

# 7 Zusammenfassung

## 7.1 Expression und Regulation von CXCR3 und CXCR4 während der terminalen B-Zelldifferenzierung

B-Zellen können nach Antigenkontakt in sekundär lymphatischen Organen weiter zu Plasmazellvorläufern differenzieren. Ein Teil der entstandenen Plasmablasten kann später im Knochenmark oder entzündetem Gewebe akkumulieren. Bei der Maus spielt der Chemokinrezeptor CXCR4 eine wichtige Rolle bei der Akkumulation der Plasmablasten im Knochenmark. Die Liganden von CXCR3 werden in entzündetem Gewebe gebildet und können Plasmablasten dorthin dirigieren.

In dieser Arbeit wurde die Expression und Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 während der Ausdifferenzierung von humanen Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen sowie deren Expression auf B-Zellpopulationen verschiedener lymphatischer Organe analysiert. B-Zellen wurden über das Oberflächenmolekül CD19 definiert, Gedächtnis-B-Zellen konnten über die Expression von CD27 von den naiven B-Zellen abgegrenzt werden. Plasmablasten und Plasmazellen sind CD19(+)/CD38(++)/CD20(-). Es konnte durchflusszytometrisch in mehr als zehn Experimenten gezeigt werden, dass CXCR3 nicht von naiven B-Zellen, jedoch von einem Teil der Gedächtnis-B-Zellen exprimiert wird. CXCR4 wird von der Mehrheit aller B-Zellen des Bluts ausgeprägt. Eine genauere Analyse der CXCR3-ausprägenden Gedächtnis-B-Zellen ergab in mehr als zehn Experimenten verglichen mit z.B. IgG2 eine signifikante Assoziation der Co-Expression von CXCR3 mit IgG1 ( $p < 0,0001$ ), welche für CXCR4 nicht feststellbar war. In sieben Experimenten exprimierten die meisten Plasmablasten im Knochenmark CXCR4, während CXCR3 fast nur auf Plasmablasten in Blut von elf Spendern und entzündeten sekundär lymphatischen Organen - wie an acht Tonsillen und an der Schleimhaut des Darms von drei Proben getestet - ausgeprägt wird. Dieses Expressionsmuster lässt vermuten, dass beim Menschen CXCR4 bzw. CXCR3 ebenfalls am Homing in Knochenmark respektive entzündetes Gewebe beteiligt sind. Um die Regulation der CXCR3- bzw. CXCR4-Expression während der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu analysieren, wurden humane B-Zellen *in vitro* mit unterschiedlichen Methoden T-Zell-abhängig und T-Zell-unabhängig zu Plasmablasten stimuliert. Dazu wurden über magnetisch-assoziierte Zellsortierung B-Zellen zu >98 % aufgereinigt und in > 25 Experimenten mit der konstitutiv CD40L-exprimierenden T-Zelllinie EL4B5 für drei Tage in Anwesenheit von rekombinatem IL-2 und IL-10 co-kultiviert.

Anschließend wurden die EL4B5-Zellen entfernt und die B-Zellen für fünf weitere Tage mit IL-2 und IL-10 zu Zellen mit dem Plasmazellphänotyp CD38(++)/CD20(-) weiter stimuliert. Die Antikörpersekretion wurde im ELISpot-Assay überprüft. Die durchflusszytometrische Analyse der CXCR3- und CXCR4-Expression erfolgte am dritten und achten Tag der Kultur. Mit *Staphylococcus aureus* Cowan I und CpG 2006 konnten B-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und IL-10 T-Zell-unabhängig über den B-Zellrezeptor respektive Toll-like-receptor 9 zu Antikörper-sezernierenden Zellen aktiviert werden. Für die Analyse der Regulation von CXCR3 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten inflammatorische sowie Th1- und Th2-Zytokine zugefügt.

B-Zellen regulierten die Expression von CXCR3 hoch, wenn sie mit dem Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  während der ersten drei Tage der Aktivierung co-stimuliert wurden, dies konnte in acht Experimenten nach Aktivierung mit EL4B5-Zellen und in fünf Experimenten nach CpG-Stimulation gezeigt werden. *In vivo* befinden sich die B-Zellen während dieser frühen Phase der Aktivierung co-lokalisiert mit den T-Zellen innerhalb eines Lymphknotens. Mit der Zugabe des Th2-Zytokins IL-4 sowie mit verschiedenen inflammatorischen Interleukinen konnte die Expression von CXCR3 nicht beeinflusst werden. In sechs parallel durchgeführten Chemotaxis-Assays konnte gezeigt werden, dass mit der Zugabe von IFN- $\gamma$  in Assoziation mit der CXCR3-Expression auch die Frequenz der gegen den CXCR3 Liganden CXCL9 migrierenden Zellen signifikant anstieg ( $p < 0,0313$ ). Ist CXCR3 bereits auf den Gedächtnis-B-Zellen exprimiert, konnte in fünf Experimenten gezeigt werden, dass dieser Rezeptor unabhängig von der Co-Stimulation mit IFN- $\gamma$  auch auf späteren Differenzierungsstadien auf der Oberfläche nachweisbar bleibt.

Daraus lässt sich folgendes Modell der Plasmazellmigration ableiten. IFN- $\gamma$  bildende Th1-Zellen können die Expression von CXCR3 auf mit ihnen interagierenden B-Zellen induzieren, welche zu CXCR3-ausprägenden Plasmablasten differenzieren. Die im entzündeten Gewebe gebildeten Liganden von CXCR3 locken die entstandenen CXCR3-exprimierenden Plasmablasten an und führen zur im entzündeten Gewebe beschriebenen Akkumulation von Plasmablasten. Möglicherweise ist IFN- $\gamma$  auch an einem Klassenwechsel zu IgG1 beteiligt, eine genaue Zuordnung von Zytokinen zu bestimmten Antikörpersubklassen wie bei der Maus ist jedoch beim Menschen noch nicht bekannt. Das Homing von Plasmablasten ins Knochenmark ist ein T-Zell-abhängiges Geschehen. Da das Ausdifferenzieren von CXCR4(-)-B-Zellen aber in mehr als drei Experimenten unabhängig von der Art der Aktivierung mit dem Hochregulieren der Expression dieses Chemokinrezeptors verbunden war, ist die Expression von CXCR4 kein T-Zell-abhängiges Phänomen. Trotz der tragenden

Rolle von CXCR4 an der Akkumulation im Knochenmark, deuten diese Resultate darauf hin, dass das Akkulieren im Knochenmark nicht ausschließlich über die Expression von CXCR4 reguliert ist.

Während für die Expression von CXCR4 kein regulierender Faktor identifiziert werden konnte, wurde analysiert, dass die Induktion von CXCR3 präzise reguliert ist. Die Identifikation von IFN- $\gamma$  als induzierenden Faktor für CXCR3 und dessen korrespondierende Liganden führt zu einem besseren Verständnis der Akkumulation von Plasmablasten und Plasmazellen in chronisch entzündetem Gewebe. Langfristig könnte diese eventuell medikamentös inhibiert werden und so als Therapie von Autoimmunkrankheiten wie dem systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden.