und ihre Rezeptoren CXCR3 bzw. CXCR5 (76; 119; 86).

Ausgereifte naive B-Zellen zirkulieren mit dem Blutstrom durch die verschiedenen lymphatischen Gewebe des Körpers, sie verlassen die Blutgefäße um in die Milz, die Lymphknoten und in andere lymphatische Organe zu gelangen. Bevor sie durch den Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen aktiviert werden, akkumulieren naive B- und T-Zellen in den B-Zell-Follikeln bzw. in den T-Zell-Zonen der sekundär lymphatischen Organe. Eine besonders wichtige Rolle bei der Positionierung der B-Zellen spielt der Rezeptor CXCR5, der von allen naiven B-Zellen exprimiert wird. Welche Auswirkungen ein Fehlen dieses Rezeptors hat, konnte 1996 von Foerster et al. durch Untersuchungen an CXCR5 defizienten Mäusen gezeigt werden (92). So besaßen diese Mäuse keine inguinalen Lymphknoten und nur wenige Peyersche Plaques mit atypischer Morphologie. Ausserdem ist der normale Aufbau der primären Follikel der Milz vollkommen gestört. Die naiven B-Zellen sammeln sich statt dessen im Bereich der marginalen Zone. Eine andere Studie von Luther et al. aus dem Jahre 2000 zeigt die Auswirkung einer ektopen Sekretion von CXCL13 durch Inselzellen des Pankreas (120). Dazu wurde eine transgene Maus erzeugt, deren insulinproduzierenden Zellen gleichzeitig CXCL13 sezernieren. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass diese Sekretion von CXCL13 zu einer Akkumulation von B-Zellen im Bereich der insulinproduzierenden Inselzellen führt. Gleichzeitig kam es auch zu einer Anreicherung von T-Zellen und dendritischen Zellen und zu einer Anordnung dieser Zellen, wie man sie aus sekundären lymphatischen Organen kennt. Insgesamt konnte so nachgewiesen werden, dass die Sekretion von CXCL13 ausserhalb von sekundären lymphatischen Organen ausreicht, um zu einem Aufbau von Läsionen zu führen, die große Ähnlichkeit zu B-Zell-Follikeln aufweisen. Die Ergebnisse aus diesen Studien stimmen mit den hier dargestellten Beobachtungen überein und liefern eine Erklärung für das Vorkommen von differenziert aufgebauten Infiltraten, die follikelähnliche Struktur besitzen. Die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der CXCL13-Sekretion im Bereich der entzündlichen Läsionen der Niere in Abb. 4.15 auf S. 43 zeigt, daß die B-Zellen sehr exakt mit diesem Chemokin kolokalisiert sind.

Schon in einer früheren Studie von Ishikawa et al. konnte per real-time PCR gezeigt werden, dass in älteren NZB/W-Mäusen die Genexpression von CXCL13 in der Niere ca. 480 mal und im Thymus ca. 2000 mal höher ist wenn diese mit jungen NZB/W-Mäusen verglichen werden (77). Allgemein anerkannt ist die Meinung, dass CXCL13 in gesunden Individuen hauptsächlich von follikulären dendritischen Zellen gebildet wird (24). 2004 konnten Carlsen et al. in einer Studie bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder rheumatoider Arthritis zeigen, dass hauptsächlich Monozyten/Makrophagen in ektopen Follikeln CXCL13 produzieren und

auf diese Weise B-Zellen in das Gewebe lenken (121).

## 6 Zusammenfassung

Die Nephritis ist eine häufige und schwerwiegende Komplikation des systemischen Lupus erythematodes. Im Vordergrund steht dabei die Ablagerung von Immunkomplexen in den Glomeruli. Weniger ist bekannt über das Vorkommen von immunkompetenten Zellen in den Nieren und mögliche Auswirkungen dieser auf die Entzündung. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an Mäusen des Stammes NZB/W vorgestellt. Dieser Stamm ist als Modell für eine systemische Autoimmunerkrankung anerkannt. Die Erkrankung ist dem systemischen Lupus erythematodes sehr ähnlich. Im Rahmen dieser, durch Autoantikörper vermittelten Erkrankung kommt es u.a. zur Bildung von langlebigen autoreaktiven Plasmazellen die durch eine zytotoxische Therapie mit Cyclophosphamid nicht eliminiert werden können. Diese erklären das Vorkommen von therapierefraktären Autoantikörpertitern wie z.B. anti-dsDNA-Antikörpern.

Frühere Studien an Mäusen des Stammes NZB/W haben gezeigt, dass es zu einer Einwanderung von B- und T-Lymphozyten und von Plasmazellen in die entzündeten Nieren kommt. Unklar blieb dabei wie sich diese Zellen anordnen und wodurch die Einwanderung gesteuert wird.

Mit Hilfe der Immunhistologie konnte nun nachgewiesen werden, dass sich B- und T-Lymphozyten innerhalb von deutlich begrenzten Infiltrationsfeldern ansammeln. Interessanterweise wird in enger Kolo-kalisation dieser Infiltrationsfelder das Chemokin CXCL13, der Ligand von CXCR5, exprimiert. Dieses Chemokin-Chemokinrezeptor-Paar ist in der Milz für die Bildung von Follikeln mit einer typischen Einteilung in B- und T-Zellzonen verantwortlich. Nähere Untersuchungen der B-Lymphozyten zeigen, dass es sich hauptsächlich um naive (B2)B-Zellen und nicht wie vielleicht vermutet um Gedächtnis-B-Zellen handelt.

Im Gegensatz dazu finden sich Plasmazellen über weite Bereiche des Nierengewebes verteilt; sie bilden keine zusammenhängenden Zellverbände. Durchflusszytometrische Untersuchungen der Plasmazellen in den entzündeten Nieren zeigen eine starke Expression von CXCR3 auf der Zelloberfläche. CXCR3 ist der Rezeptor des proinflammatorischen Chemokins CXCL10, das in den entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen nachgewiesen werden kann.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass B-Lymphozyten und Plasmazellen weitestgehend unabhängig voneinander in die entzündeten Nieren einwandern und dass diese Prozesse

durch zwei unterschiedliche Chemokin-Chemokinrezeptor-Paare gesteuert werden.

## 7 Abstract

Glomerulonephritis is a common complication of systemic lupus erythematosus with a frequency of 40-50% in all lupus patients. It has impact on therapy and prognosis.

NZB/W mice spontaneously develop a lupus like disease leading to lethal immune complex-mediated nephritis. Disease manifestation is accompanied by lymphocyte homing into the kidneys.

The results of this study show that kidney infiltrating B cells accumulate in small follicle-like structures while IgG-containing plasma cells are scattered within the whole organ. The chemokine receptor CXCR3 mediates migration towards the inflammatory chemokine CXCL10, abundantly expressed in inflamed NZB/W tissue. CXCR3<sup>+</sup> plasma cell precursors (plasmablasts) selectively accumulate in the kidneys, while CXCR3 bearing B cell frequencies are not increased within these tissues compared to bone marrow and spleen. Like in spleens, CXCL13 expression in the inflamed kidneys is exclusively detected in the B cell areas. In accordance with the tissue distribution of B cells and plasma cells, the chemokine receptor CXCR5 that mediates migration towards CXCL13 gradients is expressed by kidney infiltrating B cells but absent on plasmablasts.

Interestingly, the kidney infiltrating B cell population contains 50% IgD/IgM<sup>+</sup> naïve cells whereas memory B cells could not be detected in higher frequencies compared to other organs.

These data suggest that B cells and plasma cells accumulate within the kidney by different homing mechanisms involving CXCR5/CXCL13 and CXCR3/CXCL10, respectively.

# Literaturverzeichnis

- [1] PODOLSKY, D.K.: Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. In: *Am J Physiol* 277 (1999), S. 495–499
- [2] ADEREM, A. ; UNDERHILL, D.M.: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. In: *Ann Rev Immunol* 17 (1999), S. 593–623
- [3] KOPP, E. B. ; MEDZHITOV, R.: The Toll-receptor family and control of innate immunity. In: *Curr. Opin. Immunol.* 11 (1999), Feb, S. 13–18
- [4] SVANBORG, C ; GODALY, G ; HEDLUND, M: Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. In: *Curr Opin Microbiol* 2 (1999), Nr. 1, S. 99–105
- [5] FRANK, M.M. ; FRIES, L.F.: The role of complement in inflammation and phagocytosis. In: *Immunol Today* 12 (1991), Sep, Nr. 9, S. 322–326
- [6] GARSIDE, P. ; INGULLI, E. ; MERICA, R.R. ; JOHNSON, J.G. ; NOELLE, R.J. ; JENKINS, M.K.: Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. In: *Science* 281 (1998), Jul, Nr. 5373, S. 96–99
- [7] LIU, Y J. ; ZHANG, J ; LANE, P J. ; CHAN, E Y. ; MACLENNAN, I C.: Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. In: *Eur J Immunol* 21 (1991), Dec, Nr. 12, S. 2951–2962
- [8] WARD, E S. ; GHETIE, V: The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. In: *Ther Immunol* 2 (1995), Apr, Nr. 2, S. 77–94
- [9] GOWANS, J.L. ; KNIGHT, E.J.: The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. In: *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 159 (1964), Nr. 975, S. 257–82
- [10] WATSON, M.L. ; KINGSMORE, S.F. ; JOHNSTON, G.I. ; SIEGELMAN, M.H. ; LE BEAU, M.M. ; LEMONS, R.S. ; BORA, N.S. ; HOWARD, T.A. ; WEISSMAN, I.L. ; MCEVER, R.P.: Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. In: *J Exp Med* 172 (1990), Jul, Nr. 1, S. 263–272
- [11] MARTIN, K.H. ; SLACK, J.K. ; BOERNER, S.A. ; MARTIN, C.C. ; PARSONS, J.T.: Integrin connections map: to infinity and beyond. In: *Science* 296 (2002), May, Nr. 5573, S. 1652–53
- [12] APLIN, A.E. ; HOWE, A. ; ALAHARI, S.K. ; JULIANO, R.L.: Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. In: *Pharmacol Rev* 50 (1998), Jun, Nr. 2, S. 197–263

- [13] YOSHIE, O. ; IMAI, T. ; NOMIYAMA, H.: Chemokines in immunity. In: *Adv Immunol* 78 (2001), S. 57–110
- [14] ZLOTNIK, A. ; YOSHIE, O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. In: *Immunity* 12 (2000), Feb, Nr. 2, S. 121–127
- [15] STRIETER, R.M. ; POLVERINI, P.J. ; KUNKEL, S.L. ; ARENBERG, D.A. ; BURDICK, M.D. ; KASPER, J. ; DZUIBA, J. ; VAN DAMME, J. ; WALZ, A. ; MARRIOTT, D. ; CHAN, S.Y. ; ROCZNIAK, S. ; SHANAFELT, A.B.: The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nov, Nr. 45, S. 27348–27357
- [16] KENNEDY, J. ; KELNER, G.S. ; KLEYENSTEBER, S. ; SCHALL, T.J. ; WEISS, M.C. ; YSSEL, H. ; SCHNEIDER, P.V. ; COCKS, B.G. ; BACON, K.B. ; ZLOTNIK, A.: Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. In: *J Immunol* 155 (1995), Jul, Nr. 1, S. 203–209
- [17] BAZAN, J.F. ; BACON, K.B. ; HARDIMAN, G. ; WANG, W. ; SOO, K. ; ROSSI, D. ; GREAVES, D.R. ; ZLOTNIK, A. ; SCHALL, T.J.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. In: *Nature* 385 (1997), Feb, Nr. 6617, S. 640–644
- [18] OHL, L. ; HENNING, G. ; KRAUTWALD, S. ; LIPP, M. ; HARDTKE, S. ; BERNHARDT, G. ; PABST, O. ; FORSTER, R.: Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. In: *J Exp Med* 197 (2003), May, Nr. 9, S. 1199–1204
- [19] HAUSER, A.E.: *Chemotaxis von IgG-sezernierenden Zellen in der Maus*, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FB Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Diss., 2003
- [20] OPPERMANN, M. ; FÖRSTER, R.: Chemokines and their Receptors: Biochemical, Structural and Biological Properties. In: HAMANN, A. (Hrsg.) ; ENGELHARDT, B. (Hrsg.): *Leukocyte Trafficking*. 1<sup>st</sup> Edition. Wiley-VCH, 2005
- [21] CYSTER, J.G.: Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. In: *Science* 286 (1999), Dec, Nr. 5447, S. 2098–2102
- [22] CYSTER, J G. ; NGO, V N. ; EKLAND, E H. ; GUNN, M D. ; SEDGWICK, J D. ; ANSEL, K M.: Chemokines and B-cell homing to follicles. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 246 (1999), S. 87–92
- [23] MULLER, G. ; HOPKEN, U.E. ; LIPP, M.: The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. In: *Immunol Rev* 195 (2003), S. 117–135
- [24] CYSTER, J G. ; ANSEL, K M. ; REIF, K ; EKLAND, E H. ; HYMAN, P L. ; TANG, H L. ; LUTHER, S A. ; NGO, V N.: Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. In: *Immunol Rev* 176 (2000), Aug, S. 181–193
- [25] HIEPE, F. ; DÖRNER, T. ; BURMESTER, G.: Antinuclear antibody- and extractable nuclear antigen-related diseases. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123 (2000), Sep, S. 5–9

- [26] MILLS, J. A.: Systemic lupus erythematosus. In: *N. Engl. J. Med.* 330 (1994), Jun, S. 1871–1879
- [27] HAHN, B.H.: Antibodies to DNA. In: *N. Engl. J. Med.* 338 (1998), May, S. 1359–1368
- [28] RIEMEKASTEN, G. ; MARELL, J. ; TREBELJAHR, G. ; KLEIN, R. ; HAUSDORF, G. ; HÄUPL, T. ; SCHNEIDER-MERGENER, J. ; BURMESTER, G.R. ; HIEPE, F.: A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. In: *J. Clin. Invest.* 102 (1998), S. 754–763
- [29] HAHN, B.H.: An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: WALLACE, D.J. (Hrsg.) ; HAHN, B.H. (Hrsg.): *Dubois' Lupus Erythematosus.* 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2001. – S.87–96
- [30] DEAPEN, D. ; ESCALANTE, A. ; WEINRIB, L. ; HORWITZ, D. ; BACHMAN, B. ; ROY-BURMAN, P. ; WALKER, A. ; MACK, T. M.: A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis Rheum.* 35 (1992), Mar, S. 311–318
- [31] ODENDAHL, M. ; JACOBI, A. ; HANSEN, A. ; FEIST, E. ; HIEPE, F. ; BURMESTER, G.R. ; LIPSKY, P.E. ; RADBRUCH, A. ; DÖRNER, T.: Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. In: *J. Immunol.* 165 (2000), S. 5970–79
- [32] KAMRADT, T. ; MITCHISON, N.A.: Tolerance and autoimmunity. In: *N. Engl. J. Med.* 344 (2001), S. 655–664
- [33] TRON, F. ; JACQUOT, S. ; GILBERT, D.: B-cell anomalies in systemic lupus erythematosus. In: *Ann Med Interne (Paris)* 153 (2002), Dec, S. 503–512
- [34] LIPSKY, P.E.: Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. In: *Nat. Immunol.* 2 (2001), S. 764–766
- [35] DUKE-COHAN, J.S. ; RUBINOW, A. ; HIRT, R. ; NAOR, D.: The reaction against autologous lymphoblasts as an indicator of lymphocyte hyperreactivity in rheumatoid arthritis. In: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54 (1990), S. 298–308
- [36] SHLOMCHIK, M.J. ; MADAIO, M.P.: The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis. In: *Springer Semin. Immunopathol.* 24 (2003), S. 363–375
- [37] STOHL, W. ; METYAS, S. ; TAN, S.M. ; CHEEMA, G.S. ; OAMAR, B. ; XU, D. ; ROSCHKE, V. ; WU, Y. ; BAKER, K.P. ; HILBERT, D.M.: B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. In: *Arthritis Rheum.* 48 (2003), S. 3475–3486
- [38] TAN, S.M. ; XU, D. ; ROSCHKE, V. ; PERRY, J.W. ; ARKFELD, D.G. ; EHRESMANN, G.R. ; MIGONE, T.S. ; HILBERT, D.M. ; STOHL, W.: Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. In: *Arthritis Rheum.* 48 (2003), S. 982–992
- [39] BAKER, K.P.: BLyS—an essential survival factor for B cells: basic biology, links to pathology and therapeutic target. In: *Autoimmun Rev* 3 (2004), S. 368–375
- [40] CHAN, O.T. ; HANNUM, L.G. ; HABERMAN, A.M. ; MADAIO, M.P. ; SHLOMCHIK, M.J.: A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. In: *J Exp Med* 189 (1999), Nr. 10, S. 1639–48

- [41] CHAN, O.T. ; MADAIO, M.P. ; SHLOMCHIK, M.J.: B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas-intact MRL model of systemic autoimmunity. In: *J. Immunol.* 163 (1999), Oct, S. 3592–3596
- [42] CHAN, O.T. ; MADAIO, M.P. ; SHLOMCHIK, M.J.: The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. In: *Immunol. Rev.* 169 (1999), Jun, S. 107–121
- [43] REININGER, L. ; RADASZKIEWICZ, T. ; KOSCO, M. ; MELCHERS, F. ; ROLINK, A.G.: Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term in vitro proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells. In: *J. Exp. Med.* 176 (1992), S. 1343–1353
- [44] SHLOMCHIK, M.J. ; CRAFT, J.E. ; MAMULA, M.J.: From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001), S. 147–153
- [45] ENGHARD, P. ; RIEMEKASTEN, G.: [Regulatory T cells - a possible promising target in the treatment of autoimmune diseases]. In: *Z Rheumatol* 62 (2003), S. 355–360
- [46] WU, H.Y. ; STAINES, N.A.: A deficiency of CD4+CD25+ T cells permits the development of spontaneous lupus-like disease in mice, and can be reversed by induction of mucosal tolerance to histone peptide autoantigen. In: *Lupus* 13 (2004)
- [47] LIN, R. H. ; MAMULA, M. J. ; HARDIN, J. A. ; JANEWAY, C. A.: Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. In: *J. Exp. Med.* 173 (1991), Jun, S. 1433–1439
- [48] MANZ, R.A. ; THIEL, A. ; RADBRUCH, A.: Lifetime of plasma cells in the bone marrow. In: *Nature* 388 (1997), S. 133–134
- [49] HOYER, B. F. ; MOSER, K. ; HAUSER, A. E. ; PEDDINGHAUS, A. ; VOIGT, C. ; EILAT, D. ; RADBRUCH, A. ; HIEPE, F. ; MANZ, R. A.: Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. In: *J Exp Med* 199 (2004), Nr. 11, S. 1577–84
- [50] ODENDAHL, M. ; KEITZER, R. ; WAHN, U. ; HIEPE, F. ; RADBRUCH, A. ; DÖRNER, T. ; BUNIKOWSKI, R.: Perturbations of peripheral B lymphocyte homeostasis in children with systemic lupus erythematosus. In: *Ann. Rheum. Dis.* 62 (2003), S. 851–858
- [51] HUONG, D.L. ; PAPO, T. ; BEAUFILS, H. ; WECHSLER, B. ; BLÉTRY, O. ; BAUMELOU, A. ; GODEAU, P. ; PIETTE, J.C.: Renal involvement in systemic lupus erythematosus. A study of 180 patients from a single center. In: *Medicine (Baltimore)* 78 (1999), May, S. 148–166
- [52] HOLLICRAFT, R.M. ; DUBOIS, E.L. ; LUNDBERG, G.D. ; CHANDOR, S.B. ; GILBERT, S.B. ; QUISMORIO, F.P. ; BARBOUR, B.H. ; FRIOU, G.J.: Renal damage in systemic lupus erythematosus with normal renal function. In: *J. Rheumatol.* 3 (1976), Sep, S. 251–261
- [53] WEENING, J. J. ; D'AGATI, V. D. ; SCHWARTZ, M. M. ; SESHAN, S. V. ; ALPERS, C. E. ; APPEL, G. B. ; BALOW, J. E. ; BRUIJN, J. A. ; COOK, T. ; FERRARIO, F. ; FOGO, A. B. ; GINZLER, E. M. ; HEBERT, L. ; HILL, G. ; HILL, P. ; JENNETTE, J. C. ; KONG, N. C. ; LESAVRE, P. ; LOCKSHIN, M. ; LOOI, L. M. ; MAKINO, H.

- ; MOURA, L. A. ; NAGATA, M.: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004), Feb, S. 241–250
- [54] APPEL, G.B. ; PIRANI, C.L. ; D'AGATI, V.: Renal vascular complications of systemic lupus erythematosus. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 4 (1994), Feb, S. 1499–1515
- [55] ALTIERI, P. ; PANI, A. ; BOLASCO, P. ; MELIS, P. ; BARRACCA, A. ; TODDE, P. ; MASIA, A.M.: Is renal vasculitis in patients with systemic lupus erythematosus a bad prognostic factor? In: *Contrib Nephrol* 99 (1992), S. 72–78
- [56] MERONI, M. ; TORRI TARELLI, L. ; TAZZARI, S. ; BATTINI, G. ; SESSA, A.: Renal ultrastructural findings in lupus vasculopathies. In: *Contrib Nephrol* 99 (1992), S. 79–85
- [57] YAMAMOTO, T. ; NAGASE, M. ; HISHIDA, A. ; HONDA, N.: Interstitial inflammatory and chronic tubulointerstitial lesions in lupus nephritis: comparison with those in IgA nephropathy. In: *Lupus* 2 (1993), Aug, S. 261–268
- [58] MAGIL, A.B. ; TYLER, M.: Tubulo-interstitial disease in lupus nephritis. A morphometric study. In: *Histopathology* 8 (1984), Jan, S. 81–87
- [59] ALEXOPOULOS, E. ; SERON, D. ; HARTLEY, R.B. ; CAMERON, J.S.: Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. In: *Kidney Int.* 37 (1990), Jan, S. 100–109
- [60] HELYER, B.J. ; HOWIE, J.B.: Positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice NZB/B1-NZY/B1. In: *Proc Univ Otago Med Sch (NZ)* 39 (1961), S. 3–4
- [61] HELYER, B.J. ; HOWIE, J.B.: Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. In: *Nature* 197 (1963), S. 197
- [62] ANDREWS, B S. ; EISENBERG, R A. ; THEOFILOPOULOS, A N. ; IZUI, S ; WILSON, C B. ; MCCONAHEY, P J. ; MURPHY, E D. ; ROTHS, J B. ; DIXON, F J.: Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. In: *J Exp Med* 148 (1978), Nov, Nr. 5, S. 1198–1215
- [63] THEOFILOPOULOS, A. N. ; DIXON, F. J.: Murine models of systemic lupus erythematosus. In: *Adv Immunol* 37 (1985), S. 269–390
- [64] LAMBERT, P.H. ; DIXON, F.J.: Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. In: *J. Exp. Med.* 127 (1968), S. 507–522
- [65] HAHN, B.H.: Animal Models of Systemic Lupus Erythematosus. In: WALLACE, D.J. (Hrsg.) ; HAHN, B.H. (Hrsg.): *Dubois' Lupus Erythematosus*. 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2001. – S.339–375
- [66] HOWIE, J.B. ; HELYER, B.J.: The immunology and pathology of NZB mice. In: *Adv. Immunol.* 9 (1968)
- [67] BERDEN, J.H. ; HANG, L. ; MCCONAHEY, P.J. ; DIXON, F.J.: Analysis of vascular lesions in murine SLE. I. Association with serologic abnormalities. In: *J. Immunol.* 130 (1983), S. 1699–1705

- [68] BIELSCHOWSKY, M. ; HELYER, B.J. ; HOWIE, J.B.: Spontaneous haemolytic anaemia in mice of the NZB/B1 strain. In: *Proc Univ Otago Med Sch (NZ)* 37 (1959), S. 9–11
- [69] DEHEER, D.H. ; EDGINGTON, T.S.: Specific antigen-binding and antibody-secreting lymphocytes associated with the erythrocyte autoantibody responses of NZB and genetically unrelated mice. In: *J. Immunol.* 116 (1976), S. 1051–1058
- [70] HAHN, B.H. ; SHULMAN, L.E.: Autoantibodies and nephritis in the white strain (NZW) of New Zealand mice. In: *Arthritis Rheum.* 12 (1969), Aug, S. 355–364
- [71] KONO, D.H. ; BURLINGAME, R.W. ; OWENS, D.G. ; KURAMOCHI, A. ; BALDERAS, R.S. ; BALOMENOS, D. ; THEOFILOPOULOS, A.N.: Lupus susceptibility loci in New Zealand mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994), Oct, S. 10168–72
- [72] KOTZIN, B.L. ; PALMER, E.: The contribution of NZW genes to lupus-like disease in (NZB x NZW)F1 mice. In: *J. Exp. Med.* 165 (1987), May, S. 1237–51
- [73] VYSE, T.J. ; MOREL, L. ; TANNER, F.J. ; WAKELAND, E.K. ; KOTZIN, B.L.: Backcross analysis of genes linked to autoantibody production in New Zealand White mice. In: *J. Immunol.* 157 (1996), Sep, S. 2719–27
- [74] ITO, T. ; ISHIKAWA, S. ; SATO, T. ; AKADEGAWA, K. ; YURINO, H. ; KITABATAKE, M. ; HONTSU, S. ; EZAKI, T. ; KIMURA, H. ; MATSUSHIMA, K.: Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for systemic lupus erythematosus. In: *J Immunol* 172 (2004), Nr. 6, S. 3628–34
- [75] CASSESE, G. ; LINDENAU, S. ; DE BOER, B. ; ARCE, S. ; HAUSER, A. ; RIEMEKASTEN, G. ; BEREK, C. ; HIEPE, F. ; KRENN, V. ; RADBRUCH, A. ; MANZ, R. A.: Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. In: *Eur J Immunol* 31 (2001), Nr. 9, S. 2726–32
- [76] HAUSER, A.E. ; DEBES, G.F. ; ARCE, S. ; CASSESE, G. ; HAMANN, A. ; RADBRUCH, A. ; MANZ, R.A.: Chemotactic responsiveness towards ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. In: *J Immunol* 169 (2002), Nr. 3, S. 1277–82
- [77] ISHIKAWA, S. ; SATO, T. ; ABE, M. ; NAGAI, S. ; ONAI, N. ; YONEYAMA, H. ; ZHANG, Y. ; SUZUKI, T. ; HASHIMOTO, S. ; SHIRAI, T. ; LIPP, M. ; MATSUSHIMA, K.: Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. In: *J Exp Med* 193 (2001), Nr. 12, S. 1393–402
- [78] BARANZINI, S.E. ; JEONG, M.C. ; BUTUNOI, C. ; MURRAY, R.S. ; BERNARD, C.C. ; OKSENBERG, J.R.: B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. In: *J. Immunol.* 163 (1999), Nov, S. 5133–5144
- [79] BEREK, C. ; KIM, H.J.: B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. In: *Semin. Immunol.* 9 (1997), Aug, S. 261–268
- [80] ENGHARD, P.: *Charakterisierung der T-Zell Infiltration bei muriner Lupusnephritis*, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie, FB Humanmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Diss., 2006

- [81] BOUCHER, A. ; DROZ, D. ; ADAFER, E. ; NOËL, L.H.: Characterization of mononuclear cell subsets in renal cellular interstitial infiltrates. In: *Kidney Int.* 29 (1986), May, S. 1043–1049
- [82] BAGAVANT, H. ; FU, S.M.: New insights from murine lupus: disassociation of autoimmunity and end organ damage and the role of T cells. In: *Curr Opin Rheumatol* 17 (2005), Sep, S. 523–528
- [83] KUROIWA, T. ; LEE, E.G.: Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. In: *Lupus* 7 (1998), S. 597–603
- [84] OSMOND, D.G. ; ROLINK, A. ; MELCHERS, F.: Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. In: *Immunol. Today* 19 (1998), Feb, S. 65–68
- [85] JANEWAY, C.A. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. ; SHLOMCHIK, M.J.: The development and survival of lymphocytes. In: *Immunobiology.* 5<sup>th</sup> Edition. Garland Publishing, 2001. – S.228
- [86] MANZ, R.A. ; MOSER, K. ; BURMESTER, G.R. ; RADBRUCH, A. ; HIEPE, F.: Immunological memory stabilizing autoreactivity. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 305 (2006), S. 241–257
- [87] FAGARASAN, S. ; WATANABE, N. ; HONJO, T.: Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. In: *Immunol Rev* 176 (2000), S. 205–215
- [88] JANEWAY, C.A. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. ; SHLOMCHIK, M.J.: Basic concepts in immunology. In: *Immunobiology.* 5<sup>th</sup> Edition. Garland Publishing, 2001. – S.8
- [89] DRAYTON, D.L. ; LIAO, S. ; MOUNZER, R.H. ; RUDDLE, N.H.: Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. In: *Nat. Immunol.* 7 (2006), Apr, S. 344–353
- [90] DRAYTON, D.L. ; YING, X. ; LEE, J. ; LESSLAUER, W. ; RUDDLE, N.H.: Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. In: *J. Exp. Med.* 197 (2003), May, S. 1153–1163
- [91] KERJASCHKI, D. ; REGELE, H.M. ; MOOSBERGER, I. ; NAGY-BOJARSKI, K. ; WATSCHINGER, B. ; SOLEIMAN, A. ; BIRNER, P. ; KRIEGER, S. ; HOVORKA, A. ; SILBERHUMER, G. ; LAAKKONEN, P. ; PETROVA, T. ; LANGER, B. ; RAAB, I.: Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004), Mar, S. 603–612
- [92] FÖRSTER, R. ; MATTIS, A.E. ; KREMMER, E. ; WOLF, E. ; BREM, G. ; LIPP, M.: A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. In: *Cell* 87 (1996), Dec, S. 1037–1047
- [93] SCHRÖDER, A.E. ; GREINER, A. ; SEYFERT, C. ; BEREK, C.: Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996), Jan, S. 221–225

- [94] SHI, K. ; HAYASHIDA, K. ; KANEKO, M. ; HASHIMOTO, J. ; TOMITA, T. ; LIPSKY, P.E. ; YOSHIKAWA, H. ; OCHI, T.: Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients. In: *J. Immunol.* 166 (2001), Jan, S. 650–655
- [95] PABLOS, J.L. ; SANTIAGO, B. ; TSAY, D. ; SINGER, M.S. ; PALAO, G. ; GALINDO, M. ; ROSEN, S.D.: A HEV-restricted sulfotransferase is expressed in rheumatoid arthritis synovium and is induced by lymphotoxin-alpha/beta and TNF-alpha in cultured endothelial cells. In: *BMC Immunol.* 6 (2005), S. 6
- [96] PAAVONEN, K. ; MANDELIN, J. ; PARTANEN, T. ; JUSSILA, L. ; LI, T.F. ; RISTIMAKI, A. ; ALITALO, K. ; KONTTINEN, Y.T.: Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. In: *J. Rheumatol.* 29 (2002), Jan, S. 39–45
- [97] STOTT, D.I. ; HIEPE, F. ; HUMMEL, M. ; STEINHAUSER, G. ; BEREK, C.: Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjögren’s syndrome. In: *J. Clin. Invest.* 102 (1998), Sep, S. 938–946
- [98] BARONE, F. ; BOMBARDIERI, M. ; MANZO, A. ; BLADES, M.C. ; MORGAN, P.R. ; CHALLACOMBE, S.J. ; VALESINI, G. ; PITZALIS, C.: Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren’s syndrome. In: *Arthritis Rheum.* 52 (2005), Jun, S. 1773–1784
- [99] SIMS, G.P. ; SHIONO, H. ; WILLCOX, N. ; STOTT, D.I.: Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. In: *J. Immunol.* 167 (2001), Aug, S. 1935–1944
- [100] MURAI, H. ; HARA, H. ; HATAE, T. ; KOBAYASHI, T. ; WATANABE, T.: Expression of CD23 in the germinal center of thymus from myasthenia gravis patients. In: *J. Neuroimmunol.* 76 (1997), Jun, S. 61–69
- [101] PRINEAS, J.W.: Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. In: *Science* 203 (1979), Mar, S. 1123–1125
- [102] SERAFINI, B. ; ROSICARELLI, B. ; MAGLIOZZI, R. ; STIGLIANO, E. ; ALOISI, F.: Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. In: *Brain Pathol.* 14 (2004), Apr, S. 164–174
- [103] PASHENKOV, M. ; SÖDERSTRÖM, M. ; LINK, H.: Secondary lymphoid organ chemokines are elevated in the cerebrospinal fluid during central nervous system inflammation. In: *J. Neuroimmunol.* 135 (2003), Feb, S. 154–160
- [104] KAISERLING, E.: Newly-formed lymph nodes in the submucosa in chronic inflammatory bowel disease. In: *Lymphology* 34 (2001), Mar, S. 22–29
- [105] DUIJVESTIJN, A.M. ; HORST, E. ; PALS, S.T. ; ROUSE, B.N. ; STEERE, A.C. ; PICKER, L.J. ; MEIJER, C.J. ; BUTCHER, E.C.: High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. In: *Am. J. Pathol.* 130 (1988), Jan, S. 147–155

- [106] STEERE, A.C. ; DURAY, P.H. ; BUTCHER, E.C.: Spirochetal antigens and lymphoid cell surface markers in Lyme synovitis. Comparison with rheumatoid synovium and tonsillar lymphoid tissue. In: *Arthritis Rheum.* 31 (1988), Apr, S. 487–495
- [107] GHOSH, S. ; STEERE, A.C. ; STOLLAR, B.D. ; HUBER, B.T.: In situ diversification of the antibody repertoire in chronic Lyme arthritis synovium. In: *J. Immunol.* 174 (2005), Mar, S. 2860–2869
- [108] FRENI, M.A. ; ARTUSO, D. ; GERKEN, G. ; SPANTI, C. ; MARAFIOTI, T. ; ALESSI, N. ; SPADARO, A. ; AJELLO, A. ; FERRAÙ, O.: Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C: occurrence, immunohistochemical characterization, and relation to markers of autoimmunity. In: *Hepatology* 22 (1995), Aug, S. 389–394
- [109] HILLAN, K.J. ; HAGLER, K.E. ; MACSWEEN, R.N. ; RYAN, A.M. ; RENZ, M.E. ; CHIU, H.H. ; FERRIER, R.K. ; BIRD, G.L. ; DHILLON, A.P. ; FERRELL, L.D. ; FONG, S.: Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, in inflammatory liver disease. In: *Liver* 19 (1999), Dec, S. 509–518
- [110] SHOMER, N.H. ; FOX, J.G. ; JUEDES, A.E. ; RUDDLE, N.H.: Helicobacter-induced chronic active lymphoid aggregates have characteristics of tertiary lymphoid tissue. In: *Infect. Immun.* 71 (2003), Jun, S. 3572–3577
- [111] THAUNAT, O. ; FIELD, A.C. ; DAI, J. ; LOUEDEC, L. ; PATEY, N. ; BLOCH, M.F. ; MANDET, C. ; BELAIR, M.F. ; BRUNEVAL, P. ; MEILHAC, O. ; BELLON, B. ; JOLY, E. ; MICHEL, J.B. ; NICOLETTI, A.: Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), Oct, S. 14723–14728
- [112] MANZ, R.A. ; ARCE, S. ; CASSESE, G. ; HAUSER, A.E. ; HIEPE, F. ; RADBRUCH, A.: Humoral immunity and long lived plasma cells. In: *Curr Opin Immunol* 14 (2002), S. 517–521
- [113] MANZ, R. A. ; HAUSER, A. E. ; HIEPE, F. ; RADBRUCH, A.: Maintenance of serum antibody levels. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005), S. 367–386
- [114] RADBRUCH, A. ; MUEHLINGHAUS, G. ; LUGER, E. O. ; INAMINE, A. ; SMITH, K. G. ; DÖRNER, T. ; HIEPE, F.: Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. In: *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006), Oct, S. 741–750
- [115] HARGREAVES, D.C. ; HYMAN, P.L. ; LU, T.T. ; NGO, V.N. ; BIDGOL, A. ; SUZUKI, G. ; ZOU, Y.R. ; LITTMAN, D.R. ; CYSTER, J.G.: A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. In: *J. Exp. Med.* 194 (2001), Jul, S. 45–56
- [116] ROMAGNANI, P. ; BELTRAME, C. ; ANNUNZIATO, F. ; LASAGNI, L. ; LUCONI, M. ; GALLI, G. ; COSMI, L. ; MAGGI, E. ; SALVADORI, M. ; PUPILLI, C. ; SERIO, M.: Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. In: *J Am Soc Nephrol* 10 (1999), Nr. 12, S. 2518–26
- [117] NEUBERT, K. ; MEISTER, S. ; MOSER, K. ; WEISEL, F. ; MASEDA, D. ; AMANN, K. ; WIETHE, C. ; WINKLER, T.H. ; KALDEN, J.R. ; MANZ, R.A. ; VOLL, R.E.: The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. In: *Nat. Med.* 14 (2008), Jul, S. 748–755

- [118] CAMPBELL, D.J. ; KIM, C.H. ; BUTCHER, E.C.: Chemokines in the systemic organization of immunity. In: *Immunol. Rev.* 195 (2003), Oct, S. 58–71
- [119] MÜLLER, G. ; REITERER, P. ; HÖPKEN, U.E. ; GOLFIER, S. ; LIPP, M.: Role of homeostatic chemokine and sphingosine-1-phosphate receptors in the organization of lymphoid tissue. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987 (2003), Apr, S. 107–116
- [120] LUTHER, S. A. ; LOPEZ, T. ; BAI, W. ; HANAHAN, D. ; CYSTER, J. G.: BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. In: *Immunity* 12 (2000), Nr. 5, S. 471–81
- [121] CARLSEN, H.S. ; BAEKKEVOLD, E.S. ; MORTON, H.C. ; HARALDSEN, G. ; BRANDTZAEG, P.: Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. In: *Blood* 104 (2004), Nr. 10, S. 3021–7

# Abkürzungsverzeichnis

*g* Erdbeschleunigung  
die richtige Geschwindigkeit des Zentrifugenrotors ist abhängig von seinem Radius; zur Errechnung dient folgende Gleichung:

$$\omega = \frac{\sqrt{\frac{a}{r}}}{2\pi}$$

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors [ $U/s$ ]

$a$  = Beschleunigung des Rotors [ $m/s^2$ ]

$r$  = Radius des Rotors [ $m$ ]

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ANA	anti nukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
ASC	Antibody secreting cells
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop
CXCL	CXC Chemokin Ligand
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
Cy5	Indodicarbocyanine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
ELISPOT	Enzyme-Linked Immuno Spot
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HEVs	high endothelial venules
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
Ig (D, M)	Immunglobulin (D, M)
ISN	International Society of Nephrology
LN	Lupus-Nephritis
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHCII	Major Histocompatibility Complex
min.	Minuten
mRNA	Boten-RNA
N	Normal
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NZB/W	(New Zealand Black × New Zealand White) erste Tochtergeneration
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PNA	Peanut Agglutinin
RNA	Ribonucleinsäure
RPS	Renal Pathology Society
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SA	Streptavidin
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
sog.	sogenannt
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssDNA	einzelsträngige DNA
TLR	Toll-like Rezeptor
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organization

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Hiepe für die Betreuung dieser Arbeit, die ich als Mitglied seiner Arbeitsgruppe im Deutschen Rheumaforschungszentrum anfertigen konnte. Danken möchte ich auch allen anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe *Autoimmunologie* für die Unterstützung und die anregenden Diskussionen.

Mein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe *Humorale Immunologie* und dabei besonders Rudi Manz, den ich jederzeit ansprechen konnte und der das Projekt, besonders durch kritische Diskussionen, befördert hat.

Vielen Dank auch den Teilnehmern des B-Zell-Clubs, darunter besonders Prof. Radbruch, von denen ich viel lernen konnte und die meine Arbeit ebenfalls durch kritische Diskussion verbessert haben.

Namentlich möchte ich Katrin, Gwendolin, Anette, Bimba, Imtiaz, Martin, Oliver, Velia und Philipp aus dem DRFZ danken.

Ausserdem danke ich Frau Prof. Spies von der Charite für das nachdrückliche Interesse an der Fertigstellung der Arbeit, was endlich zu einem Abschluss beigetragen hat.

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Selbständigkeitserklärung

Ich, Daniel Panne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema

**„Einwanderung von B-Lymphozyten und Plasmazellen in entzündetes Gewebe am Beispiel der murinen Lupusnephritis“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 16.05.2010