

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin

**Grundlagen des Überlebens von Plasmazellen
im autoimmunen (NZBxNZW)F1 Mausmodell des
Systemischen Lupus Erythematodes**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katrin Moser
aus Bonn

im Februar 2008

1. Gutachter: PD Dr. Rudolf Manz

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 29.05.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Angeborene und adaptive Immunität	1
1.2	Lymphozyten und lymphatische Organe	2
1.2.1	T- und B-Lymphozyten	2
1.2.2	Grundstruktur lymphatischer Organe am Beispiel der Milz	3
1.3	Die humorale Immunantwort	4
1.3.1	Aufbau und Funktion der Antikörper	5
1.3.2	Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen	6
1.3.3	Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen	8
1.3.4	Das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische	11
1.4	Systemischer Lupus Erythematoses	13
1.4.1	Systemischer Lupus Erythematoses im Menschen	13
1.4.2	Das NZB/W Lupus-Mausmodell	15
1.4.3	Das Plasmazell-Kompartiment in NZB/W Mäusen	16
1.4.4	Therapien und experimentelle Therapieansätze	17
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Übersicht über die verwendeten Materialien	21
2.1.1	Puffer, Lösungen und Medien	21
2.1.2	Antikörper und Färbereagenzien für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz	22
2.1.3	Rekombinante Zytokine und Chemokine	23
2.1.4	ELISpot Reagenzien	23
2.1.5	Geräte	24
2.2	Mausstämme und Behandlungen	24
2.2.1	Verwendete Mausstämme	24
2.2.2	Zellproliferationsexperimente mittels BrdU-Einbau	25
2.2.3	Induktion der Megakaryopoese durch Behandlung von Mäusen mit Thrombopoietin	25
2.2.4	Behandlung von Mäusen mit depletierenden Antikörpern	26
2.2.5	Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C)	26
2.2.6	Behandlung von Mäusen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib	27

2.3	Präparation der Zellen	27
2.3.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen	27
2.3.2	Zellzahlbestimmung.....	28
2.4	Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen	28
2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	28
2.4.2	Oberflächenfärbungen.....	29
2.4.3	Intrazelluläre Färbungen.....	30
2.5	Isolierung und Kultivierung von Plasmazellen	31
2.5.1	Zellsortierung.....	31
2.5.1.1	Magnetische Zellsortierung	31
2.5.1.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	31
2.5.1.3	Isolierung von Plasmazellen durch Zellsortierung	32
2.5.2	Kultivierung von Plasmazellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen	33
2.6	Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen	34
2.6.1	Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode.....	34
2.6.2	Durchführung des ELISpots	35
2.7	Histologische Analyse von Gewebeschnitten	36
2.7.1	Anfertigung von Milzschnitten.....	36
2.7.2	Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten	36
2.7.3	Nachweis BrdU-markierter Zellen in Gewebeschnitten	37
2.7.4	Prinzip der konfokalen Mikroskopie	38
2.8	Graphische Darstellung und Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Das Plasmazell-Kompartiment verschiedener Mausstämm e	41
3.1.1	Anzahl der kurz- und langlebigen Plasmazellen in der Milz verschiedener Mausstämme	42
3.1.2	Anzahl der kurz- und langlebigen Plasmazellen im Knochenmark verschiedener Mausstämme	44
3.2	<i>In vitro</i> Studien zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit isolierter Plasmazellen	47
3.2.1	IL-6 vermitteltes Überleben isolierter Milz- und Knochenmarks- Plasmazellen in Kultur	47
3.2.2	IL-6 vermitteltes Überleben isolierter Knochenmarks-Plasmazellen verschiedener Mausstämme	49

3.3	Analyse des Plasmazell-Kompartiments von IL-6^{-/-} Mäusen	51
3.4	Analyse des Plasmazell-Kompartiments von FcγRIIb^{-/-} Mäusen	53
3.5	Verhältnis von kurz- und langlebigen Plasmazellen in Lymphknoten, Milz und Knochenmark von NZB/W Mäusen.....	55
3.6	Untersuchungen der Plasmazell-Umgebung in der Milz von NZB/W Mäusen	56
3.6.1	Lokalisation kurz- und langlebiger Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen	58
3.6.2	Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit VCAM-1(+) Zellen.....	59
3.6.3	Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit SDF-1α Signalen.....	60
3.7	Untersuchungen zur Rolle von Gr-1 positiven myeloiden Zellen für das Plasmazell-Überleben	62
3.7.1	Histologische Bestimmung der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit Gr-1 positiven myeloiden Zellen	62
3.7.2	Auswirkungen einer Depletion Gr-1 positiver myeloider Zellen auf das Plasmazell-Kompartiment.....	63
3.8	Untersuchungen zur Rolle von CD41 positiven Megakaryozyten für das Plasmazell-Überleben	64
3.8.1	Histologische Bestimmung der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit CD41 positiven Megakaryozyten	65
3.8.2	Bestimmung der Anzahl CD41 positiver Megakaryozyten in der Milz autoimmuner NZB/W und NZB Mäuse und nicht-autoimmuner BALB/c und C57BL/6 Mäuse	67
3.8.3	Untersuchung der Auswirkung einer Manipulation des Megakaryozyten-Kompartiments durch Injektion von TPO auf die Plasmazellen in BALB/c Mäusen.....	69
3.8.3.1	Auswirkungen der TPO-Injektionen auf das Kompartiment der CD41+ Megakaryozyten in der Milz.....	69
3.8.3.2	Auswirkungen der TPO-Injektion auf das Plasmazell-Kompartiment der Milz und des Knochenmarks	70
3.9	Ansätze zur Depletion von Plasmazellen	73
3.9.1	Versuche zur Eliminierung von Plasmablasten und Plasmazellen durch depletierende Antikörper	73
3.9.2	Versuche zur Eliminierung von Plasmazellen durch Störung der Homöostase der Knochenmarks-Zellen	74
3.9.3	Versuche zur Eliminierung von Plasmazellen in NZB/W Mäusen durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib	75

4	Diskussion	77
4.1	Einleitung	77
4.2	Diskussion der Methodik	78
4.2.1	Identifizierung von Plasmazellen	78
4.2.2	Identifizierung langlebiger Plasmazellen durch BrdU-Einbau-Experimente	79
4.2.3	Untersuchung des Beitrags Zell-autonomer Eigenschaften zum erhöhten Plasmazell-Überleben in NZB/W Milzen durch Kulturexperimente	80
4.2.4	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie zur Untersuchung von Zellen im Gewebeverband	81
4.2.5	Induktion der Megakaryopoese durch wiederholte TPO-Injektionen.	82
4.3	Diskussion der Ergebnisse	83
4.3.1	Die Ursachen für die erhöhte Anzahl langlebiger Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen liegen in den Genen des NZB-Elternstammes	83
4.3.2	Die Rolle von Zell-autonomen Faktoren für das verstärkte Überleben von Plasmazellen in der Milz	84
4.3.3	IL-6 ist kein essentieller Überlebensfaktor für langlebige Plasmazellen <i>in vivo</i>	86
4.3.4	Analyse des Plasmazell-Kompartiments von FcγRIIb ^{-/-} Mäusen	88
4.3.5	Die Milz, nicht aber die Lymphknoten von NZB/W Mäusen, weist Besonderheiten in der Stromalen Umgebung auf, die ein erhöhtes Plasmazell-Überleben ermöglichen	90
4.3.6	Lokalisation der Plasmazellen in NZB/W Milzen	91
4.3.7	Die Anzahl der Überlebensnischen in Milzen von NZB/W Mäusen ist nicht durch retikuläre, SDF-1 produzierende Stromazellen limitiert	91
4.3.8	Untersuchungen zur Rolle von Gr-1 positiven myeloiden Zellen für das Plasmazell-Überleben	93
4.3.9	Megakaryozyten als potentieller Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische in der Milz von NZB/W Mäusen	94
4.3.9.1	Der Anstieg der Megakaryozytenzahl in der Milz autoimmuner NZB/W und NZB Mäuse korreliert mit dem Anstieg langlebiger Plasmazellen	96
4.3.9.2	Die durch Injektion von TPO hervorgerufene Veränderung der Megakaryozytenhomöostase beeinflusst die Plasmazellhomöostase	97
4.3.10	Versuche zur Depletion von Plasmazellen in NZB/W Mäusen	99
4.3.11	Ausblick	101

5	Zusammenfassung/Summary	103
6	Referenzen	107
	Anhang	117

1 Einleitung

Das Immunsystem stellt einen komplexen Abwehrmechanismus dar, der dem Organismus zum Schutz gegen eine Vielzahl von Pathogenen und körperfremden Substanzen und zur Erkennung körpereigener, entarteter Zellen dient. Die Bestandteile des Immunsystems sind die lymphatischen Organe sowie verschiedene lymphatische Zellen, von denen ein großer Anteil permanent im Körper zirkuliert. Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Zellarten und Moleküle ist der Körper in der Lage, eine enorme Vielzahl an Krankheitserregern zu erkennen und diese zu bekämpfen.

1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Grundsätzlich werden zwei Arten der Immunität unterschieden: die angeborene und die erworbene, adaptive Immunität. Grundlage der angeborenen Immunität sind Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die in der Lage sind, Pathogene unspezifisch zu erkennen, aufzunehmen und zu eliminieren, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die adaptive Immunität hingegen zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und führt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Diese Immunantwort, die sich in eine zellvermittelte und eine humorale unterteilen lässt, wird von T- und B-Lymphozyten getragen. Jeder T- und B-Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche Rezeptoren, die jeweils lediglich ein Antigen hochspezifisch erkennen können. Nach Aktivierung der Zellen durch die Bindung des entsprechenden Antigens kommt es zur Expansion und Ausdifferenzierung in Effektorzellen, die in der Lage sind, das Pathogen zu bekämpfen. Nachdem es eliminiert ist, stirbt der Großteil der Zellen ab. Ein Teil überlebt jedoch in Form von Gedächtniszellen. Diese bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses, wodurch der

Körper in der Lage ist, bei erneutem Kontakt mit demselben Pathogen dieses rasch und effizient zu beseitigen.

1.2 Lymphozyten und lymphatische Organe

1.2.1 T- und B-Lymphozyten

Die T- und B-Lymphozyten bilden die Grundlagen der adaptiven Immunität höherer Wirbeltiere. Beide Zellarten haben die gemeinsame Eigenschaft, aufgrund der Ausprägung strukturell und funktionell sehr ähnlicher Rezeptoren hochspezifisch Antigen zu erkennen und auf dieses zu reagieren. Die hohe Antigen-Spezifität der Zellen beider Arten spiegelt sich in der immensen Menge von T- und B-Lymphozyten mit verschiedenen Rezeptorspezifitäten in der Peripherie wieder. Sie kommt durch die zufällige Zusammenlagerung verschiedener Gensegmente im Laufe der B- und T-Zell-Entwicklung („somatische Rekombination“) und daran anschließender, streng kontrollierter Selektionsprozesse zu Stande.

Die Hauptfunktion von T-Zellen liegt vereinfacht gesehen in der Produktion von Zytokinen. Diese löslichen Proteine spielen im Körper eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen. B-Zellen hingegen leisten letztendlich durch die Produktion Antigen-spezifischer Antikörper einen sehr wichtigen Beitrag zur humoralen Immunität. In der Peripherie finden sich neben den klassischen B-Zellen, den so genannten B2-Zellen, noch die B1-Zellen. Letztere kommen hauptsächlich in der Bauchhöhle vor, in der Milz ist die Population klein (ca. 5 % aller B-Zellen). In den Lymphknoten fehlen sie ganz. B1-Zellen bilden eine sich selbst erneuernde Population, die hauptsächlich auf Kohlenhydratantigene und nur schwach auf Proteinantigene reagiert. Die hervorgehenden Plasmazellen sezernieren meist Antikörper geringer Affinität der Klasse IgM. Den weit größeren Anteil der B-

Zellen in der Peripherie bilden die B2-Zellen. Zur Vereinfachung werden die B2-Zellen in dieser Arbeit als B-Zellen bezeichnet.

1.2.2 Grundstruktur lymphatischer Organe am Beispiel der Milz

Für eine effektive Bekämpfung von Krankheitserregern durch die Zellen des adaptiven Immunsystems müssen diese auf eine streng kontrollierte Weise zusammenarbeiten. Voraussetzung hierfür ist ein Zusammentreffen der beteiligten Zellarten nach Aktivierung durch Bestandteile des Pathogens. Dies ist im strukturierten Gewebe der sekundären lymphatischen Organe, also der Milz, der Lymphknoten und der mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (mucosa-associated lymphoid tissues, MALT) gegeben. In die Lymphknoten gelangen die Antigene über die Lymphgefäße. Der Milz werden Pathogene hingegen über das Blut zugeführt. Der Aufbau dieses Organs ist im Folgenden näher beschrieben und in Abb. 1 dargestellt. Einen guten Überblick bietet auch das Review von Mebius et al. (1). Umgeben ist die Milz von einer Kapsel aus straffem Bindegewebe. In der stark durchbluteten roten Pulpa wird das Blut des Körpers gefiltert, hier werden in erster Linie alte Blutkörperchen abgebaut. Entsprechend beinhaltet sie ein offenes Gefäßsystem und viele Makrophagen. Die rote Pulpa wird von Arealen lymphozytären Gewebes durchzogen, der so genannten weißen Pulpa. In diesen Regionen, die dem Aufbau der Lymphknoten vergleichbar sind, werden die Zentralarterien und deren Äste von einer T-Zellreichen Zone ummantelt, der so genannten PALS-Region (periarteriolar lymphoid sheath). Die B-Zellen sind in so genannten Follikeln lokalisiert (follikuläre B-Zellen), die entlang der PALS-Zone liegen. In ihnen werden auch die Keimzentren ausgebildet (siehe 1.3.2). In der Milz sind die T- und B-Zell-Zone von Blutgefäßen umgeben, die den Randsinus bilden. Daran schließt sich die aus wenigen Zellschichten aufgebaute Marginalzone. In ihr befinden sich neben speziellen B-Zellen (Marginalzonen B-Zellen) viele Makrophagen. In den Lymphknoten fehlen der Randsinus und die Marginalzone.

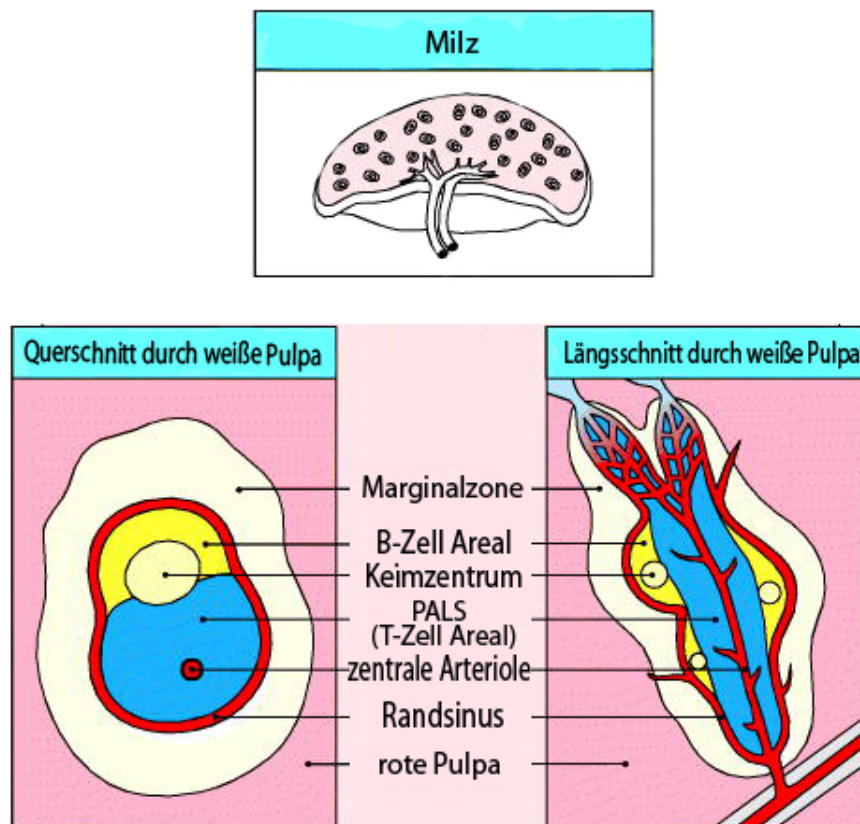


Abb 1: Schematischer Aufbau der Milz. Einzelheiten sind im Text erläutert. Modifiziert nach Janeway (2).

1.3 Die humorale Immunantwort

Neben der zellulären Immunität, die hauptsächlich intrazelluläre Erreger (Viren, bestimmte Bakterien und Protozoen) und entartete Zellen bekämpft, ist die humorale Immunantwort der adaptiven Immunität eine wichtige Komponente der spezifischen Abwehr. Sie spielt eine tragende Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen wie extrazellulären Bakterien und toxischen Produkten. Getragen wird die humorale Immunantwort von löslichen Proteinen, den als Antikörper bezeichneten Immunglobulinen (Ig). Dies sind die antigen-spezifischen Produkte terminal differenzierter B-Zellen, der Plasmazellen, und finden sich im Blutplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit. Im Folgenden sind Aufbau und Funktion

der Antikörper, ihre Entstehung und die Biologie der Antikörper-produzierenden Plasmazellen genauer beschrieben.

1.3.1 Aufbau und Funktion der Antikörper

Antikörper treten im Körper in zwei Formen auf: als membranständiger Rezeptor auf B-Zellen (B-Zell-Rezeptor) oder als lösliche Proteine, die die spezifische humorale Immunität vermitteln. Die biologische Funktion der löslichen Antikörper ist die Markierung von Pathogenen, wodurch diese für andere Bestandteile des Immunsystems erkennbar gemacht und so beseitigt werden können.

Antikörpermoleküle weisen eine Y-förmige Grundstruktur auf und bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten. Diese Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Es gibt zwei verschiedene Typen von leichten Ketten, die sich in ihrer Funktion allerdings nicht voneinander unterscheiden: kappa (κ) und lambda (λ). In der Maus beträgt das Verhältnis von κ zu λ 20:1, beim Menschen 2:1. Hingegen gibt es fünf Klassen von schweren Ketten, die die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls bestimmen (μ , γ , α , ϵ und δ). Entsprechend existieren fünf Klassen von Immunglobulinen: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Der durch die schweren Ketten determinierte Bereich des Antikörpermoleküls, der für die Effektormechanismen des Immunsystems zuständig ist, wird als konstante Region bezeichnet. Er liegt im so genannten Fc-Bereich und unterscheidet sich zwischen den Antikörperklassen. Den Bereich eines Antikörpermoleküls, der für das Erkennen und Binden des entsprechenden Antigens verantwortlich ist, bezeichnet man als variable Region. Da diese Region von den aminoterminalen Sequenzen der schweren und leichten Ketten gebildet wird und folglich auf beiden „Armen“ des Y-förmigen Moleküls vorhanden ist, hat jeder Antikörper zwei Antigenbindungsstellen. Sie unterscheiden sich zwischen verschiedenen Antikörpern und sind jeweils hochspezifisch für ein bestimmtes Antigen. Die Spezifität, mit der ein Antigen gebunden werden kann, kann durch

Punktmutationen in bestimmten Aminosäurebereichen, den hypervariablen Regionen der variablen Region, erhöht werden (Affinitätsreifung, siehe 1.3.2). Pathogene, auf deren Oberfläche Antikörper gebunden sind, sind dadurch für das Immunsystem sichtbar gemacht. Die Wirkung der gebundenen Antikörper beruht letztendlich darauf, Zellen und Moleküle der angeborenen Immunität zur Unterstützung der Abwehr hinzu zu ziehen. Dies kann direkt zur Neutralisation, also zur Vermeidung der Wechselwirkung zwischen Pathogen und Wirtszelle führen, was eine wichtige Rolle in der Abwehr von Viren und toxischen Substanzen z.B. von Bakterien spielt. Eine zweite Funktion gebundener Antikörper liegt in der Aktivierung phagozytischer Zellen (Makrophagen und Granulozyten), die das Antikörper-markierte Pathogen umfließen und verdauen (Opsonisierung). Dies erfolgt über den exponierten, klassenspezifischen Fc-Teil des gebundenen Antikörpers, der phagozytische Zellen aktiviert, die den entsprechenden Rezeptor ausprägen. Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung extrazellulärer, teilungsaktiver Bakterien. Eine dritte Funktion der Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems, eines speziellen Systems von Serumproteinen. Dies kann direkt die Lyse des Bakteriums zur Folge haben oder wiederum Phagozyten aktivieren.

1.3.2 Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen

Die B-Zellentwicklung findet im Knochenmark statt. Dort reift der B-Lymphozyt, ausgehend von einer hämatopoietischen Stammzelle, über verschiedene Zwischenstadien zur unreifen B-Zelle. Die unreife B-Zelle verlässt das Knochenmark und entwickelt sich in der Peripherie zur reifen, naiven B-Zelle weiter. In diesem Stadium trägt die Zelle membranständiges Immunglobulin einer einzigen Spezifität auf ihrer Oberfläche, den so genannten B-Zell Rezeptor. B-Zellen, die körpereigene Strukturen, so genannte Autoantigene erkennen, werden im Knochenmark und zusätzlich in der Peripherie eliminiert (3, 4).

Das Zusammentreffen der naiven B-Zelle und des entsprechenden Antigens findet in den in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen sekundären lymphatischen

Organen statt. Dort wird das lösliche Antigen von der B-Zelle aufgenommen und in seine Peptidbestandteile zerlegt („prozessiert“). Die Fragmente werden dann auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) Klasse II geladen und so auf der Zelloberfläche präsentiert. Zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle bedarf es weiterer Signale. Diese kommen im Falle der thymusabhängigen (TD-) Antigene von T-Helfer- (T_H -) Zellen, die auf das gleiche Antigen reagieren. Im Falle der thymusunabhängigen (TI-) Antigene stammen sie von mikrobiellen Bestandteilen. B-Zellen, die TD-Antigen aufgenommen haben, wandern innerhalb der lymphatischen Organe in den Grenzbereich zwischen B- und T-Zell-Zone. Ebenso wandern T-Zellen nach Antigenkontakt, der besonders an professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), hauptsächlich Dendritischen Zellen, zustande kommt, in diesen Bereich. Erkennt die T-Zelle das Antigen, das auf dem MHCII-Komplex auf der entsprechenden B-Zelle präsentiert wird, kommt es dadurch und durch weitere ko-stimulatorische Signale, z.B. durch Interaktion der Oberflächenmoleküle CD40-Ligand (CD40L) auf der T-Zelle und CD40 auf der B-Zelle, zur Aktivierung der beiden Lymphozytenarten. In der Folge sezerniert die T-Zelle verschiedene Zytokine, im Falle der T_H2 -Zellen hauptsächlich Interleukin (IL)-4, im Falle der T_H1 -Zellen hauptsächlich Interferon (IFN)- γ . Die aktivierte B-Zelle reagiert mit Proliferation („klonale Expansion“) und differenziert zum Antikörperproduzierenden Plasmablasten und schließlich zur reifen Plasmazelle aus. Abhängig von der Art der Aktivierung und dem Zytokinmilieu kann es zum Klassenwechsel des Antikörpers kommen. Ein Teil der B-Zellen kann zusätzlich einen anderen Differenzierungsweg einschlagen und in die so genannte Keimzentrumsreaktion einbezogen werden. In dieser Reaktion, die mit Phasen starker Proliferation einhergeht, kommt es zur Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors. Dies erfolgt durch den Prozess der somatischen Hypermutation, in der Punktmutationen im Bereich der Antigenbindungsstellen eingeführt werden. B-Zellen, deren Affinität zum Antigen dadurch gesteigert wird, werden positiv selektiert. Aus einer Keimzentrumsreaktion gehen schließlich solche B-Zellen hervor, die zu B-Gedächtniszellen oder direkt zu Plasmazellen ausdifferenzieren.

B-Gedächtniszellen haben die Eigenschaft, bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen sehr rasch und effizient aktiviert zu werden und in Plasmazellen auszureifen. Diese Plasmazellen und solche, die direkt in Folge von Keimzentrumsreaktionen gebildet werden, produzieren meist hoch affine Antikörper der Klassen IgG und IgA. Plasmazellen aus Keimzentrumsreaktionen können eine sehr lange Lebensdauer von vielen Monaten bis mehreren Jahren aufweisen (siehe Abschnitt 1.3.3).

Neben der hier beschriebenen Aktivierung der B-Zellen durch TD-Antigene können B-Zellen auch durch TI-Antigene stimuliert werden. Bei diesen Antigenen handelt es sich um bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide, die die B-Zellen polyklonal stimulieren. Viele der Plasmazellen, die aus einer solchen Reaktion hervorgehen, sezernieren Antikörper der Klasse IgM oder IgG1 mit einer geringen Affinität. Nur wenige werden langlebig (5, 6). Ein immunologisches Gedächtnis in Form von Gedächtnis-B-Zellen wird nicht ausgebildet (7).

Der Differenzierungsprozess von der B-Zelle zur Plasmazelle geht mit morphologischen Veränderungen der Zelle einher. Entsprechend der Aufgabe der Plasmazelle, große Mengen löslichen Antikörpers zu sezernieren (bis zu 10^4 Moleküle pro Sekunde), wird die Zelle größer (10-15 μm). Ein Hauptteil des Volumens wird durch das endoplasmatische Retikulum eingenommen. Der Kern wird an den Rand gedrängt und die Zelle hat eine ovale Form. Außerdem werden verschiedene Oberflächenmoleküle wie der B-Zell-Rezeptor, MHCII und der B-Zell-Marker B220 herunterreguliert, das Proteoglykan Syndekan-1 (CD138) erscheint auf der Oberfläche (8).

1.3.3 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen

Plasmazellen, die in der Milz in Folge einer Primärantwort gegen ein TD-Antigen entstehen, sind in diesem Organ einige Tage nach der Immunisierung nachweisbar. Sie finden sich in der roten Pulpa der Milz und sterben *in situ* innerhalb weniger Tage durch Apoptose, den programmierten Zelltod (6). Im

Knochenmark können nach einer Primärimmunisierung von Mäusen nur sehr wenige spezifische Plasmazellen nachgewiesen werden. Wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, spielt bei der Regulation der Apoptose der frühen Plasmazellen, die Antikörper mit geringer Affinität gegen das Antigen produzieren, der pro-apoptotische Faktor Bim („BH3-only“ Protein) eine wichtige Rolle: nach Immunisierung von Bim^{-/-} Mäusen mit dem TD-Modellantigen NP-KLH überlebten ungewöhnlich viele der frühen Plasmazellen in der Milz, während die Anzahl der Plasmazellen, die affinitätsgereifte Antikörper sezernieren, im Knochenmark normal war (9).

Im Gegensatz zur Primärantwort erreicht die Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen nach einer Sekundärantwort in der Milz etwas früher ein Maximum und sinkt rasch wieder ab. Im Knochenmark erreicht die Anzahl spezifischer Plasmazellen etwa an Tag 6-7 das Maximum und sinkt dann wieder ab, bis etwa nach 14 Tagen ein stabiles Plateau erreicht ist (5, 10). Während folglich ein großer Teil der Plasmazellen am Ort der Entstehung abstirbt, gelangt ein anderer Teil in das Knochenmark. Auch hier sterben die meisten Plasmazellen ab, im Falle des TD-Antigens Ovalbumin 80 - 90 % der spezifischen Plasmazellen (11). Dennoch ist auch 120 Tage nach Immunisierung eine stabile Population antigenspezifischer Plasmazellen zu finden. Sie sind nicht teilungsaktiv und haben eine Halbwertszeit von mehreren Monaten (12). Entsprechend sind sie resistent gegenüber Röntgenstrahlung (13). Da diese als langlebig bezeichneten Plasmazellen Antigen-unabhängig persistierende Antikörper-Titer produzieren, bilden sie einen Teil des immunologischen Gedächtnisses (10, 14).

Die Wanderung von Plasmablasten innerhalb eines Organismus erfolgt durch die Anziehung der Zellen durch chemotaktisch aktive Zytokine, die so genannten Chemokine. Diese werden gewebespezifisch gebildet. Zellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen, können aktiv entlang eines Gradienten zu den Orten höchster Konzentration wandern. Plasmablasten, nicht aber reife Plasmazellen, besitzen die Fähigkeit zur Migration. Wie die Einwanderung der Vorläufer langlebiger Plasmazellen in das Knochenmark erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber sicher, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR4 und

der entsprechende Ligand SDF-1 (stromal cell-derived factor 1, CXCL12) eine wichtige Rolle spielt (15). In genetisch veränderten Mäusen, die in der gesamten B-Zell-Linie kein CXCR4 auf der Oberfläche ausprägen, ist die Akkumulation Antigen-spezifischer Plasmazellen im Knochenmark nach Immunisierung stark verlangsamt (16).

Auch im Menschen ist das Knochenmark der Ort, an dem Plasmazellen akkumulieren und persistierende protektive Antikörper bilden (17). Die Frequenz der Plasmazellen beträgt 0,1 – 1 % der totalen Knochenmarkszellen (18). Aufgrund mangelnder Nachweismethoden konnte die Existenz langlebiger Plasmazellen im Menschen noch nicht direkt gezeigt werden. Aber auch hier können z.B. nach Auffrischimpfung mit einem Lebendimpfstoff gegen Masern oder Polio oder mit nicht-replizierenden Antigenen wie Tetanus- und Diphtherietoxin noch Jahre später protektive spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die vermutlich von langlebigen Plasmazellen im Knochenmark gebildet werden (17, 19).

Ein großer Anteil der Plasmazellen in einem Organismus wird in mukosalen Immunantworten gebildet. Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt entsprechend in den Peyerschen Plaques des Dünndarms oder den mesenterialen Lymphknoten. Die hervorgehenden Plasmablasten, die zumeist Antikörper der Klasse IgA produzieren, können die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 ausprägen (20-22). Somit können diese Plasmablasten zurück in den Dünndarm und die Lamina propria des Darms wandern, in denen die entsprechenden Liganden CCL25 (thymus-expressed chemokine, TECK) bzw. CCL28 (mucosa-associated epithelial chemokine, MEC) gebildet werden. Ob in diesen Geweben auch Überlebensnischen für langlebige Plasmazellen existieren, ist nicht bekannt.

Darüber hinaus können Plasmazellen in entzündeten Geweben gefunden werden (11, 23). Im Falle einer Infektion tragen die Zellen so durch die Produktion spezifischer Antikörper vor Ort effektiv zur Bekämpfung des Pathogens bei. Auch in Erkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis sind Plasmazellen im Synovium der entzündeten Gelenke nachweisbar (24). Während sie in diesem Fall vermutlich sogar vor Ort gebildet werden, werden die Plasmablasten im Fall

einer Infektion in den sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten gebildet und wandern aktiv in das entzündete Gewebe ein. Hier werden die entzündlichen Chemokine CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) gebildet (25). Plasmablasten, die den entsprechenden Rezeptor CXCR3 tragen, sind in der Lage, in Richtung dieser Faktoren zu wandern (15). Die Ausprägung von CXCR3 kann *in vitro* auf Plasmablasten induziert werden, wenn B-Zellen in Gegenwart des entzündlichen Zytokins IFN- γ aktiviert werden (26). Plasmablasten, die CXCR3 auf der Oberfläche ausprägen, werden demnach entlang eines Konzentrationsgradienten der Liganden CXCL9, 10 und 11 in entzündetes Gewebe gelockt.

1.3.4 Das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische

Im Knochenmark können Plasmazellen Monate und Jahre überleben ohne zu proliferieren. Nimmt man diese Zellen hingegen in Kultur, so sterben sie innerhalb von 2 bis 3 Tagen ab. Durch Zugabe verschiedener Faktoren wie IL-6, IL-5, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , SDF-1 und den BCMA- (B cell maturation antigen) Liganden BAFF (B cell-activating factor) und APRIL (a proliferation-inducing ligand) kann ein Teil der Zellen wenigstens für einen Zeitraum von ca. 5 bis 7 Tagen am Leben gehalten werden, wobei die besten Überlebensraten durch synergistische Effekte der verschiedenen Überlebensfaktoren erzielt wurden (27, 28). Entsprechend scheinen Plasmazellen auf Faktoren aus ihrer unmittelbaren Umgebung angewiesen zu sein. Es existiert daher die Idee, dass Plasmazellen zum Überleben ein besonderes Milieu benötigen, welches sie in der so genannten Plasmazell-Überlebensnische finden (11, 29-31). Das Konzept der Überlebensnische für einen spezifischen Zelltyp bzw. Nischen für bestimmte Entwicklungsstufen ist bereits für andere Zellarten beschrieben und basiert darauf, dass verschiedene Zellen in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ein jeweils spezifisches Zytokinmilieu benötigen (30). Entsprechend werden die Nischen von einer oder mehreren Zellen gebildet, die die notwendigen Faktoren produzieren und relevante Adhäsionsmoleküle ausprägen.

Das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische liegt dieser Arbeit zu Grunde. Über den genauen Aufbau dieser Nische im Knochenmark ist bisher nur wenig bekannt. Es ist aber wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der oben aufgeführten Plasmazell-Überlebensfaktoren auch *in vivo* eine Rolle spielt. Wie Tokoyoda et al. zeigen konnte, haben mehr als 90 % der IgG(+) Plasmazellen in der Maus Kontakt zu VCAM-1(+) Stromalen Zellen, die SDF-1 produzieren (32). Plasmazellen prägen das Integrin VLA-4 (very late antigen, $\alpha_4\beta_1$) aus, den Liganden für VCAM-1 (CD106) (33). In Kulturexperimenten, in denen das Überleben von Plasmazellen durch Ko-Kultur mit Stromalen Knochenmarkszellen verlängert werden konnte, führte die Gegenwart eines blockierenden anti-VLA-4-Antikörpers zu einer Reduktion der gemessenen Antikörpertiter im Kultur-Überstand (28). Außerdem gibt es Hinweise, dass die BCMA-Liganden BAFF und/oder APRIL essentielle Bestandteile einer bestimmten Plasmazell-Entwicklungsnische oder aber der Überlebensnische *in vivo* sind. So konnte gezeigt werden, dass BCMA^{-/-} Mäuse nach Immunisierung mit dem TD-Antigen NP-CGG in den ersten 14 Tagen eine normale spezifische IgM- und IgG-Antikörperantwort aufbauen, dass die Anzahl NP-spezifischer Plasmazellen hingegen 6 – 8 Wochen nach Immunisierung mehr als 5-fach geringer ist als in den Kontrolltieren. Im Gegensatz zum anderen gemeinsamen Rezeptor für BAFF und APRIL, TACI (transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor), und dem BAFF-Rezeptor (BAFF-R), der ausschließlich BAFF bindet, ist die Expression von BCMA auf Plasmazellen erhöht (34).

Ein weiterer Hinweis für die Existenz spezieller Plasmazell-Überlebensnischen ist die Tatsache, dass die Anzahl von Plasmazellen im Knochenmark streng limitiert ist. In gesunden Menschen beträgt die Plasmazell-Population unabhängig vom Alter maximal 1 % aller Knochenmarkszellen. Der Organismus ist allerdings regelmäßig Pathogenen aus der Umwelt ausgesetzt, die auch immer wieder solche Immunreaktionen auslösen, die zur Bildung langlebiger Plasmazellen führen (35). Geht man vom Konzept der Plasmazell-Überlebensnische aus, so bedeutet das, dass frisch ins Knochenmark eingewanderte Plasmablasten mit den alten, bereits bestehenden langlebigen Plasmazellen um diese

Überlebensnischen konkurrieren (11, 35, 36). Für ein entsprechendes Konzept gibt es Hinweise: wie Odendahl et al. zeigen konnte, können im Blut 6 - 7 Tage nach einer Tetanus-Auffrischimpfung Tetanus-spezifische, HLA-DR(+) Plasmablasten und gleichzeitig nicht-Tetanusspezifische Plasmazellen gefunden werden, die HLA-DR(-) sind (37). Letztere sind vermutlich Knochenmarks-Plasmazellen, die von den Tetanus-spezifischen, frisch eingewanderten Plasmablasten aus ihren Überlebensnischen verdrängt wurden (11, 37). Die genauen Mechanismen, die zur Verdrängung alter Plasmazellen führen, sind unklar.

Überlebensnischen für Plasmazellen finden sich auch in entzündeten Geweben. Viele der bisher bekannten Überlebensfaktoren zählen zu den entzündlichen Zytokinen und werden dort produziert, z.B. IL-6 und TNF- α (27). Im Falle einer Infektion sterben die Plasmazellen durch Apoptose ab, sobald die Entzündung bekämpft ist und lokal keine der genannten Faktoren mehr produziert werden (11). In chronisch entzündetem Gewebe könnten diese Plasmazell-Überlebensnischen entsprechend sehr stabil sein. Ob sich auch in anderen Geweben, z.B. in der Darm-assoziierten Mukosa, Nischen für langlebige Plasmazellen befinden ist nicht bekannt.

1.4 Systemischer Lupus Erythematoses

1.4.1 Systemischer Lupus Erythematoses im Menschen

Plasmazellen spielen durch die Produktion protektiver Antikörper eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen, können aber durch die Bildung von Autoantikörpern an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein. Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) gilt als ein Prototyp einer solchen systemischen Autoimmunerkrankung. Das Hauptcharakteristikum der Krankheit ist das Auftreten verschiedener Autoantikörper, die mehrheitlich gegen

Bestandteile des Zellkerns wie doppelsträngige (ds) DNS oder Histon-Bestandteile gerichtet sind (38, 39). Diese Autoantikörper führen direkt oder in Form von abgelagerten Immunkomplexen zu Gewebeschädigungen und tragen daher entscheidend zur Ausprägung eines großen Teiles der klinischen Manifestationen wie Glomerulonephritis, Vaskulitis und einer Beteiligung des zentralen Nervensystems bei (40). Insbesondere die schwere Nephritis war vor der Entwicklung geeigneter Medikamente häufig letal. Die Krankheit, die zu den Kollagenosen gezählt wird, betrifft hauptsächlich junge Frauen (Krankheitsbeginn meist zwischen dem 25.-35. Lebensjahr) und tritt in Mitteleuropa mit einer Prävalenz von 20 unter 100 000 Einwohnern auf (41-43). Die schubweise auftretende Erkrankung ist die Folge einer Vielzahl von Ereignissen, die letztendlich zu einem Toleranzbruch gegen Selbst-Antigene führen. Beteiligt sind verschiedene Komponenten des Immunsystems, u.a. autoreaktive B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und somit Clearance-Defekte von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen sowie Veränderungen im Komplementsystem (44-48). Dem SLE liegt ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen Defekten und Umwelteinflüssen zugrunde. Als Auslöser von Krankheitsschüben sind z.B. Infektionen oder physikalische und chemische Faktoren wie ultraviolettes Licht oder bestimmte Medikamente bekannt. Ebenso spielen Hormone eine wichtige Rolle (49).

Die Rolle von B-Zellen im SLE ist vielfältig. Aufgrund der erhöhten Ausprägung ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40-Ligand und verstärktem B-Zell-Rezeptor Signalling ist die Aktivierungsschwelle der B-Zellen herabgesetzt (50, 51). Die Folge ist eine erhöhte Anzahl aktivierter B-Zellen. Entsprechend kann im Blut von Lupuspatienten insbesondere während eines Krankheitsschubes eine deutliche Population zirkulierender Plasmablasten gefunden werden (52, 53). Die Hypersensitivität bei gleichzeitigem Toleranzbruch führt zu der oben erwähnten Bildung autoreaktiver Plasmablasten und Plasmazellen (54). Das Auftreten einiger autoreaktiver Antikörper wie z.B. anti-dsDNS Antikörper im Serum der Patienten gilt als diagnostisches Kriterium, ihr Titer korreliert häufig mit der Krankheitsaktivität (55). Unabhängig von der

Antikörperproduktion tragen B-Zellen aber zusätzlich über andere Mechanismen zur Lupus-Erkrankung bei. So entwickeln Mäuse des MRL/lpr Lupus-Modells auch dann eine Nephritis (wenngleich mit milderem Verlauf) mit zellulären Infiltraten in der Niere, wenn ihre B-Zellen derart verändert sind, dass sie keine löslichen Antikörper bilden können (56). Die Rolle der B-Zellen liegt hier vermutlich in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zelle und somit in der Aktivierung der T-Lymphozyten, unter Umständen auch durch die Produktion von Zytokinen (56-58). In totaler Abwesenheit von B-Zellen treten im MRL/lpr Mausmodell keinerlei Krankheitsmanifestationen auf (59).

1.4.2 Das NZB/W Lupus-Mausmodell

Die erste Generation aus der Kreuzung zwischen New Zealand Black (NZB) und New Zealand White (NZW) Mäusen, die so genannten (NZBxNZW)F1 (NZB/W) Mäuse, entwickelt spontan eine Autoimmunerkrankung, die dem humanem SLE sehr ähnlich ist. Bereits in jungen Tieren sind die gesamt-Serum-Antikörpertiter erhöht. Ab einem Alter von etwa 5 Monaten treten verschiedene Autoantikörper auf, z.B. gegen dsDNS. Die Krankheit, die sich insbesondere in einer fatalen Glomerulonephritis äußert, tritt in Weibchen im Alter von 5 – 7 Monaten und somit früher auf als in Männchen und zeigt stärkere Verlaufsformen. Daher wird in den meisten Studien und auch in dieser Arbeit mit Weibchen gearbeitet. Zu den genetischen Grundlagen der Erkrankung der NZB/W Mäusen tragen beide Elternstämme bei. NZW Mäuse erscheinen phänotypisch gesund und bilden lediglich spontan Autoantikörper, die in älteren Tieren (> 12 Monate) zu einem sehr milden autoimmunen Phänotyp führen können (60). In NZB Mäuse hingegen sind Autoantikörper nachweisbar. Hier spielen insbesondere Antikörper gegen rote Blutkörperchen, so genannte Coombs Antikörper, eine wichtige Rolle. Entsprechend entwickeln ältere Tiere eine hämolytische Anämie (61). In NZB Mäusen sind die B-Zellen hyperreaktiv und die Serum-Antikörperlevel erhöht (62). Die Analyse der genetischen Besonderheiten, die an der Lupus-Erkrankung beteiligt sind, und deren Zuordnung zu den Elternstämmen ist nach wie vor

Gegenstand intensiver Untersuchungen (63). Sie betreffen sowohl die Regulation des B- als auch des T-Zell-Kompartiments und des Komplementsystems (44).

1.4.3 Das Plasmazell-Kompartiment in NZB/W Mäusen

Die Todesursache bei NZB/W Mäusen ist meist eine terminale Niereninsuffizienz als direkte Folge der Glomerulonephritis (61). Diese ist auf die Ablagerung von Immunkomplexen und den daraus resultierenden Entzündungsreaktionen zurückzuführen. Schon junge Tiere haben erhöhte Serum-Antikörpertiter, entsprechend können ungewöhnlich viele Antikörper-sezernierende Zellen in der Milz gefunden werden (64). Zusätzlich finden sich in kranken Tieren auch in den Nieren viele Plasmazellen, während sich ihre Anzahl im Knochenmark nicht signifikant von nicht-autoimmunen Tieren unterscheidet (23). Obwohl die lokale Entstehung von Plasmablasten und -zellen in entzündeten Geweben beschrieben ist, wandern sie im Falle der NZB/W Mäuse vermutlich aus den sekundären lymphatischen Organen in die Nieren ein (24). Nach einer Sekundär-Immunsierung mit dem TD-Antigen Ovalbumin sind Plasmazellen, die spezifische Antikörper sezernieren, in den Nieren nachweisbar (23). Bei der Einwanderung der Plasmablasten in die entzündeten Nieren spielt vermutlich der Chemokinrezeptor CXCR3 eine Rolle, der von 40 % der Plasmablasten in der Milz und von 60 % dieser Zellen in der entzündeten Niere ausgeprägt wird (Panne et al, Manuskript in Revision).

In nicht-autoimmunen Individuen finden sich langlebige Plasmazellen hauptsächlich im Knochenmark, in der Milz dagegen nur in geringer Anzahl. Wie Hoyer et al durch BrdU-Einbau-Experimente zeigen konnte, ist das in den autoimmunen NZB/W Mäusen anders: hier besteht das Plasmazell-Kompartiment der Milz erstaunlicherweise zu etwa 35 % aus langlebigen Plasmazellen (65). Unter den langlebigen, also nicht-teilungsaktiven Plasmazellen, deren Halbwertszeit mehrere Monate beträgt, finden sich auch solche, die anti-dsDNS-Antikörper sezernieren. Das Kompartiment der langlebigen Plasmazellen ist bereits in 3 Monate alten Mäusen, also vor

Ausbruch der Nephritis, stabil. Die Mehrheit dieser Plasmazellen produziert Antikörper des Isotyps IgM. Ob die (Auto-)Antikörperproduktion durch langlebige Plasmazellen bei der Pathogenese der Lupus-Erkrankung tatsächlich eine Rolle spielt, ist noch unklar, wenn auch wahrscheinlich.

1.4.4 Therapien und experimentelle Therapieansätze

Die meisten der heute angewandten Therapieformen zur Behandlung des humanen SLE verfolgen die Strategie, mehr oder minder unselektiv das Immunsystem zu unterdrücken. Hierfür werden insbesondere bei schweren Krankheitsverläufen Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid verabreicht, die effektiv teilungsaktive Zellen abtöten und somit die entzündliche Immunreaktion unterbinden (66). Ein neuerer Ansatz verfolgt die Strategie, bestimmte Zellpopulationen gezielt durch Injektion monoklonaler Antikörper oder Fusionsproteine zu eliminieren, oder die Funktion ko-stimulatorischer Moleküle und Zytokine zu blockieren (67). So zeigt in einigen Patienten die Verabreichung des B-Lymphozyten depletierenden anti-CD20-Antikörpers Rituximab allein oder in Kombination mit Cyclophosphamid oder Corticosteroiden gute Erfolge (68-70). Ebenso können bei manchen Patienten mit einem Antikörper gegen das auf aktivierten T-Lymphozyten ausgeprägte ko-stimulatorische Molekül CD154 (CD40L) deutliche Krankheitsverbesserungen erreicht werden (71, 72). Dennoch haben die genannten Therapien alle gemeinsam, dass sie zwar einen akuten Schub unterbrechen, nicht aber die chronische Erkrankung beseitigen können. Bestimmte Autoantikörpertiter bleiben oftmals auch unter Therapie nachweisbar (68, 73). Die therapieresistenten Autoantikörper können bei der Pathogenese des Lupus eine wichtige Rolle spielen, da sie unter Umständen in der Lage sind, durch die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen einen erneuten Krankheitsschub hervorzurufen.

Wie unter 1.3.3 beschrieben, sind Gedächtnis-Plasmazellen langlebige Zellen ohne Teilungsaktivität. Wenigstens in NZB/W Mäusen konnten auch autoreaktive langlebige Plasmazellen nachgewiesen werden. Daher werden diese

Plasmazellen nicht oder nur in geringem Ausmaß durch die Verabreichung zytostatischer Substanzen beseitigt (65). Auf humanen reifen Plasmazellen wird das Oberflächenmolekül CD20 nicht ausgeprägt, entsprechend wirkt Rituximab auf diesen Zellen vermutlich nicht (74). Eine Therapie, die auch langlebige Plasmazellen effektiv eliminiert, ist noch nicht entwickelt. Insgesamt sprechen Patienten unterschiedlich gut auf die verschiedenen Therapien an und in einigen greift keine der besprochenen Medikationen. In derartigen Krankheitsfällen konnten zu Teil durch eine autologe Stammzelltherapie Erfolge erzielt werden, manche Patienten befinden sich auch mehrere Jahre später noch in Remission (75).

In Lupus-Mausmodellen wurde schon eine Vielzahl weiterer Therapieansätze erprobt. So erbrachte die Behandlung von NZB/W Mäusen mit bestehender Nephritis mit einem CTLA4-Ig-Fusionsprotein zur Unterbindung der Interaktion zwischen aktivierter APC und T-Zelle in Kombination mit Cyclophosphamid gute Erfolge (76). Insbesondere in Kombination mit einem anderen Fusionsprotein, TACI-Ig, konnte der Krankheitsausbruch in NZB/W deutlich verzögert werden (77). TACI ist neben BAFF-R und BCMA einer der drei Rezeptoren für BAFF und APRIL, zwei Zytokine, die für die Entwicklung und das Überleben der B-Zellen und Plasmazellen wichtig sind (78). Entsprechend führt die Neutralisation dieser letztgenannten Faktoren durch TACI-Ig zu einer Reduktion verschiedener B-Zell Populationen (77). Ähnliche Resultate wurden auch nach Behandlung von NZB/W Mäusen mit BAFF-R-Ig oder einem anti-BAFF-Antikörper erzielt (79, 80). Der Ausbruch der Erkrankung von NZB/W Mäusen konnte des Weiteren durch die Injektion von Antikörpern gegen die Zytokine IL-6, SDF-1 α und IL-10R verzögert und eine bestehende Nephritis abgemildert werden (81, 82). All die hier erwähnten therapeutischen Ansätze können zusammenfassend den Krankheitsausbruch verzögern oder verhindern, wenn die Behandlung in jungen Tieren begonnen wird. Bei einer bereits bestehenden Nephritis führen sie zwar zu Verbesserungen, manche Autoantikörper bleiben aber, vergleichbar zur Situation einiger Lupuspatienten unter Medikation, weiterhin nachweisbar. Diese therapieresistenten Autoantikörper können für die Pathogenese des Lupus eine

wichtige Rolle spielen, da sie in der Lage sind, über die bereits beschriebenen Mechanismen einen erneuten Krankheitsschub hervorrufen.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Autoantikörper spielen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, z.B. beim SLE. Im NZB/W Mausmodell dieser Erkrankung wurde kürzlich gezeigt, dass Autoantikörper von kurzlebigen und langlebigen Plasmazellen produziert werden. Nur langlebige Plasmazellen sind jedoch resistent gegenüber immunsuppressiver Therapie, so dass angenommen wird, dass diese Zellen für die in Patienten beobachteten Therapie-resistenten Autoantikörpertiter verantwortlich sind. Langlebige Plasmazellen stellen demnach einen neuen, interessanten Angriffspunkt dar für die Entwicklung einer effektiveren und nachhaltigen Therapie zur Behandlung von SLE und anderen Antikörper-vermittelten Autoimmunkrankheiten. Über die Biologie der langlebigen Plasmazellen ist bisher wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war, die Ursache der hohen Anzahl langlebiger Plasmazellen im autoimmunen NZB/W Mausmodell zu untersuchen und Möglichkeiten zur therapeutischen Depletion dieser Zellen zu testen.

2 *Material und Methoden*

2.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄	Roth, D Sigma-Aldrich, D Sigma-Aldrich, D
PBS mit bovinem Serum Albumin (PBS/BSA)	PBS 0,5 % BSA	Biomol, D
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640	Life Technologies, GB
RPMI Plus	RPMI 10 mM L-Glutamat 10 % fetales Kälberserum 20 µM β-Mercaptoethanol 100 U/l Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, USA Invitrogen, USA Invitrogen, USA Invitrogen, USA Invitrogen, USA
ELISpot Blockierungspuffer	PBS 3 % BSA	Biomol, D
ELISpot Waschpuffer	PBS 3 % BSA 0,01 % Tween	Biomol, D Sigma-Aldrich, D
ELISpot AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) 0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl ₂ 900 ml H ₂ O	Sigma-Aldrich, D Sigma-Aldrich, D Sigma-Aldrich, D

	pH 10,25	
Saponin-Färbepuffer	PBS 0,2 % BSA 0,5 % Saponin	Biomol, D Sigma-Aldrich, D
Saponin-Waschpuffer	PBS 0,2 % BSA 0,1 % Saponin	Biomol, D Sigma-Aldrich, D

2.1.2 Antikörper und Färbereagenzien für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
B220	RA3.6B2	Cy5, FITC	DRFZ, D
BrdU	3D4	FITC, Cy5	BD Pharmingen, D
CD138	281-2	Pe, Cy5	BD Pharmingen, D
CD41	MWReg30	Bio	Serotec, D
Fc γ R (CD32/CD16)	2.4G2		DRFZ, D
Gr-1	RB6-8C5	Bio	DRFZ, D
κ -leichte Kette	187.1	FITC, Cy5	BD Pharmingen, D
λ -leichte Kette	JC5-1	FITC, Cy5	BD Pharmingen, D
MHCII	M5/114	Bio	DRFZ, D
SDF-1	MAB350	Bio	R&D Systems, USA
CD106 (VCAM-1)	429	Bio	BD Pharmingen, D
PNA		Bio, FITC	Vector Laboratories, USA
SA		Alexa 546	Molecular Probes, USA
SA		PerCP	BD Pharmingen, D
DAPI			Molekular Probes, USA

2.1.3 Rekombinante Zytokine und Chemokine

Bezeichnung	Herkunft
rekombinantes BAFF	Alexis Biochemicals, USA
rekombinantes IL-6	R&D Systems, USA
rekombinantes megaAPRIL	Alexis Biochemicals, USA
rekombinantes SDF-1 α	R&D Systems, USA
rekombinantes TNF- α	R&D Systems, USA
rekombinantes TPO	Perprotech, D

2.1.4 ELISpot Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
<i>Beschichtungs-Antikörper</i>	
Ziege-Anti-Maus IgM (polyklonal)	Southern Biotech, USA
Ziege-Anti-Maus IgG (polyklonal)	Southern Biotech, USA
<i>Detektions-Antikörper</i>	
Ziege-Anti-Maus IgM-bio (polyklonal)	Southern Biotech, USA
Ziege-Anti-Maus IgG-bio (polyklonal)	Southern Biotech, USA
<i>Sekundärreagenz</i>	
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (SA-AP)	Roche, D
<i>Substrat</i>	
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, D
<i>Trägersubstanz für das Substrat</i>	
Agarose (Typ I, geringe Elektroosmose)	Sigma-Aldrich, D

2.1.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus, D
Invertmikroskop Olympus, CK 30	Olympus, D
konfokales Laser-Scanning Mikroskop, LSM DM IRE2	Leica Microsystems, D
Kryostat Microm HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, D
Sterile Werkbank HERA safe	Heraeus, D
Durchflusszytometer FACS LSR II	BD, D
Zellsorter FACS Diva	BD, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, D
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, D
Zellzählgerät Casy DT	Schärfe Systems, D

2.2 Mausstämme und Behandlungen

2.2.1 Verwendete Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse der Stämme NZB, NZW, NZB/W, BABL/c und C57BL/6 wurden in der Versuchstieranlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Ebenso ein Teil der verwendeten $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ Tiere. Weitere Mäuse dieses Stammes und die entsprechenden Kontrolltiere wurden von The Jackson Laboratory, USA, bezogen und bis zur Analyse im Quarantäne-Tierstall am DRFZ Berlin gehalten.

2.2.2 Zellproliferationsexperimente mittels BrdU-Einbau

Die Proliferation von Plasmazellen wurde mit Hilfe von Bromodeoxyuridin (BrdU-) Einbaustudien analysiert. BrdU ist ein Analogon der endogenen Base Thymidin und wird kompetitiv an Stelle dieser Base in der S-Phase des Zellzyklus in die DNS teilungsaktiver Zellen eingebaut. Zellen, die sich während des Zeitraumes teilen, in dem BrdU im Organismus verfügbar ist, können später nach Anfärbung mit einem spezifischen anti-BrdU-Antikörper durchflusszytometrisch und immunhistologisch identifiziert werden.

Während sich in manchen Organismen der BrdU-Einbau als unzuverlässige Methode zur Markierung proliferierender Zellen erwies, z.B. in einem bestimmten Rattenstamm, so wurde wenigsten für BALB/c und NZB/W Mäuse gezeigt, dass die Effizienz des Einbaus in Plasmazellen sehr zuverlässig ist (12, 65, 83).

Zur Unterscheidung zwischen kurz- und langlebigen Plasmazellen wurden die Mäuse für 14 Tage mit BrdU gefüttert. Die Fütterung erfolgte kontinuierlich über das Trinkwasser in einer Konzentration von 1 mg/ml, wobei dem Wasser 1 % Glukose zugesetzt war, da die Tiere es so besser annahmen. In Wasser gelöstes BrdU ist lichtempfindlich, daher wurden die Wasserflaschen mit Alufolie umwickelt. Die BrdU-Lösung wurde alle 3 – 4 Tage erneuert. Die Fütterung der Tiere für 14 Tage ist zur Unterscheidung zwischen kurz- und langlebigen Plasmazellen ausreichend: wie gezeigt wurde, sind nach diesem Zeitraum alle kurzlebigen Plasmazellen BrdU(+), während es sich bei den BrdU(-) Plasmazellen um langlebige Plasmazellen handelt (65).

2.2.3 Induktion der Megakaryopoese durch Behandlung von Mäusen mit Thrombopoietin

Zur Induktion der Megakaryopoese wurden 10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse mit dem Zytokin Thrombopoietin (TPO) behandelt. Je Tier wurden 0,3 µg TPO gelöst in 100 µl PBS/BSA an jeweils 5 aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 – 4) intraperitoneal injiziert, außerdem erfolgte eine weitere Behandlung an Tag

17. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Tieren, die lediglich mit PBS/BSA behandelt wurden. Die Analyse des Plasmazell-Kompartiments erfolgte an Tag 10 und an Tag 24.

2.2.4 Behandlung von Mäusen mit depletierenden Antikörpern

Zur Depletion Gr-1(+) myeloider Zellen wurden 14 Wochen alte weibliche NZB Mäuse mit dem depletierenden anti-Gr-1-Antikörper (Klon RB6-8C5, Isotyp Ratte IgG2b) behandelt (84, 85). Als Kontrolle dienten eine mit dem nicht-depletierenden Antikörper F4/80 (Isotyp Ratte IgG2b) behandelte Gruppe und eine, die lediglich PBS bekam. Zur Unterscheidung kurz- und langlebiger Plasmazellen wurden die Tiere mit BrdU gefüttert. 0,3 mg des jeweiligen Antikörpers wurden an Tag 7 und 10 nach Beginn der BrdU-Fütterung gelöst in 100 µl PBS intraperitoneal verabreicht. Die Analyse erfolgte an Tag 14.

Zur Depletion B220(+) bzw. MHCII(+) Zellen wurden 6 Monate alte NZB/W Mäuse mit je 0,5 mg des entsprechenden Antikörpers (Klon RA3.6B2 bzw. M5/114) gelöst in 200 µl PBS intraperitoneal behandelt. Die Injektion erfolgte an Tag 9 nach Beginn der BrdU-Fütterung, die Analyse an Tag 14. Zur Eliminierung CXCR3(+) Zellen wurden 6 Monate alte NZB/W Mäuse mit dem Fusionsprotein IP-10:Fc (Chimerigen, USA) behandelt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal nach Beginn der BrdU-Fütterung an Tag 2 (10 µg in 200 µl PBS), 6 und 10 (jeweils 2 µg in 200 µl PBS), die Analyse an Tag 14. Als Kontrollen für die Antikörper- bzw. Fusionsprotein- vermittelten Depletionsversuche wurden Mäuse entsprechend mit PBS behandelt.

2.2.5 Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C)

5 Monate alte NZB/W Weibchen wurden intraperitoneal mit 0,5 mg Poly(I:C) (Amersham Biosciences, D) in 200 µl PBS an Tag 10 nach Beginn der BrdU-Fütterung behandelt. Also Kontrollen dienten eine Gruppe von Mäusen, die das

Zytostatikum Cyclophosphamid (je 1 mg in 200 µl PBS) an Tag 12, 13 und 14 injiziert bekamen und eine Gruppe, die sowohl an Tag 10 mit Poly(I:C), als auch an den Tagen 12 – 14 mit Cyclophosphamid behandelt wurden. Die Analyse erfolgte an Tag 18.

2.2.6 Behandlung von Mäusen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib

5 Monate alte NZB/W-Weibchen wurden intravenös mit 0,75 mg/kg Körpergewicht des Proteasom-Inhibitors Bortezomib (Velcade, Janssen-Cilag GmbH, D) gelöst in 100 µl PBS behandelt. Die Injektionen erfolgten zum Zeitpunkt 0 und nach 36 Stunden. 48 Stunden nach der ersten Injektion erfolgte die Analyse. Zur Unterscheidung des Effektes von Bortezomib auf kurz- und langlebige Plasmazellen wurden die Tiere durchgehend bis zur Analyse für 14 Tage mit BrdU gefüttert. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Mäusen, die entsprechend mit PBS behandelt wurde.

2.3 Präparation der Zellen

2.3.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Milz, Lymphknoten und Knochen (beide Femuren und beide Tibia) wurden nach Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation und Desinfektion des Fells mit 70 %igem Ethanol entnommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension von Milz und Lymphknoten wurde das Gewebe zerkleinert, durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 70 µm (BD Falcon, D) gedrückt und in kaltem PBS/BSA aufgenommen. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Enden der Röhrenknochen entfernt, das Mark mit Hilfe einer Spritze mit 25-Gauge Kanüle herausgespült und dann ebenfalls durch ein Zellsieb gedrückt. Anschließend

wurden die Zellen bei 4°C für 10 min bei 300 g zentrifugiert, das Pellet in PBS/BSA aufgenommen und erneut zentrifugiert.

2.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in Suspension wurde das vollautomatische CASY DT System eingesetzt. Es basiert auf der elektronischen Pulsanalyse und erlaubt die Messung von Zellzahl sowie die tot/lebend-Unterscheidung anhand der Zellgröße mit einer Messungengenauigkeit von 0,1 µm. Zur Messung der Zellzahlen von Milz- und Knochenmarkssuspensionen wurde ein Größenbereich von 5,5 – 30 µm gewählt. Die Zellzahl wurde dreimal gemessen und der Mittelwert vom Gerät als Zellkonzentration pro ml ausgegeben.

Die aus den beiden Femuren und den beiden Tibia einer Maus gewonnenen Zellen entsprechen 18,7 % der Gesamt-Knochenmarkszellen (86). Entsprechend wurde zur Ermittlung der Gesamt-Knochenmarkszellzahl die erhaltene Zellzahl mit dem Faktor 5,3 multipliziert.

2.4 Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Einzelzellen anhand ihrer Größe, Granularität und der Ausprägung membranständiger sowie intrazellulärer Moleküle. Oft erfolgt die Charakterisierung von Leukozyten anhand der Ausprägung bestimmter Oberflächenmoleküle, der Differenzierungsantigene (cluster of differentiation, CD). In dieser Arbeit wurden verschiedene Oberflächenmoleküle mit Hilfe fluorochrom-markierter monoklonaler Antikörper angefärbt. Je nach Größe, Granularität und der gebundenen Fluoreszenz emittiert jede Zelle nach Anregung

durch verschiedene Laser Licht, welches durch spezielle Filter absorbiert wird. Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen werden die Lichtstrahlen unterschiedlich gestreut. Entsprechend können Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten bereits über das in einem Winkel von $3 - 10^\circ$ gestreute Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und das um 90° reflektierte Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) identifiziert werden. Die weitere Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgt je nach Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge im zweidimensionalen Punktdiagramm (dot plot). Somit ist es möglich, Aussagen über die Frequenz zu treffen, mit der Zellen der untersuchten Charakteristika innerhalb einer Zellsuspension vorkommen. Je nach Durchflusszytometer ist mit der Anzahl der Laser auch die Anzahl der einsetzbaren Fluorochrome und damit der Merkmale, über die eine Zelle charakterisiert werden kann, limitiert. Bei dem hier verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um den Gerätetyp LSR II der Firma Becton Dickinson. Dieses Gerät ist mit 4 Lasern ausgestattet: einem UV-Laser (Anregungswellenlänge: 355 nm), einem violetten Laser (Anregungswellenlänge: 405 nm), einem blauen Laser (Anregungswellenlänge: 488 nm) und einem roten Laser (Anregungswellenlänge: 633 nm). Für die Analyse und Auswertung der hier gezeigten Daten wurde die CellQuest™ Research Software (BD, D) verwendet.

2.4.2 Oberflächenfärbungen

Die Oberflächenfärbungen der lebenden Zellen wurden in kaltem PBS/BSA durchgeführt. Färbeantikörper können unspezifisch an niedrig affine Fc-Rezeptoren binden, die auf vielen Zellen vorhanden sind. Um die dadurch entstehenden falsch-positiven Signale zu vermindern, wurden die Fc γ III (CD16)- und II (CD32)-Rezeptoren zunächst durch Inkubation der Zellen mit dem unmarkierten Anti-Fc γ R-Antikörper (10 μ g/ml) für 10 min auf Eis blockiert. Die anschließende Färbung der Zellen mit den primären, markierten Antikörpern erfolgte in einem Volumen von 50 – 100 μ l für 10 min im Dunkeln auf Eis. Die

adäquate Konzentration für jeden Antikörper wurde in Vorversuchen ermittelt, in der Regel betrug sie für durchflusszytometrische Färbungen 1 – 5 µg/ml. Im Anschluss folgte ein Waschschrift (10 min, 4°C, 300 g) in kalten PBS/BSA (mindestens 10-fache Menge des Färbevolumens). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen gegebenenfalls in einem Sekundärreagenz aufgenommen, wie zuvor beschrieben gefärbt und gewaschen. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen in PBS/BSA aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Der Ausschluss toter Zellen erfolgte über DAPI das bei Membranschäden in die Zelle eindringt und mit der DNS interkaliert. Die Zugabe von DAPI erfolgte unmittelbar vor der Messung.

2.4.3 Intrazelluläre Färbungen

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen nach der Anfärbung der Oberflächenantigene zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Paraformaldehyd fixiert. Dies führt zu einer Quervernetzung der Proteine. Zur Fixierung wurden die Zellen in PBS/2 % Formaldehyd aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut zweimal in PBS gewaschen und zur Permeabilisierung in dem Detergens Saponin aufgenommen, in dem auch die 10-minütige Färbung mit den intrazellulären Antikörpern erfolgte. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Analyse im Dunkeln verwahrt.

Im Falle der Analyse des BrdU-Einbaus in die DNS wurden die Zellen nach den Anweisungen des Herstellers mit dem BrdU-Flow Kit (BD Pharmingen, D) gefärbt. Das Protokoll entspricht im Prinzip dem oben beschriebenen. Zusätzlich erfolgt hier eine einstündige Inkubation bei 37°C mit DNase, um die DNS im Kern aufzuspalten und so das eingebaute BrdU für den anti-BrdU-Antikörper zugänglich zu machen.

2.5 Isolierung und Kultivierung von Plasmazellen

2.5.1 Zellsortierung

Zur Isolierung definierter Zellpopulationen, in vorliegender Arbeit reifer Plasmazellen, wurden zwei Methoden kombiniert: die magnetisch-assoziierte Zellsortierung (MACS) und die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS). In beiden Fällen werden Zellpopulationen nach Antikörpermarkierung anhand der Ausprägung spezifischer Oberflächenmoleküle getrennt.

2.5.1.1 Magnetische Zellsortierung

Diese Trennmethode kann zur Anreicherung oder Depletion einzelner Zellpopulationen verwendet werden. Die Antikörper, die für die MACS-Sortierung verwendet werden, sind mit magnetischen Kügelchen versehen (Durchmesser ca. 50 nm). Nach Inkubation der Einzelzellsuspension mit derartigen magnetisch markierten, spezifisch gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichteten Antikörpern wird die Zellsuspension über eine Trennsäule gegeben. Diese besitzt eine Matrix aus Stahlwolle und befindet sich in einem Permanentmagnetfeld. Die magnetisch markierten Zellen werden im Magnetfeld an der Stahlwolle zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die zurückgehaltenen Zellen können anschließend außerhalb des Magnetfeldes aus der Säule gewaschen werden.

2.5.1.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Bei der FACS-Sortierung werden Zellpopulationen nach spezifischer Färbung mit Fluorochromen getrennt. Das Prinzip entspricht dem des Durchflusszytometers. Zellen, die aus einer Zellsuspension herausgetrennt werden sollen, werden im Punktdiagramm mit Hilfe eines Analysefensters („gate“) bestimmt. Der

Flüssigkeitsstrahl, der die Laser im Gerät passiert, wird dann so aufgetrennt, dass sich einzelne Tröpfchen mit einer einzigen Zelle bilden. Diese werden, wenn positiv selektioniert, durch einen elektrischen Impuls abgelenkt und separat aufgefangen. Die Steuerung des Gerätes erfolgte mit der Cytomation Summit Software, V3.1 (Cytomation, USA). Die Zellsortierung fand am FACSAria statt.

2.5.1.3 Isolierung von Plasmazellen durch Zellsortierung

Um die Auswirkungen der Stimulation reifer Plasmazellen aus verschiedenen Mausstämmen mit Überlebensfaktoren zu vergleichen, mussten diese Zellen zunächst aus Milz- bzw. Knochenmarks-Zellsuspensionen isoliert werden. Da die Zellen bei diesen Experimenten für 3 Tage in Kultur genommen wurden, wurden die nachfolgenden Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nachdem Einzelzellsuspensionen der Organe hergestellt wurden, wurden die Zellen zunächst mit einem Fc-Block behandelt und dann mit dem spezifischen, magnetisch markierten Antikörper für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Im vorliegenden Fall galt es, Erythrozyten zu depletieren, entsprechend wurden anti-Ter119-beads (Miltenyi, D) verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem Verhältnis von 1:10 bei einer Konzentration von ca. 2×10^7 Zellen/ml. Überschüssige, ungebundene Antikörperbeads wurden in einem Waschschrift entfernt. Zur Depletion wurde die Zellsuspension auf die zuvor äquilibrierte LS⁺-Säule aufgetragen, wobei am Säulenausgang eine 26 G-Kanüle angebracht war, um die Durchflussrate herabzusetzen. Die positive Fraktion, in der die Erythrozyten angereichert waren, wurde verworfen. Die Negativfraktion wurde nach einem Waschschrift für die FACS-Sortierung entsprechend dem Protokoll der FACS-Oberflächen-Antikörperfärbung weiter behandelt.

Zur Identifizierung reifer Plasmazellen dienten drei Oberflächenmerkmale: die starke Ausprägung von CD138 und die mangelnde bzw. schwache Ausprägung von B220 und MHCII (Abb. 2). Auf diese kleine Population wurde nach Ausschluss toter Zellen über DAPI ein Sortier-Fenster gesetzt. Der Sort erfolgte direkt in die entsprechend vorbereiteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte.

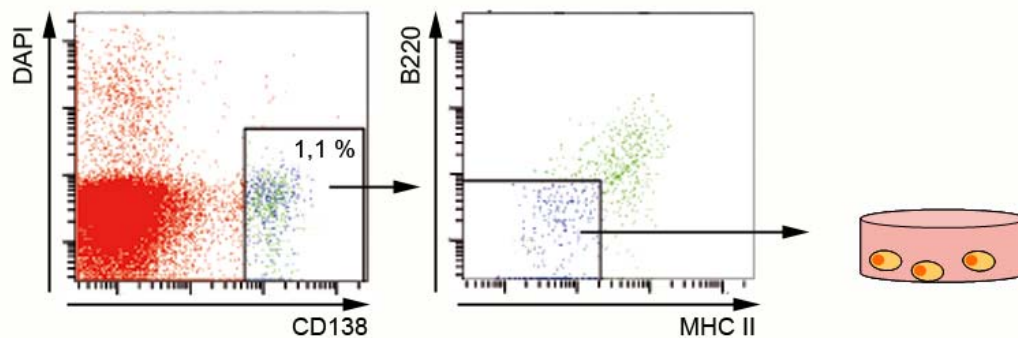


Abb. 2: Isolation von Plasmazellen. Einzelzellsuspensionen von Milz- bzw. Knochenmark wurden nach Depletion der Erythrozyten durch magnetisch-assoziierte Zellsortierung mit Antikörpern gegen CD138, B220 und MHCII gefärbt. Reife, CD138(++) DAPI(-) B220(-) MHCII(-) Plasmazellen wurden am Zellsortierer isoliert und in Kultur genommen. Gezeigt ist die Sortierung von Plasmazellen aus einer NZB/W Milz.

2.5.2 Kultivierung von Plasmazellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen

Zum Vergleich der Überlebensfähigkeit von Plasmazellen verschiedener Mausstämme wurden die Zellen in einer 96-Loch Zellkulturplatte mit flachem Boden in Gegenwart von Überlebensfaktoren kultiviert. Hierfür wurden je 500 reife, CD138(++) B220(-) MHCII(-) Plasmazellen direkt in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte sortiert. In diesen war je 250 μ l Kulturmedium vorgelegt, welches mit den entsprechenden Überlebensfaktoren versetzt war. Verwendet wurden IL-6 in verschiedenen Konzentrationen ($c = 0,1 - 10$ ng/ml), TNF- α ($c = 10$ ng/ml), SDF-1 α ($c = 10$ ng/ml), megaAPRIL ($c = 100$ ng/ml) und BAFF ($c = 200$ ng/ml). Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit wurden jeweils 5-fach-Ansätze durchgeführt.

Allen Kulturen war der Proliferationshemmer Hydroxyurea in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt. Damit sollte zusätzlich gewährleistet werden, dass die beobachteten Effekte nach Stimulation mit Zytokinen Überlebenswirkungen von teilungsinaktiver reifer Plasmazellen sind, und nicht durch das Auswachsen einzelner kontaminierender Plasmablasten zu Stande kommen.

Die Quantifizierung überlebender Plasmazellen an Tag 3 erfolgte durch den unter 2.6.1 beschriebenen ELISpot-Assay. Als Referenz für den Anteil überlebender Plasmazellen an Tag 3 wurde die Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen unmittelbar nach dem Sort an Tag 0 bestimmt.

Vor der Durchführung des ELISpots mussten die Zellen dreimal gewaschen werden, um die von den Zellen sezernierten Antikörper aus dem Medium zu entfernen, die zu einem hohen Hintergrund auf der ELISpot-Platte führen würden. Für diese Waschschrte wurden die Zellen in der 96-Loch Zellkulturplatte für 10 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Dann wurden mit einer Mehrkanal-Pipette vorsichtig 175 µl des Überstandes abgenommen und durch das gleiche Volumen frischen Mediums ersetzt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei nach der dritten Zentrifugation die Zellen in einem Gesamtvolumen von 300 µl Medium aufgenommen wurden. Anschließend wurden sie auf die vorbereitete ELISpot-Platten überführt.

2.6 Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen

2.6.1 Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode

Die Quantifizierung der Antikörper-sezernierenden Zellen in den Kulturexperimenten erfolgte mittels Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISpot). Mit dieser Methode können Sekretionsprodukte von Zellen nachgewiesen und die Zahl sezernierender Zellen quantifiziert werden.

Werden die Sekretionsprodukte von auf hochbindenden Mikrotiterplatten gebundenen Antigen bzw. Antikörpern erkannt, können sie genau an der Stelle, an der die sezernierende Zelle lokalisiert war, nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt nach Inkubationsschritten mit Sekundärreagenzien über eine enzymatische Farbreaktion. Diese findet lokal begrenzt an der Stelle statt, an der

ursprünglich die sezernierende Zelle lag. Zur Quantifizierung werden die Farbpunkte ausgezählt.

2.6.2 Durchführung des ELISpots

Zunächst wurde eine flachbodige, hochbindende Mikrotiterplatte (Costar, D) mit den Beschichtungs-Antikörpern anti-Maus-IgM und/oder -IgG in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS beschichtet. Die ungebundenen Antikörper wurden nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C durch einen Waschschrift mit PBS entfernt und die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit dem Blockierungspuffer (PBS/3 % BSA) abgesättigt. Für die Sekretionsphase wurden die Zellen in Verdünnungsreihen auf die Platte aufgetragen und 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C unter Zusatz von 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch gründliches Waschen mit dem Detergenz-haltigen Waschpuffer vollständig entfernt. In diesem Puffer wurden auch die Gebrauchslösungen für die nachfolgenden Reagenzien hergestellt. Die Detektion der gebundenen, von den Zellen sezernierten Antikörper erfolgte durch 20-minütige Inkubation mit den biotinylierten Detektions-Antikörpern anti-Maus-IgM-bio bzw. -IgG-bio (Konzentration = 2 µg/ml) bei RT. Nachdem die ungebundenen Antikörper durch einen Waschschrift entfernt wurden, folgte die 20-minütige Inkubation mit SA-AP (1:3000) ebenfalls bei RT. Überschüssiges SA-AP wurde gründlich entfernt und im Anschluss das Substrat BCIP zugegeben. Dieses war in einer Konzentration von 1 mg/ml in Entwicklungspuffer gelöst (30 Minuten bei 65°C gelöst), der aus AMP-Puffer und geschmolzener Agarose (0,6 %) bestand. Die warme Lösung wurde dann in die Mikrotiterplatte gegeben. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurde die Platte für die Farbreaktion über 2 Stunden bei 37°C aufbewahrt. Die Auszählung der Spots erfolgte an einem Invertmikroskop.

2.7 Histologische Analyse von Gewebeschnitten

2.7.1 Anfertigung von Milzschnitten

Die Milzen wurden nach Entnahme aus der Maus gründlich von Fett- und Geweberesten gesäubert und bis zur Weiterverarbeitung in kaltem PBS gelagert. Meist wurde für die Histologie nur etwa die Hälfte einer Milz verwendet. Die Organe wurden dann in ein Schälchen mit O.C.T. Medium (Sakura, USA) gebettet und so in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -70°C.

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte an einem Kryostat bei etwa -16°C. Für die zweidimensionalen Analysen der Präparate wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt, für die dreidimensionalen Analysen 25 µm dicke Schnitte. Diese wurden auf SuperFrost Ultra Plus-Objektträgern (Menzel-Gläser, D) aufgenommen und lichtgeschützt für mindestens 2 Stunden luftgetrocknet. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert (Fixierung durch Wasserentzug) und wiederum luftgetrocknet. Die Lagerung erfolgte einzeln verpackt in kleinen Plastiktütchen bei -70°C.

2.7.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten

Für die Anfärbung einzelner Zellarten in den Kryoschnitten wurden Antikörper verwendet, die direkt fluoreszenzmarkiert waren oder durch fluoreszenzmarkierte Sekundärreagenzien angefärbt wurden. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst bei RT aufgetaut und dann mit einem Wachsstift (Dako Cytomation, DK) umrundet. Anschließend wurden sie für 10 Minuten mit PBS rehydriert, wodurch auch das OCT-Medium entfernt wurde. Um eine unspezifische Hintergrundreaktivität bei der Färbung zu minimieren, wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten mit Fc-Block (10 µg/ml gelöst in PBS/3 %BSA) vorinkubiert. In diesem Puffer wurden auch die nachfolgenden

Antikörper-Färbungen durchgeführt, die in einer dunklen, feuchten Kammer stattfanden. Die adäquate Konzentration für jeden Antikörper wurde in Vorversuchen ermittelt, für immunhistologische Färbungen betrug sie in der Regel 5 – 10 µg/ml. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern erfolgte bei RT für 30 – 60 Minuten. Eine Ausnahme stellte die Färbung mit dem anti-SDF-1-Antikörper dar, hier erfolgte die Färbung bei 4°C über Nacht. Wurden 25 µm dicke Schnitte gefärbt, so wurden die Inkubationszeiten auf 2 – 3 Stunden verlängert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten entfernt, anschließend erfolgte die Inkubation mit den Sekundärreagenzien ebenfalls für 30 – 60 Minuten. Nach 3 weiteren Waschschritten wurden die Gewebeschnitte mit einem Tropfen Einbett-Medium (Fluoreszent Mounting Medium, Dako Cytomation, DK) und einem Deckgläschen (Menzel-Gläser, D) bedeckt. Dann wurden sie zur Aushärtung des Einbettmediums bei RT getrocknet und bis zur Analyse am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop in Dunkelheit gelagert.

Bei der gleichzeitigen Anfärbung von Gewebeschnitten mit dem anti-κ-Antikörper zur Detektion von Plasmazellen und anti-SDF-1-Antikörper erfolgte zuerst die Inkubation mit dem anti-κ-Antikörper. Dies war erforderlich, da der anti-SDF-1 Antikörper ein Maus-Antikörper mit der κ-leichten Kette ist und somit durch die anti-κ-Färbung detektiert würde.

2.7.3 Nachweis BrdU-markierter Zellen in Gewebeschnitten

Für die Anfärbung von in die DNS eingebautem BrdU wurden die Gewebeschnitte vor der Anfärbung besonders behandelt: nach der Rehydrierung mit PBS erfolgte eine Inkubation mit 2 N HCl (Roth, D). Dieser Schritt war erforderlich, um die DNS aufzuspalten und das eingebaute BrdU so für den fluoreszenzmarkierten Antikörper zugänglich zu machen. Im Anschluss an diese Inkubation musste der pH-Wert durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 10 Minuten wieder neutralisiert werden. Die Färbungen erfolgten im Anschluss wie oben beschrieben, wobei wiederum zu beachten war, dass bei der Kombination

mit dem anti-Maus- κ -Antikörper zunächst diese Färbung durchzuführen war. Erst im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Maus-anti-BrdU-Antikörper.

2.7.4 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Die histologischen Untersuchungen der Gewebeschnitte erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop der Firma Leica. Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) greift im Wesentlichen wie das Durchflusszytometer auf das Kontrastierverfahren durch Fluoreszenzmarkierung zurück, um Strukturen darzustellen. Gegenüber der konventionellen Mikroskopie besteht der Vorteil der LSM darin, dass die Abbildungsleistung des Mikroskops sowohl durch die Verwendung monochromatischen Lichtes als auch durch den Einsatz von Lochblenden vor Detektor („Detektionsspinhole“) und Laser („Anregungsspinhole“) verbessert wird. Dies wirkt sich insbesondere auf die laterale und die Auflösung entlang der z-Achse aus. Die Lochblende vor dem Detektor bewirkt eine starke Einengung des Schärfentiefebereichs, so dass nur jene Objekte scharf dargestellt werden, welche genau in der Fokusebene liegen. Durch das rechenstechnisch mögliche Zusammenfügen von Einzelbildern in der x-y-Ausdehnung aus verschiedenen Fokusebenen (z-Ebenen) ist sowohl eine schärfere Abbildung als im normalen Durch- oder Auflicht-Mikroskop möglich, als auch eine dreidimensionale Darstellung von Strukturen. Das in dieser Arbeit verwendete konfokale Laser-Scanning Mikroskop ist das Modell DM IRE2 von Leica. Es handelt sich hierbei um ein Invert-Mikroskop, das Laserlicht wird seitlich eingekoppelt und mittels eines Scankopfes über die Probe geführt. Die einzelnen Fokusebenen werden mittels eines in z-Richtung beweglichen Feinfokussiertisches angefahren.

Das verwendete Mikroskop ist mit 3 Lasern ausgestattet: einem Argon-, einem grünen und einem roten HeNe-Laser. Entsprechend wurde für die Untersuchungen Licht aus dem sichtbaren Bereich mit den Anregungswellenlängen 488 nm, 543 nm und 633 nm verwendet.

2.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) erstellt. Die Aussage über signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen wurde ebenfalls mit dem Prism-Programm nach Durchführung eines Mann-Whitney-Testes getroffen. Als signifikant galt, wenn $p < 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Das Plasmazell-Kompartiment verschiedener Mausstämme

Die Gesamt-Plasmazellzahl in der Milz ist in autoimmunen NZB/W Mäusen im Vergleich zu nicht-autoimmunen Mausstämmen stark erhöht (23). Um die absoluten Anzahlen langlebiger Plasmazellen in Milz und Knochenmark verschiedener autoimmuner und nicht-autoimmuner Mausstämme zu untersuchen, wurden Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mit BrdU gefüttert (Abb. 3a). Nach diesem Fütterungszeitraum haben alle kurzlebigen Plasmazellen BrdU aufgenommen, während langlebige Plasmazellen BrdU(-) bleiben (65). Durch den Nachweis des in die DNS eingebauten BrdUs und der Gegenfärbung mit CD138 und κ zur Identifizierung von Plasmazellen konnte die Frequenz kurz- und langlebiger Plasmazellen durchflusszytometrisch gemessen werden. Die absoluten Anzahlen von kurz- und langlebigen Plasmazellen wurden durch Rückkalkulation auf die absolute Zellzahl des Organs bestimmt. Für die Analyse von Antikörper-sezernierenden Zellen wurde ein großes Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Analysefenster gesetzt, da diese Zellen größer sind als andere Lymphozyten. Abb. 3b zeigt exemplarisch eine BrdU-Plasmazellfärbung von Milz-Zellen einer NZB/W Maus nach BrdU-Fütterung, Abb. 3c von Knochenmarks-Plasmazellen.

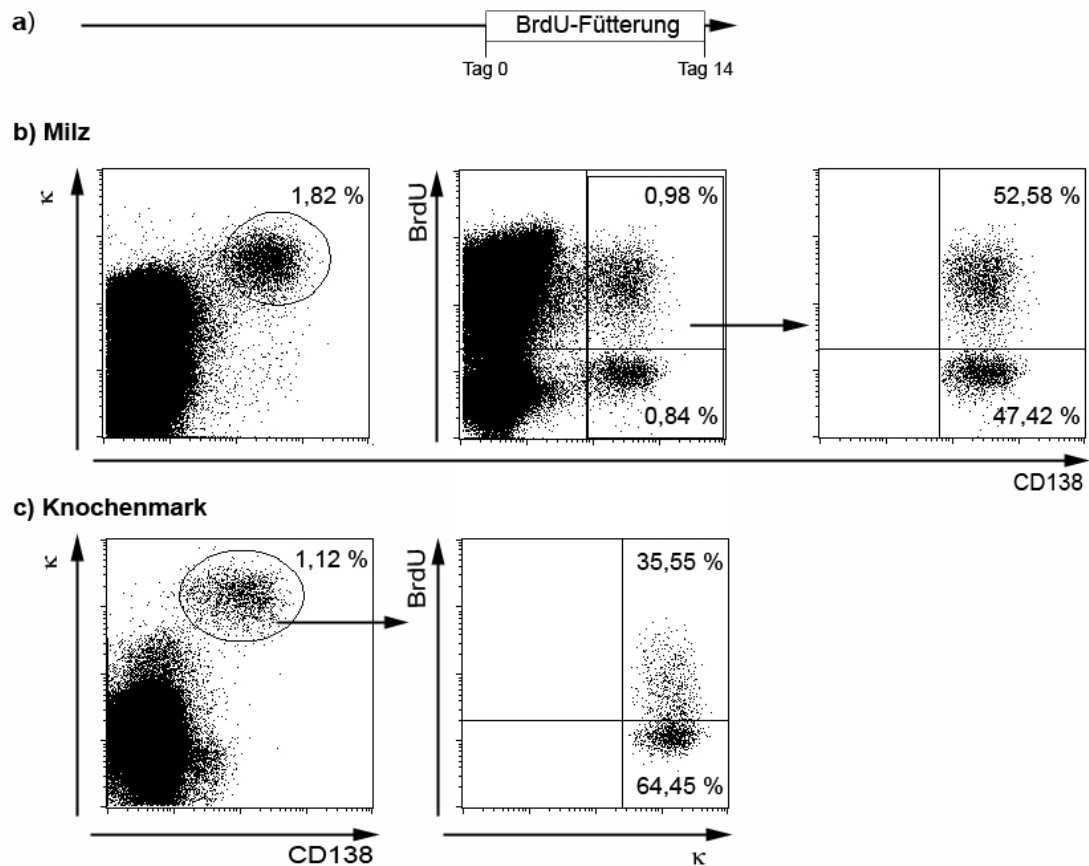


Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen einer NZB/W Maus nach BrdU-Fütterung. Zur Unterscheidung von kurz- und langlebigen Plasmazellen wurden Mäuse 14 Tage mit BrdU gefüttert (a). Einzelzellsuspensionen von Milz (b) und Knochenmark (c) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und nach elektronischem Ausschluss von Kleinpartikeln analysiert.

3.1.1 Anzahl der kurz- und langlebigen Plasmazellen in der Milz verschiedener Mausstämme

Das Milz-Plasmazellkompartiment wurde in NZB/W Mäusen, den elterlichen Mausstämmen NZB und NZW und nicht-autoimmunen C57BL/6 und BALB/c Mäusen bestimmt. Die Identifizierung von Plasmazellen erfolgte über den Oberflächenmarker CD138.

Die Unterschiede der absoluten Zellenzahlen in der Milz waren zwischen den untersuchten Mausstämmen relativ gering. In NZB/W Mäusen betrug die Anzahl $1,53 \pm 0,71 \times 10^8$, NZB Mäuse hatten signifikant mehr (2,3-facher Unterschied, $3,51 \pm 3,15 \times 10^8$) (Abb. 4a). NZW Mäuse wiesen mit $1,2 \pm 0,5 \times 10^8$ ähnlich viele Zellen auf wie NZB/W Mäuse, ebenso BALB/c Tiere mit $1,4 \pm 0,5 \times 10^8$. Lediglich in C57BL/6 Mäusen beinhaltete die Milz signifikant (2,3-mal) weniger Zellen ($0,7 \pm 0,3 \times 10^8$). Die Frequenzen der langlebigen Plasmazellen wiesen hingegen deutliche Unterschiede auf (Abb. 4b). Sie betrug in den NZB/W Mäusen $0,94 \pm 0,53$ % aller Leukozyten und war in den NZB Mäusen signifikant um das 1,8-fache erhöht ($1,68 \pm 0,76$). In allen anderen Mausstämmen war sie signifikant vermindert gegenüber den NZB/W Mäusen, um das 3,5-fache in NZW Mäusen ($0,27 \pm 0,16$), um das 4,9-fache in BALB/c Mäusen ($0,19 \pm 0,07$) und um das 8,5-fache in C57BL/6 Mäusen ($0,11 \pm 0,06$). Auf Ebene der absoluten Anzahl der BrdU(-) langlebigen Plasmazellen waren die Unterschiede noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 4c). Lediglich Milzen von NZB Mäusen beinhalteten mehr langlebige Plasmazellen ($3,9 \pm 2,9 \times 10^6$) als Milzen von NZB/W Mäusen ($1,6 \pm 1,4 \times 10^6$; 2,4-facher Unterschied). In den anderen untersuchten Mausstämmen konnten hingegen signifikant weniger langlebige Plasmazellen gefunden werden: $0,4 \pm 0,4 \times 10^6$ in NZW Mäusen (4-fach weniger als in NZB/W Mäusen), $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ in BALB/c Mäusen (6,2-fach weniger als in NZB/W Mäusen) und $0,1 \pm 0,1 \times 10^6$ in C57BL/6 Mäusen (20-fach weniger als in NZB/W Mäusen).

Lediglich NZB Mäuse zeigten somit ein vergleichbar stark ausgeprägtes langlebiges Plasmazell-Kompartiment in der Milz wie NZB/W Mäuse, während dieses sowohl in NZW als auch in nicht-autoimmunen C57BL/6 und BALB/c Mäusen wesentlich schwächer ausgeprägt war. In den hier gezeigten Abbildungen sind Tiere verschiedenen Alters dargestellt. Die getrennte Analyse gleich alter Tiere zeigten keine signifikanten Abweichungen von den hier gezeigten Ergebnissen. Daher wurden sie zusammengefasst.

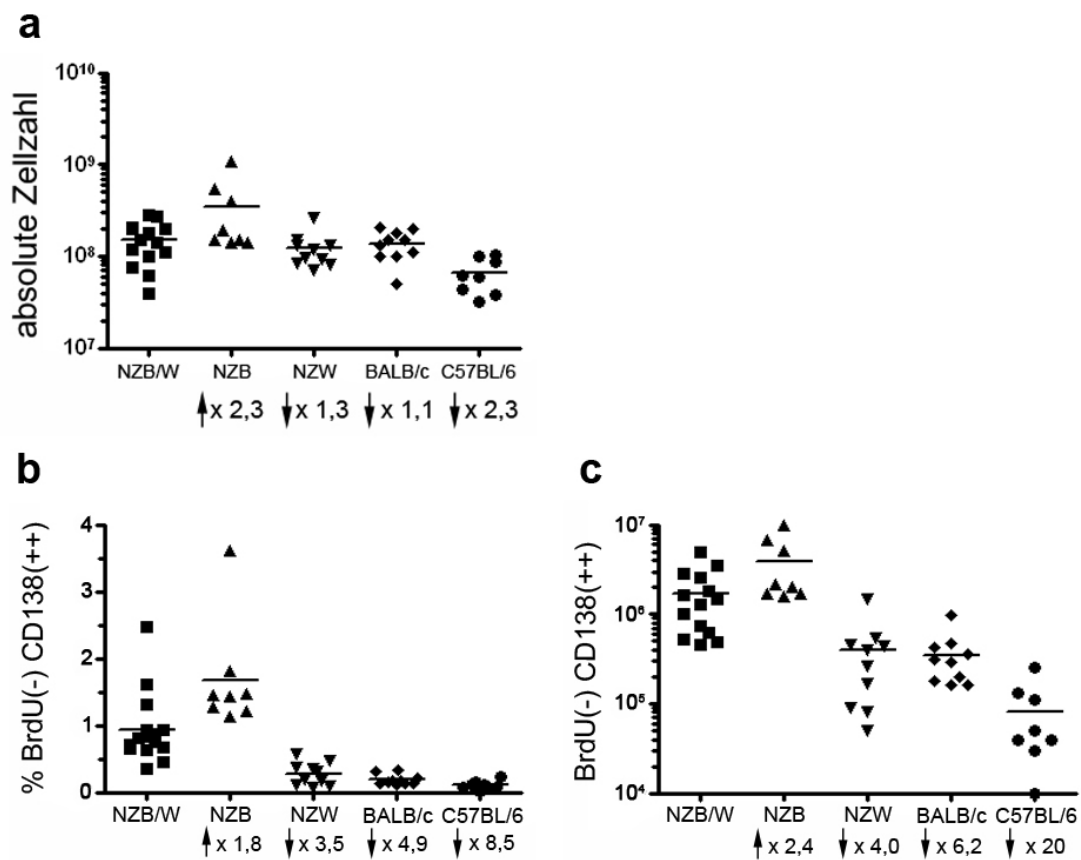


Abb. 4: Anzahl langlebiger Plasmazellen in der Milz verschiedener Mausstämme. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der Milz (a). Die Frequenzen langlebiger Plasmazellen wurden nach 14-tägiger BrdU-Fütterung durchflusszytometrisch bestimmt (b) und daraus die absoluten Anzahlen langlebiger Plasmazellen errechnet (c). Jedes Symbol entspricht einem Individuum. Die Werte unter der Mausstamm-Bezeichnung geben die Veränderungen im Vergleich zum Mittelwert der NZB/W Mäuse an.

3.1.2 Anzahl der kurz- und langlebigen Plasmazellen im Knochenmark verschiedener Mausstämme

Das Plasmazell-Kompartiment des Knochenmarks wurde in NZB/W Mäusen, den elterlichen Mausstämmen NZB und NZW und nicht-autoimmunen C57BL/6 Mäusen bestimmt. Zur Identifizierung der Plasmazellen im Knochenmark wurde der Oberflächenmarker CD138 in Verbindung mit einer intrazellulären Antikörperfärbung gegen die κ leichte Kette der Antikörper verwendet. Die Gegenfärbung der Zellen mit κ war notwendig, da im Knochenmark neben den

Plasmazellen auch verschiedene B-Zell-Vorläuferstufen CD138 auf der Oberfläche exprimieren, was eine Abgrenzung zu den Plasmazellen alleine über diesen Marker schwierig macht. Da in der Maus 95 % der Antikörper die κ leichte Kette tragen und sich bezüglich der BrdU-Färbung keine Unterschiede zwischen κ - und λ -Plasmazellen zeigten (Daten nicht gezeigt), beschränkt sich die Analyse in dieser Arbeit auf κ (++) Plasmazellen.

Die absoluten Zellzahlen im Knochenmark von NZB/W, NZB und NZW Mäusen wiesen nur geringe, statistisch nicht signifikante Schwankungen auf ($2,7 \pm 1,5 \times 10^8$ in NZB/W, $2,9 \pm 0,8 \times 10^8$ in NZB und $3,0 \pm 1,2 \times 10^8$ in NZW). Lediglich C57BL/6 Mäuse beinhalten signifikant mehr Zellen im Knochenmark als NZB/W Mäuse ($4,0 \pm 1,4 \times 10^8$ in C57BL/6; 1,4-facher Unterschied) (Abb. 5a). Die Frequenz BrdU(-) langlebiger Plasmazellen unterschied sich nicht zwischen NZB/W Mäusen ($0,63 \pm 0,17$ %) und NZB Mäusen ($0,67 \pm 0,41$ %), war aber signifikant um das 2,2-fache niedriger in NZW Mäusen ($0,29 \pm 0,35$ %) und um das 3,2-fache in C57BL/6 Mäusen ($0,20 \pm 0,10$ %) (Abb. 5b). Vergleichbar unterschieden sich NZB/W Mäuse in der absoluten Anzahl langlebiger Plasmazellen mit $1,6 \pm 0,8 \times 10^6$ nicht signifikant von NZB Mäusen ($2,0 \pm 1,2 \times 10^6$) (Abb. 5c). Hingegen hatten im Vergleich zu NZB/W Mäusen NZW und nicht-autoimmune C57BL/6 Mäuse signifikant weniger langlebige Plasmazellen, nämlich NZW 3,6-mal weniger ($0,5 \pm 0,4 \times 10^6$) und C57BL/6 Mäuse 1,9-mal weniger ($0,9 \pm 0,8 \times 10^6$).

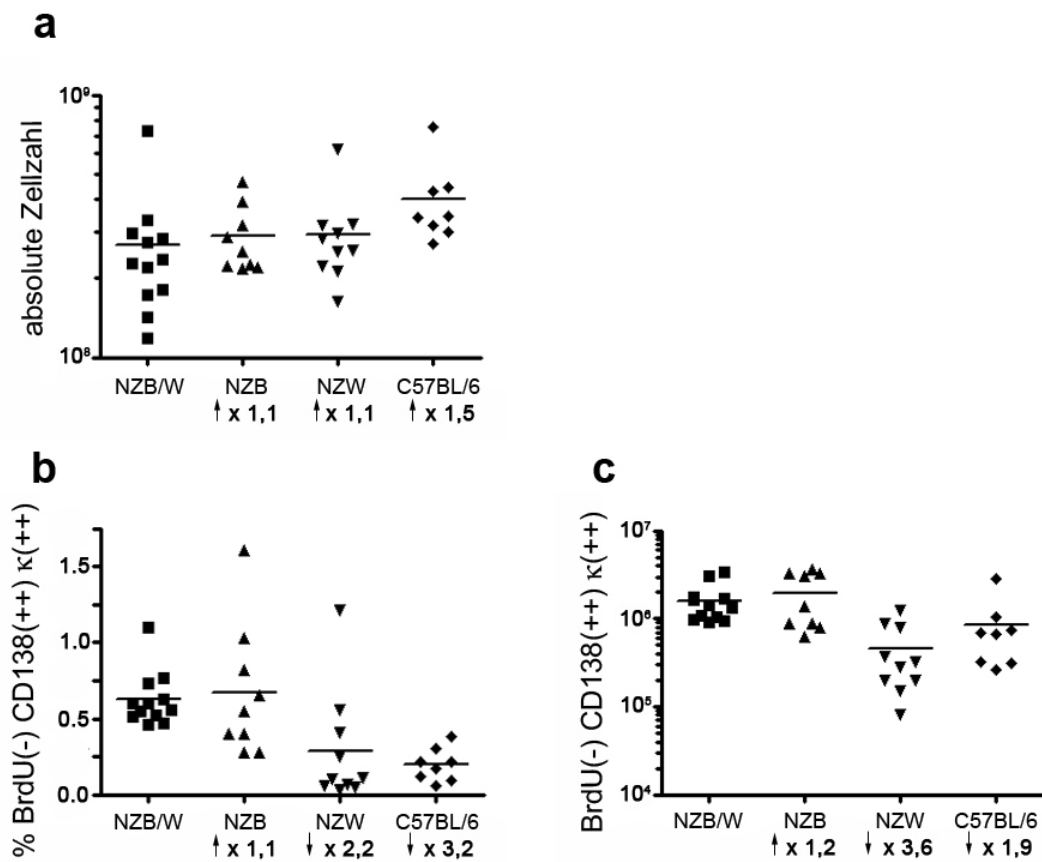


Abb. 5: Anzahl langlebiger Plasmazellen im Knochenmark verschiedener Mausstämmе. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen des Knochenmarks (a). Die Frequenzen langlebiger Plasmazellen wurden nach 14-tägiger BrdU-Fütterung durchflusszytometrisch bestimmt (b) und daraus die absoluten Anzahlen langlebiger Plasmazellen errechnet (c). Jedes Symbol entspricht einem Individuum. Die Werte unter der Mausstamm-Bezeichnung geben die Veränderungen im Vergleich zum Mittelwert der NZB/W Mäuse an.

Die Unterschiede in der Anzahl langlebiger Plasmazellen zwischen den untersuchten Mausstämmеn waren somit im Knochenmark wesentlich weniger stark ausgeprägt als in der Milz. Auch hier verhielten sich jüngere und ältere Tiere vergleichbar, weshalb die Ergebnisse zusammengefasst wurden.

3.2 *In vitro* Studien zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit isolierter Plasmazellen

Die hohe Anzahl langlebiger Plasmazellen in autoimmunen NZB und NZB/W Mäusen kann verschiedene Ursachen haben. So ist es denkbar, dass Plasmazellen dieser Mausstämme Zell-autonome Überlebensvorteile haben. Alternativ kann die Umgebung der Plasmazellen in der Milz verändert sein, wodurch mehr Plasmazellen am Überleben erhalten werden können. Auch ein Zusammenspiel beider Ansätze ist denkbar.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob Plasmazellen von NZB/W Mäusen aufgrund Zell-autonomer Eigenschaften eine erhöhte Überlebensfähigkeit besitzen, wurden Kulturexperimente durchgeführt. Reife, nicht teilungsaktive Plasmazellen verschiedener Mausstämme wurden anhand der Ausprägung von CD138 auf der Oberfläche und der mangelnden Ausprägung der Oberflächenmarker B220 und MHCII mit einem FACS-Sorter isoliert und für 3 Tage in Kultur genommen. Ohne Zugabe von Überlebensfaktoren starben 95 % der Plasmazellen unabhängig von der Herkunft innerhalb dieses Zeitraums (Abb. 6). Durch Zugabe verschiedener bekannter Faktoren konnte ein Teil der Plasmazellen am Überleben gehalten werden. Durch die Gegenwart des Proliferationshemmers Hydroxyurea (OH-U) wurde zusätzlich verhindert, dass sich Überlebenseffekte mit Proliferationseffekten überlagern. Dieser Proliferationshemmer wurde bereits in früheren Studien für vergleichbare Plasmazell-Kulturen verwendet und hat keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen (27).

3.2.1 IL-6 vermitteltes Überleben isolierter Milz- und Knochenmarks-Plasmazellen in Kultur

Milz- und Knochenmarks-Plasmazellen der Stämme NZB/W und C57BL/6 wurden isoliert und kultiviert. Die Anzahl überlebender Plasmazellen an Tag 3

wurde mittels ELISpot bestimmt und in Bezug gesetzt zur Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen an Tag 0. Ohne Zugabe von Überlebensfaktoren betrug die maximale Überlebensrate an Tag 3 unter 6 %. Die Kultivierung in Gegenwart des bekannten Plasmazell-Überlebensfaktors IL-6 führte zu einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der Lebensdauer, wobei diese unabhängig vom Mausstamm bei Knochenmarks-Plasmazellen höher war als bei Plasmazellen aus der Milz. In dem in Abb. 6 gezeigten repräsentativen Experiment überlebten in Gegenwart einer IL-6-Konzentration von 0,1 ng/ml 3,7 % der C57BL/6-Milz-Plasmazellen, im Vergleich dazu 10,6 % der Knochenmarks-Plasmazellen. Bei der gleichen Konzentration überlebten 15,1 % der Milz-Plasmazellen aus NZB/W Mäusen im Vergleich zu 30,3 % der Knochenmarks-Plasmazellen. In Gegenwart von 1 ng/ml IL-6 betrug die Überlebensrate bei Milz-Plasmazellen aus C57BL/6 Mäusen 4,4 % im Vergleich zu 14,0 % bei Knochenmarks-Plasmazellen und 21,0 % bei Milz-Plasmazellen aus NZB/W Mäusen im Vergleich zu 41,7 % bei Knochenmarks-Plasmazellen aus diesen Tieren.

Zusammenfassend war die Überlebensrate von Knochenmarks-Plasmazellen signifikant (2-3-fach) erhöht im Vergleich zu der von Milz-Plasmazellen, unabhängig vom Mausstamm. Zusätzlich zeigte sich, dass sowohl Milz- als auch Knochenmarks-Plasmazellen von NZB/W Mäusen besser in Gegenwart von IL-6 überlebten als Plasmazellen aus C57BL/6 Mäusen. Vergleichbare Resultate ergaben sich bei Experimenten mit anderen beschriebenen Plasmazell-Überlebensfaktoren. Getestet wurden die Effekte von TNF- α , SDF-1 α , APRIL und BAFF. Auch in Gegenwart dieser Faktoren überlebten Plasmazellen aus NZB/W Mäusen besser als solche aus C57BL/6 Mäusen und die Überlebensraten von Knochenmarks-Plasmazellen war höher als die von Milz-Plasmazellen. Insgesamt waren die Überlebensraten bei diesen Faktoren jedoch deutlich geringer als bei IL-6 (Daten nicht gezeigt).

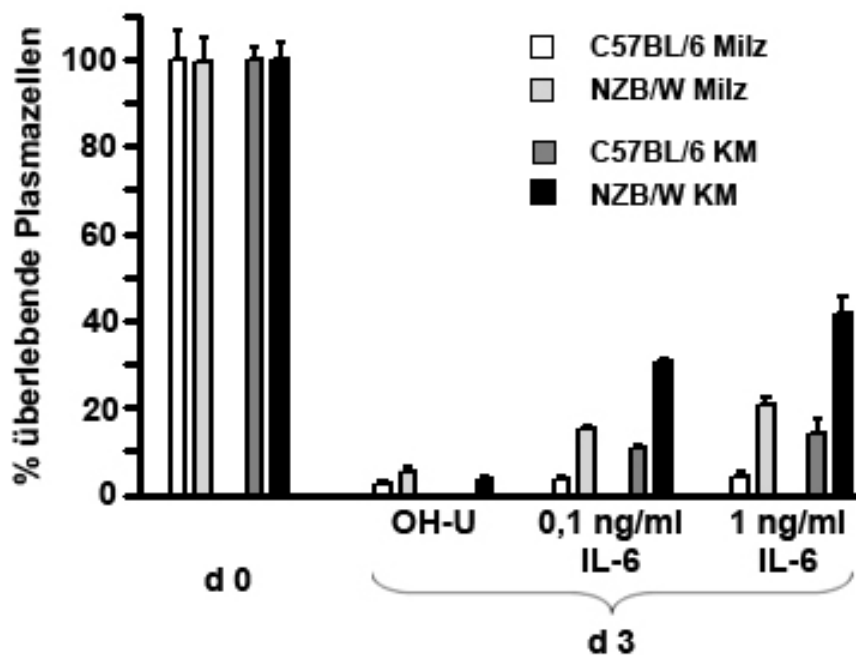


Abb. 6: Überlebensfähigkeit isolierter Milz- und Knochenmarks-Plasmazellen in Kultur. Reife CD138(++) B220(-) MHCII(-) Plasmazellen aus Milz und Knochenmark (KM) wurden mittels FACS-Sorter isoliert und in Gegenwart des Proliferationshemmers Hydroxyurea (OH-U) und verschiedener IL-6-Konzentrationen kultiviert. Die Anzahl überlebender IgG- und IgM-sezernierender Plasmazellen wurde an Tag 3 mittels ELISpot bestimmt und in Bezug gesetzt auf die Anzahl von ASZ an Tag 0. Gezeigt sind die Mittelwerte von 5-fach-Ansätzen eines von 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.2 IL-6 vermitteltes Überleben isolierter Knochenmarks-Plasmazellen verschiedener Mausstämme

In den Kulturexperimenten zeigte sich, dass NZB/W Plasmazellen besser unter IL-6 Bedingungen überlebten als C57BL/6 Plasmazellen. Um zu untersuchen, ob diese verbesserte Überlebensfähigkeit charakteristisch für autoimmune NZB/W Mäuse ist, wurden die Überlebensraten von Knochenmarks-Plasmazellen dieser Mäuse bei verschiedenen IL-6 Konzentrationen zusätzlich mit denen aus nicht-autoimmunen C57BL/6 und BALB/c Mäusen verglichen. Die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 7 zusammengefasst. Die maximale Überlebensrate an Tag 3 ohne Zugabe von IL-6 betrug 5,1 +/- 1,6 %. Bei einer IL-6-Konzentration von 0,1 ng/ml überlebten mit 22,4 +/- 6,1 % signifikant mehr

NZB/W Plasmazellen als Plasmazellen aus C57BL/6 Mäusen (4,9 +/- 3,4 %) und vergleichbar viele Plasmazellen aus BALB/c Mäusen (19,8 %; aufgrund der in einigen Experimenten geringen Anzahl gewonnener Plasmazellen ist von BALB/c Plasmazellen hier nur ein Wert vorhanden). Die Überlebensrate bei einer Konzentration von 1 ng/ml IL-6 betrug 35,2 +/- 7,5 % bei NZB/W Plasmazellen, war mit 16,6 +/- 10,5 % bei C57BL/6 Plasmazellen signifikant geringer und belief sich auf 31,1 +/- 10,5 bei BALB/c Plasmazellen (kein signifikanter Unterschied zu NZB/W Plasmazellen). Bei einer IL-6 Konzentration von 10 ng/ml belief sich die Überlebensrate bei aus NZB/W Mäusen gewonnenen Plasmazellen auf 45,8 +/- 10 %, war signifikant geringer bei C57BL/6 Plasmazellen (16,9 +/- 9,6 %) und betrug bei Plasmazellen aus BALB/c Mäusen 27,4 +/- 2,0 % (aufgrund der in einigen Experimenten geringen Anzahl gewonnener Plasmazellen sind von BALB/c Plasmazellen hier nur zwei Werte vorhanden und somit keine Signifikanzen berechenbar).

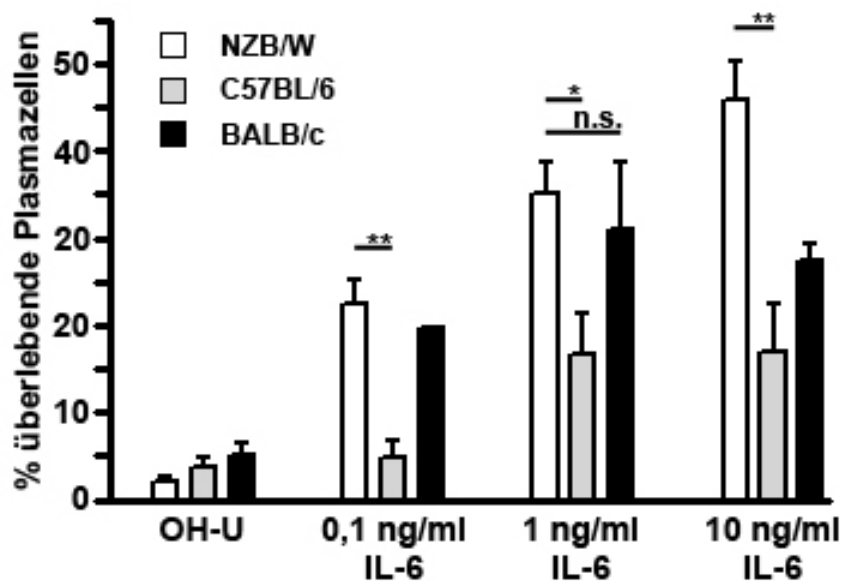


Abb. 7: IL-6 vermitteltes Überleben isolierter NZB/W, C57BL/6 und BALB/c Knochenmarks-Plasmazellen in Kultur. Reife CD138(++) B220(-) MHCII(-) Plasmazellen wurden mittels FACS-Sorter isoliert und in Gegenwart des Proliferationshemmers Hydroxyurea (OH-U) und verschiedener IL-6 Konzentrationen kultiviert. Die Anzahl überlebender IgG- und IgM-sezernierender Plasmazellen wurde an Tag 3 mittels ELISpot bestimmt und in Bezug gesetzt auf die Anzahl von ASZ an Tag 0. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

Die hier beschriebenen Unterschiede zwischen Plasmazellen verschiedener Mausstämme zeigten sich in vergleichbarem Ausmaß bei Experimenten, die mit Milz-Plasmazellen durchgeführt wurden, wobei die Überlebensraten insgesamt geringer waren (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend war das IL-6 vermittelte Überleben bei den Plasmazellen aus NZB/W und BALB/c Mäusen deutlich stärker ausgeprägt als bei solchen, die aus C57BL/6 Mäusen isoliert wurden.

3.3 Analyse des Plasmazell-Kompartiments von IL-6^{-/-} Mäusen

Die Resultate aus den Kulturexperimenten ergaben, dass IL-6 von allen getesteten Plasmazell-Überlebensfaktoren die deutlichsten Effekte hatte, unabhängig vom Mausstamm. Um zu überprüfen, ob IL-6 auch *in vivo* essentiell für das Überleben von Plasmazellen ist, wurde das Plasmazell-Kompartiment von IL-6^{-/-} Mäusen nach 14-tägiger BrdU-Fütterung zur Unterscheidung kurz- und langlebiger Plasmazellen untersucht. Die untersuchten IL-6^{-/-} Mäuse hatten den genetischen Hintergrund von C57BL/6 Mäusen, als Kontrollen dienten entsprechend gleich alte Wildtyp-C57BL/6 Tiere. IL-6^{-/-} Mäuse auf dem Hintergrund der BALB/c oder NZB/W Mäuse, deren Plasmazellen unter IL-6 Bedingungen noch besser überlebten, waren leider nicht verfügbar.

Wie in Abb. 8a gezeigt ist, unterschieden sich die IL-6^{-/-} Tiere hinsichtlich der absoluten Anzahl BrdU(+) kurzlebiger Plasmazellen in der Milz nicht von den C57BL/6 Wildtypieren ($0,9 \pm 0,2 \times 10^5$ in IL-6^{-/-} gegenüber $0,8 \pm 0,7 \times 10^5$ im Wildtyp). Ebenso zeigten sich in diesem Organ keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der absoluten Anzahl langlebiger BrdU(-) Plasmazellen ($1,0 \pm 0,3 \times 10^5$ in IL-6^{-/-} gegenüber $0,8 \pm 0,8 \times 10^5$ im Wildtyp, Abb. 8b). In nicht-autoimmunen Tieren überleben Plasmazellen hauptsächlich im Knochenmark. Ebenso wie in der Milz unterschied sich die absolute Anzahl BrdU(+) kurzlebiger

Plasmazellen in den IL-6^{-/-} Tieren im Knochenmark nicht von den Wildtypieren (2,8 +/- 1,3 x 10⁵ in IL-6^{-/-} Tieren gegenüber 6,0 +/- 9,0 x 10⁵ im Wildtyp, Abb. 8c). Auch gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der absoluten Anzahl BrdU(-) langlebiger Plasmazellen (4,9 +/- 2,1 x 10⁵ in IL-6^{-/-} Tieren gegenüber 8,6 +/- 8,0 x 10⁵ im Wildtyp, Abb. 8d). Demnach hat die Abwesenheit des Überlebensfaktors IL-6 keine messbaren Auswirkungen auf kurzlebige und langlebige Plasmazellen in Milz und Knochenmark.

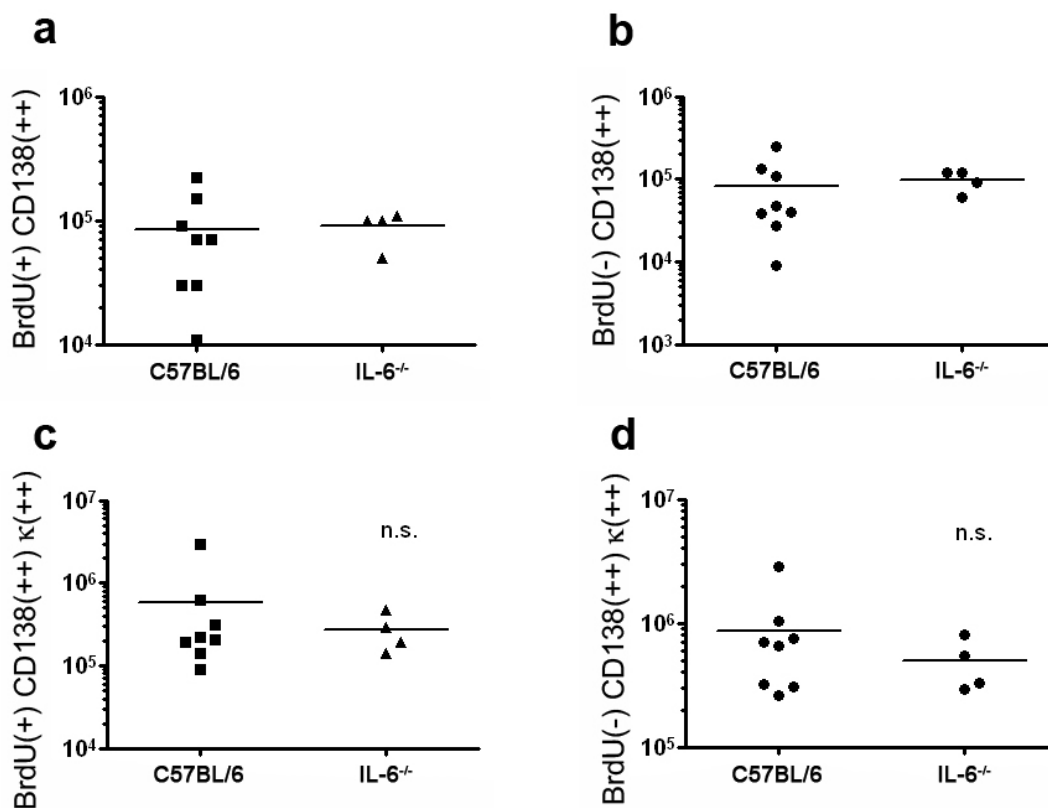


Abb. 8: Anzahl kurz- und langlebiger Plasmazellen in Milz und Knochenmark von IL-6^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind die absoluten Anzahlen von kurz- und langlebigen Plasmazellen der Milz (a und b) und des Knochenmarks (c und d). Die Frequenzen kurz- und langlebiger Plasmazellen wurden nach 14-tägiger BrdU-Fütterung durchflusszytometrisch bestimmt und daraus die absoluten Anzahlen kurzlebiger und langlebiger Plasmazellen errechnet. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

3.4 Analyse des Plasmazell-Kompartiments von $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen

$Fc\gamma$ Rezeptoren binden den Fc-Teil von Immunglobulinen der Klasse IgG, vermitteln aktivierende oder auch inhibitorische Signale und tragen so zur Regulation der Immunantwort bei. Beim $Fc\gamma RIIb$, dem einzigen Fc-Rezeptor, der auf B-Zellen und Plasmazellen exprimiert wird, handelt es sich um einen inhibitorischen Rezeptor (87-89). Es ist bekannt, dass Mäuse, die keinen funktionellen $Fc\gamma RIIb$ besitzen, Autoantikörper bilden und eine Lupus-ähnliche Erkrankung entwickeln (90, 91). Außerdem exprimieren autoimmune NZB/W Mäuse einen defizienten $Fc\gamma RIIb$ (89, 92). Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern das langlebige Plasmazell-Kompartiment durch das Fehlen des inhibitorischen $Fc\gamma RIIb$ in entsprechenden knock-out Tieren beeinflusst ist. Hierfür wurden 4 bis 6 Monate alte $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tiere auf C57BL/6-Hintergrund und entsprechende Kontrolltiere 14 Tage mit BrdU gefüttert und dann das Plasmazell-Kompartiment durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abb. 9a dargestellt, unterschied sich die absolute Anzahl BrdU(+) kurzlebiger Plasmazellen der Milz nicht zwischen Wildtyp-Tieren ($0,8 \pm 0,7 \times 10^5$) und $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tieren ($1,9 \pm 2,1 \times 10^5$). Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied in der absoluten Anzahl BrdU(-) langlebiger Plasmazellen ($0,8 \pm 0,8 \times 10^5$ in C57BL/6 Milzen gegenüber $2,2 \pm 2,1 \times 10^5$ in den $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tieren; $p = 0,0813$, Abb. 9b). Vergleichbar zur Milz konnten auch im Knochenmark keine signifikanten Unterschiede zwischen $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tieren und C57BL/6- Wildtyp-Tieren gefunden werden. So war die Anzahl BrdU(+) Plasmablasten in den $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen mit $3,8 \pm 2,7 \times 10^5$ vergleichbar der in Kontrolltieren ($5,9 \pm 9,0 \times 10^5$, Abb. 9c). Auch bei der absoluten Anzahl langlebiger BrdU(-) Plasmazellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen ($6,7 \pm 2,2 \times 10^5$) und den C57BL/6 Mäusen ($8,6 \pm 8,0 \times 10^6$, Abb. 9d) beobachtet werden.

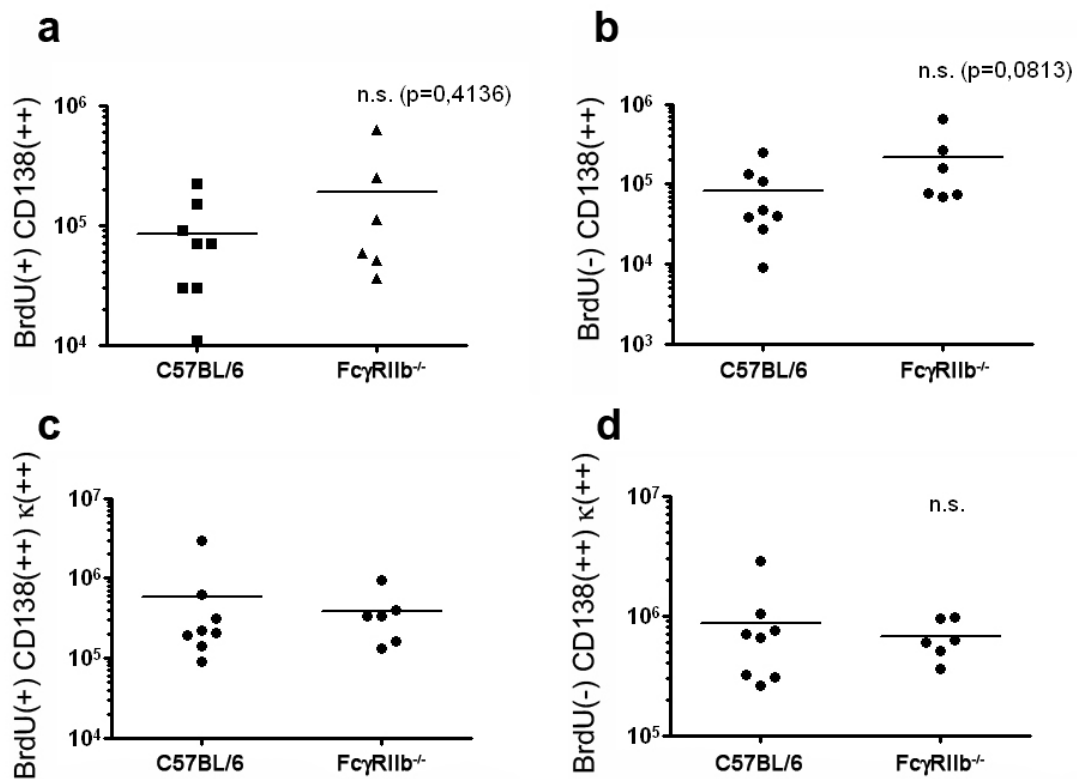


Abb. 9: Anzahl kurz- und langlebiger Plasmazellen in Milz und Knochenmark von Fc γ RIIb^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind die absoluten Anzahlen von kurz- und langlebigen Plasmazellen der Milz (a und b) und des Knochenmarks (c und d). Die Frequenzen kurz- und langlebiger Plasmazellen wurden nach 14-tägiger BrdU-Fütterung durchflusszytometrisch bestimmt und daraus die absoluten Anzahlen kurzlebiger und langlebiger Plasmazellen errechnet. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

Das Fehlen des inhibitorischen Fc γ Rezeptors II b hat bei den hier untersuchten Mäusen im Alter von 4 bis 6 Monaten somit keine messbaren Auswirkungen auf das lang- und kurzlebige Plasmazell-Kompartiment sowohl der Milz als auch des Knochenmarks.

3.5 Verhältnis von kurz- und langlebigen Plasmazellen in Lymphknoten, Milz und Knochenmark von NZB/W Mäusen

Wie unter 3.1.1 beschrieben, findet sich in der Milz von NZB/W Mäusen eine stark erhöhte Anzahl langlebiger Plasmazellen. Sollte dem eine erhöhte Plasmazell-autonome Überlebensfähigkeit zu Grunde liegen, würde man in den Lymphknoten dieser Tiere ein ähnliches Verhältnis zwischen kurz- und langlebigen Plasmazellen erwarten, wie es in der Milz gefunden wird. Daher wurde das Plasmazell-Kompartiment der Milz sowie der superfiziellen und mesenterialen Lymphknoten von NZB/W Mäuse nach 14-tägiger BrdU-Fütterung bestimmt.

Wie in Abb. 10 dargestellt ist, waren in der Milz 46,85 +/- 8,84 % aller Plasmazellen BrdU(-), also langlebig. Im Vergleich dazu betrug der Anteil langlebiger Plasmazellen in den superfiziellen Lymphknoten lediglich 8,03 +/- 3,6 % und in den mesenterialen 11,45 +/- 3,9 %. Zum Vergleich ist zusätzlich das Knochenmark abgebildet, hier betrug der Anteil langlebiger Plasmazellen 62,86 +/- 8,64 %. Aufgrund der geringen Zellzahlen und des hohen Zellverlustes während der BrdU-FACS-Färbung konnte das Plasmazell-Kompartiment anderer Lymphknoten nicht bestimmt werden.

Ein erhöhtes Überleben von Plasmazellen konnte neben dem Knochenmark somit lediglich in der Milz der NZB/W Mäuse festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die stromale Umgebung dieses Organs in NZB/W Mäusen im Vergleich zu den untersuchten Lymphknoten Besonderheiten aufweist, die das außergewöhnliche Überleben von Plasmazellen auf die Milz beschränkt.

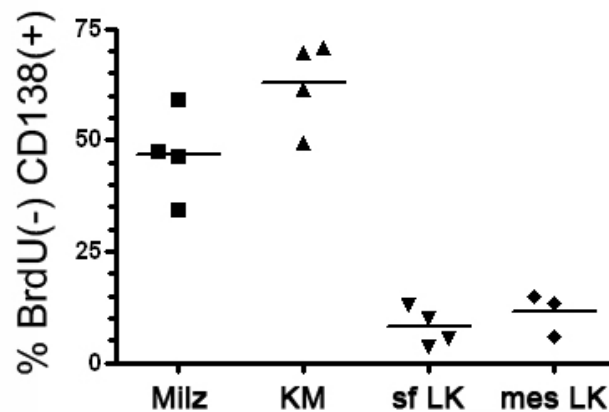


Abb. 10: Prozentualer Anteil langlebiger Plasmazellen in verschiedenen lymphatischen Organen von NZB/W Mäusen. NZB/W Mäuse wurden 14 Tage mit BrdU gefüttert und die Frequenz langlebiger Plasmazellen von allen Plasmazellen der Milz, des Knochenmarks (KM) und der superfiziellen (sf) und mesenterialen (mes) Lymphknoten (LK) durchflusszytometrisch bestimmt. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

3.6 Untersuchungen der Plasmazell-Umgebung in der Milz von NZB/W Mäusen

Es wird davon ausgegangen, dass Plasmazellen im Gewebe zum Überleben eine besondere Mikroumgebung (stromale Nische) benötigen (29). Über die genaue Zusammensetzung der Faktoren und Signale, die diese Nische definieren, ist bisher wenig bekannt. In den folgenden Untersuchungen wurde überprüft, ob die stromale Umgebung der Milz von NZB/W Mäusen Besonderheiten aufweist, die eine qualitative oder quantitative Veränderung von Plasmazell-Überlebensnischen zur Folge haben könnten. Um die Mikroumgebung von Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von Milzen dieser Tiere nach Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Autoimmunerkrankung SLE unter anderem durch eine Hyperreaktivität der B-Zellen gekennzeichnet. Dies ist in

älteren Tieren bereits histologisch an der großen Anzahl von Keimzentren in der Milz erkennbar. Um einen Überblick der Milz von NZB/W Mäusen zu vermitteln, sind in Abb. 11 das Übersichtsbild einer 6 Wochen (a) und im Vergleich dazu einer 8 Monate alten Maus (b) gezeigt (gezeigt ist jeweils etwa die Hälfte einer Milz).

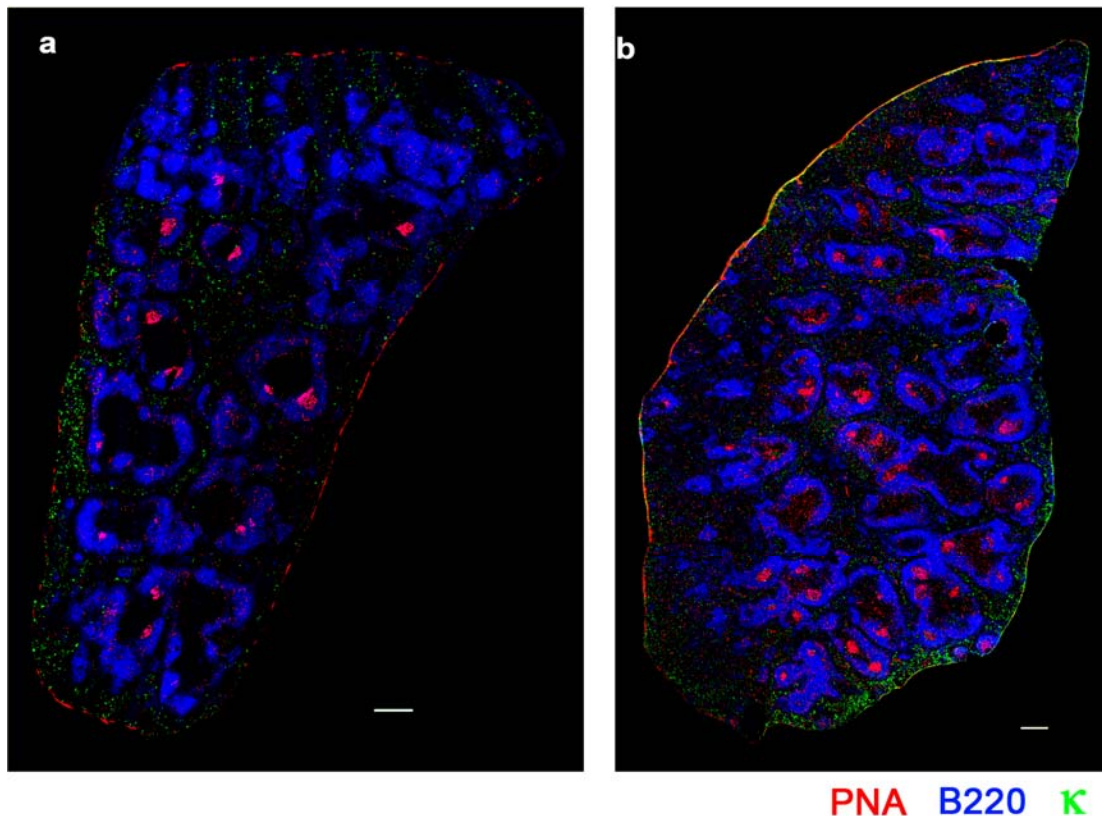


Abb. 11: Übersichtsbilder der Milz einer jungen und einer alten NZB/W Maus. Milzschnitte eines 6 Wochen (a) und im Vergleich dazu eines 8 Monate (b) alten NZB/W Weibchens wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. B-Zell-Follikel sind nach B220-Färbung blau dargestellt, Keimzentren nach PNA-Färbung rot. Die κ (++) Plasmazellen sind grün gezeigt. Balken: 300 μ m.

Die folliculären Bereiche sind nach Färbung der B-Zellen mit B220 blau dargestellt. Keimzentren, die durch PNA-Färbung rot sichtbar gemacht sind, lassen sich in den alten Tieren häufiger in den B-Zell-Arealen finden als in jungen Tieren. Plasmazellen, in grün gezeigt nach Färbung der κ -leichten Kette der

intrazellulären Antikörpermoleküle, sind in den extrafollikulären Bereichen lokalisiert.

3.6.1 Lokalisation kurz- und langlebiger Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen

Langlebige Plasmazellen finden sich in nicht-autoimmunen Tieren in der roten Pulpa, oft liegen sie dort an faserähnlichen Strukturen. Um die Positionierung langlebiger Zellen in der Milz von NZB/W Mäusen zu untersuchen, wurden Tiere für 14 Tage mit BrdU gefüttert und einen Tag nach Absetzen der BrdU-Fütterung getötet. Abb. 12a zeigt die Milz einer 6 Monate alten NZB/W Maus mit BrdU(+) (grüner Kern) kurz- und BrdU(-) langlebigen Plasmazellen (rote Färbung für CD138) und B220+ B-Zellen (blaue Färbung). Alternativ erfolgte eine sogenannte BrdU-Puls-Fütterung. Hierbei wurden die Tiere für 3 Wochen kontinuierlich gefüttert und das BrdU dann für mindestens 2 Wochen abgesetzt. Ein Teil der langlebigen Plasmazellen ist demnach durch einen grünen Kern zu erkennen (Abb. 12b). Die Plasmazellen lagen auch in Milzen dieser Tiere im extrafollikulären Bereich, wobei kurz- und langlebige Plasmazellen räumlich nicht von einander getrennt gefunden wurden. Oft fanden sich die Plasmazellen in Anhäufungen bestehend aus mehreren Zellen (kurz- und langlebige gemischt), ebenso auch singulär im stromalen Gewebe. Viele Plasmazellen akkumulierten entlang faserähnlicher Strukturen (Abb. 12b). Auch hier konnte keine vorrangige Anlagerung von kurz- oder langlebigen Plasmazellen gefunden werden.

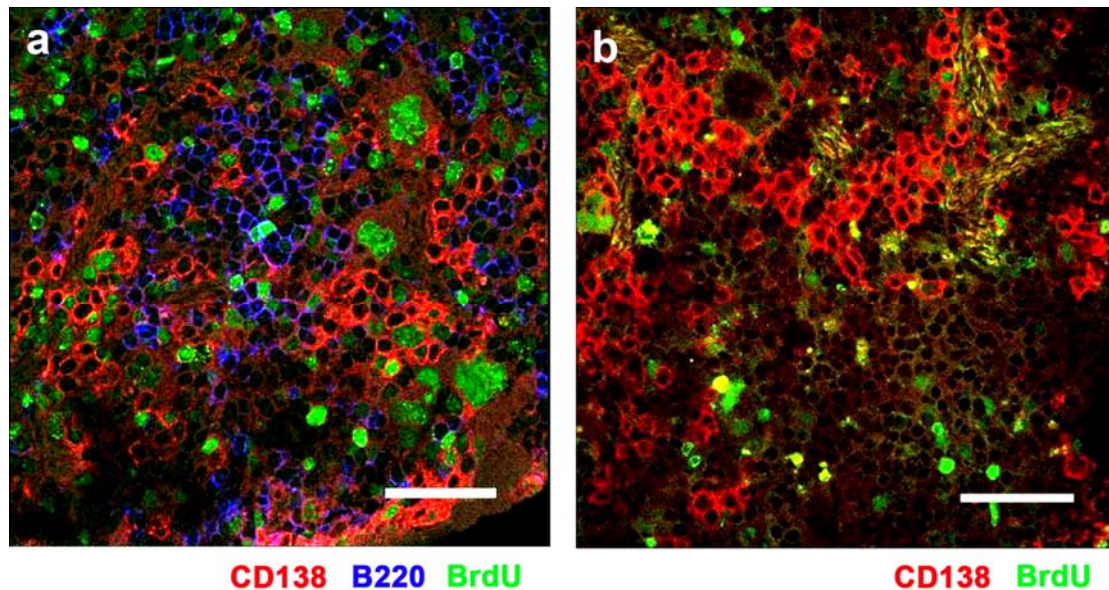


Abb. 12: Lokalisation kurz- und langlebiger Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen. NZB/W Mäuse wurden für 14 Tage mit BrdU gefüttert, gefolgt von einem Tag ohne Gabe (a). Die Mehrheit der BrdU(-) Plasmazellen sind demnach langlebige Plasmazellen. B220(+) B-Zellen sind blau dargestellt. Alternativ erfolgte die Fütterung in Form eines Pulsexperimentes über einen Zeitraum von 3 Wochen gefolgt von 2 Wochen ohne Fütterung (b). Entsprechend ist ein Teil der langlebigen Plasmazellen durch einen grünen Zellkern markiert. Plasmazellen sind nach Färbung von CD138 rot dargestellt. Balken: 47,62 μm .

3.6.2 Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit VCAM-1(+) Zellen

Es ist beschrieben, dass ein Großteil der Plasmazellen im Knochenmark nicht-autoimmuner BALB/c Mäuse neben SDF-1 α produzierenden, VCAM-1(+) retikulären Stromazellen liegen (32). Plasmazellen prägen den entsprechenden Liganden für VCAM-1, VLA-4 aus, außerdem den SDF-1-Rezeptor CXCR4. Da die retikulären VCAM-1(+) Zellen vermutlich eine wichtige Rolle für langlebige Plasmazellen spielen, sollte untersucht werden, ob die Plasmazellen auch in der Milz von NZB/W Mäusen mit VCAM-1(+) Zellen ko-lokalisieren. Wie in Abb. 13a und b gezeigt ist, waren nahezu alle CD138(+) Plasmazellen (rote Färbung) mit VCAM-1(+) stromalen Zellen (blaue Färbung) assoziiert. Follikuläre Bereiche sind in grün nach B220-Färbung gezeigt. Da allerdings ein sehr großer Teil der Zellen in der roten Pulpa VCAM-1(+) ist, ist die Aussagekraft dieser Experimente begrenzt.

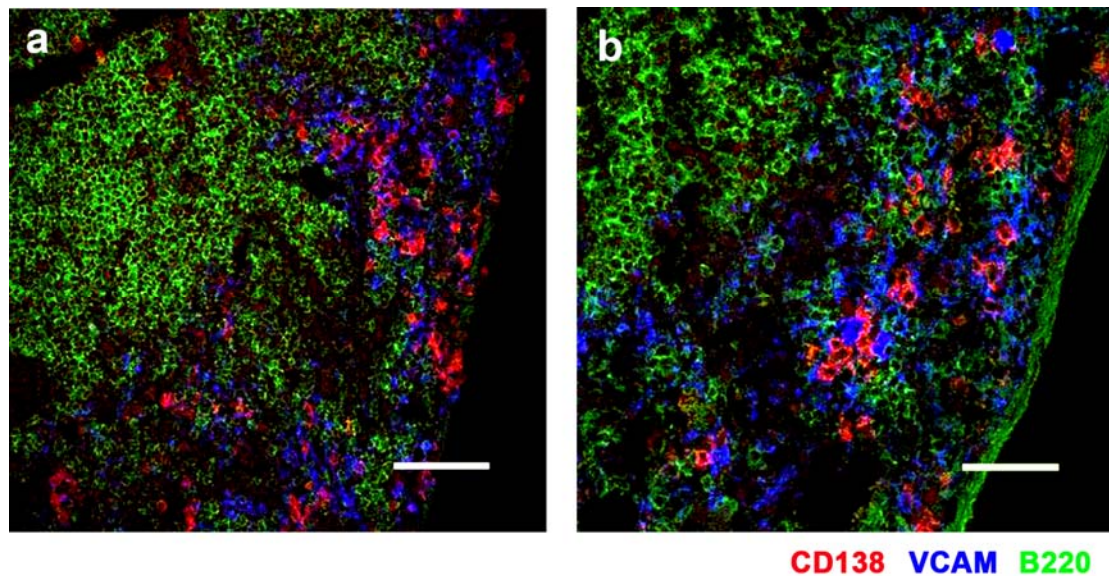


Abb. 13: Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit VCAM-1(+) Zellen in der Milz von NZB/W Mäusen. Milzschnitte von NZB/W Mäusen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Plasmazellen sind nach Färbung von CD138 rot, VCAM-1(+) Zellen blau und B220(+) B-Zellen grün dargestellt. Abb. b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. a. Balken: 75 μm in a, 47,62 μm in b.

3.6.3 Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit SDF-1 α Signalen

Die von Tokoyoda et al. beschriebenen retikulären VCAM-1(+) Zellen, mit denen Knochenmarks-Plasmazellen assoziiert sind, produzieren SDF-1 α (32). Plasmablasten und Plasmazellen tragen den entsprechenden Rezeptor auf ihrer Oberfläche (15). Während Plasmablasten gegen SDF-1 α wandern, haben Plasmazellen die migratorische Fähigkeit verloren. Diesen Zellen dient SDF-1 α hingegen als Überlebensfaktor, wie in Kulturexperimenten gezeigt wurde (28). Somit lag es nahe, histologisch zu untersuchen, ob Plasmazellen auch in der Milz von NZB/W Mäusen mit SDF-1 α Signalen assoziiert sind. Um die komplette Mikroumgebung der Plasmazellen zu untersuchen und da die SDF-1 α Signale in der Histologie oft sehr punktuell waren, wurden dreidimensionale Bilder angefertigt. Die hierfür verwendeten Milzschnitte hatten eine Dicke von 25 μm . In Abb. 14a ist exemplarisch eine Mikroskopaufnahme in Frontal- und Seitenansicht gezeigt, in grün sind Plasmazellen (angefärbt mit anti- κ -leichte Kette) dargestellt

und in rot die SDF-1 α Färbung. Die entsprechende Isotyp-Kontrolle zeigte keine Färbung (Abb. 14b). Jeweils 30 \pm 5 Plasmazellen von vier verschiedenen Individuen wurden in Hinblick auf ihre Assoziation mit SDF-1 α Signalen untersucht. Von diesen Plasmazellen waren 81,3 \pm 5,8 % mit SDF-1 α Signalen assoziiert. Lediglich bei 18,7 \pm 5,8 % konnte keine SDF-1 α Färbung gefunden werden (Abb. 14c).

Wie unter 3.5 beschrieben, sind in den Milzen von NZB/W Mäusen etwa 45 % der Plasmazellen langlebig. SDF-1 α Signale konnten hingegen bei über 80 % aller Plasmazellen gefunden werden. Somit scheint das Vorhandensein dieses Chemokins in der roten Pulpa der Milz von NZB/W Mäusen kein limitierender Faktor für das Plasmazell-Überleben zu sein.

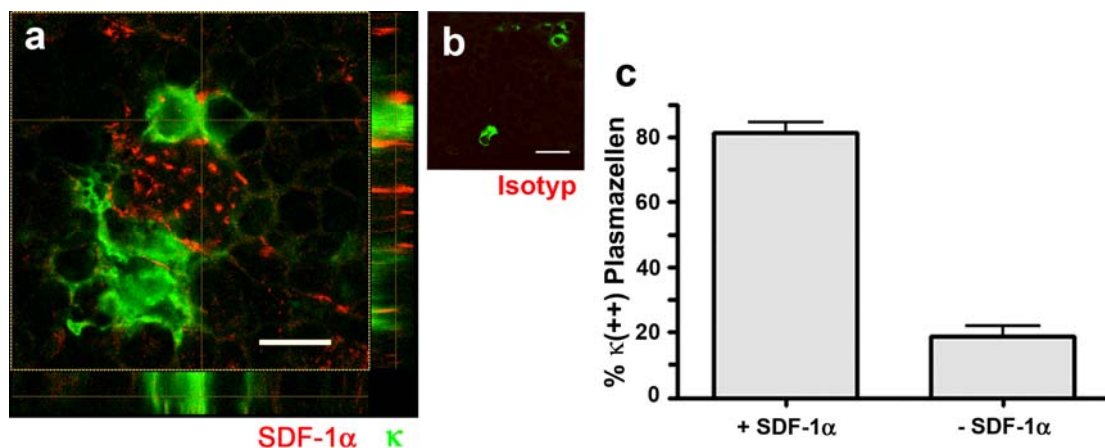


Abb. 14: Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit SDF-1 α Signalen in der Milz von NZB/W Mäusen. 25 μ m dicke Milzschnitte von NZB/W Mäusen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen κ -leichte Kette zur Färbung von Plasmazellen (grün) und SDF-1 α (rot) (a) bzw. mit der entsprechenden Isotypkontrolle (b) gefärbt. Am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurden dreidimensionale Aufnahmen angefertigt. Die Anzahl der Plasmazellen (n = 30 \pm 5 je Individuum) mit bzw. ohne Kontakt zu SDF-1 α Signalen wurde auf Aufnahmen von 4 verschiedenen Individuen gezählt (c). Balken: 11,28 μ m.

3.7 Untersuchungen zur Rolle von Gr-1 positiven myeloiden Zellen für das Plasmazell-Überleben

Murine Knochenmarks-Plasmazellen exprimieren die mRNA für das Chemokin MIP-1 α (93). Der Rezeptor für MIP-1 α , CCR5, wird von myeloiden Zellen auf der Oberfläche ausgeprägt. Es ist somit denkbar, dass auch Plasmazellen in der NZB/W Milz über die Produktion von MIP-1 α myeloide CCR5(+) Zellen anlocken, die für das Überleben der Plasmazelle eine Rolle spielen.

3.7.1 Histologische Bestimmung der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit Gr-1 positiven myeloiden Zellen

Um Zellen der myeloiden Linie in der Histologie anzufärben wurde der Marker Gr-1 verwendet. Gr-1 wird von allen myeloiden Zellen exprimiert, besonders stark auf Granulozyten. Eine exemplarische Färbung einer NZB/W Milz ist in Abb. 15a dargestellt. Bei der Analyse 4 verschiedener Individuen fanden sich 32,8 \pm 8,3 % aller gewerteten Plasmazellen (n = 188 \pm 34 je Maus) mit Gr-1(+) Zellen assoziiert (Abb. 15b). Da die Analyse nur anhand zweidimensionaler Bilder durchgeführt wurde, konnten Gr-1(+) Zellen, die außerhalb der Schnittebene mit den Plasmazellen assoziiert waren, nicht detektiert werden. Daher gibt der Wert von ca. 30 % nur eine untere Grenze an. Der wirkliche Anteil der Plasmazellen, die mit Gr-1 Zellen Kontakt haben, liegt höher und entspricht somit ungefähr dem Anteil langlebiger Plasmazellen (etwa 45 %, siehe 3.5). Eine präferentielle Assoziation langlebiger k(++) Plasmazellen mit Gr-1(+) Zellen konnte bei der Analyse von Milzschnitten BrdU-gefütterter NZB/W Mäuse nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

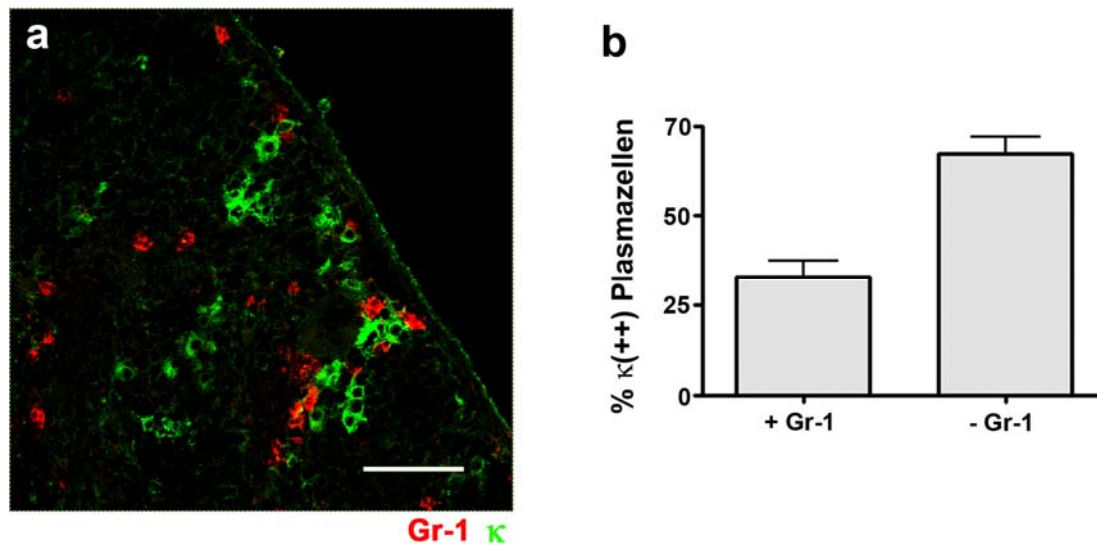


Abb. 15: Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit Gr-1(+) Zellen in der Milz von NZB/W Mäusen. Milzschnitte von NZB/W Mäusen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen κ -leichte Kette zur Färbung von Plasmazellen (grün) und Gr-1 zur Visualisierung myeloider Zellen (rot) gefärbt und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert (a). Die Anzahl der Plasmazellen ($n = 188 \pm 34$ je Individuum) mit und ohne Kontakt zu Gr-1(+) Zellen wurde auf Aufnahmen von 4 verschiedenen Individuen gezählt (b). Balken: $47,62 \mu\text{m}$.

3.7.2 Auswirkungen einer Depletion Gr-1 positiver myeloider Zellen auf das Plasmazell-Kompartiment

Um zu untersuchen, ob die in der Histologie beobachtete Assoziation von Plasmazellen mit Gr-1(+) myeloiden Zellen für das Überleben der Plasmazellen eine Rolle spielt, wurde die Auswirkung der Depletion Gr-1(+) Zellen auf das Plasmazell-Kompartiment untersucht. Hierfür wurden NZB/W Mäuse zur Unterscheidung kurz- und langlebiger Plasmazellen 14 Tage mit BrdU gefüttert. Die Depletion der Gr-1(+) Zellen erfolgte durch wiederholte Injektion eines depletierenden anti-Gr-1 Antikörpers (Klon RB6-8C5) 3 und 6 Tage vor der Analyse. Als Kontrollen dienten eine Gruppe von Tieren, die mit einem nicht-depletierenden Antikörper des gleichen Isotyps behandelt wurden (anti-MHCII, Klon M5/114), sowie eine Gruppe, die mit PBS behandelt wurden.

Trotz der Eliminierung der Gr-1(+) Zellen in der Milz blieben die absoluten Zahlen kurz- und langlebiger Plasmazellen in der Milz unverändert (Daten nicht gezeigt). Auch im Knochenmark waren keine Effekte auf die Plasmazellen zu beobachten. Die Vermutung, dass die in der Histologie beobachtete Assoziation von über 30% der Plasmazellen mit Gr-1 Zellen eine biologische Relevanz für das Überleben von Plasmazellen hat, wurde somit durch die Depletionsexperimente *in vivo* nicht unterstützt.

3.8 Untersuchungen zur Rolle von CD41 positiven Megakaryozyten für das Plasmazell-Überleben

In nicht-autoimmunen Mäusen finden sich langlebige Plasmazellen hauptsächlich im Knochenmark. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass in BALB/c Mäusen mehrere Wochen nach Sekundärimmunisierung mit dem TD-Antigen Ovalbumin etwa 30 % der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen mit CD41(+) Megakaryozyten assoziiert sind. Megakaryozyten sind sehr große Zellen (Durchmesser 20 - 50 μm), die mit zunehmenden Reifegrad mehrkernig werden (Ploidie bis zu 128N) und durch die Produktion der Thrombozyten an der Blutgerinnung beteiligt sind. Sie finden sich hauptsächlich im Knochenmark, wobei die Frequenz unter 0,1 % beträgt; in der Milz sind Megakaryozyten noch seltener (94, 95). Megakaryozyten können verschiedene Zytokine produzieren, die das Überleben von Plasmazellen stimulieren. Von humanen Knochenmarks-Megakaryozyten weiß man, dass sie *in vitro* das Zytokin IL-6 in signifikanten Mengen sezernieren (96, 97). Außerdem konnte in diesen Zellen APRIL nachgewiesen werden und zumindest auf mRNA-Ebene die Expression von TNF- α (96, 98). Zudem ist bekannt, dass Megakaryozyten-Vorläufer, ebenso wie Plasmablasten, gegen das Chemokin SDF-1 α wandern und dadurch im Gewebe positioniert werden (15, 99). Diese Eigenschaften weisen Megakaryozyten als

einen Zelltyp aus, der für das Überleben von Plasmazellen eine Rolle spielen könnte.

3.8.1 Histologische Bestimmung der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit CD41 positiven Megakaryozyten

Zunächst wurde histologisch untersucht, ob Megakaryozyten in der Milz von NZB/W Mäusen mit Plasmazellen assoziiert waren. Hierfür wurden Milzschnitte mit einem Antikörper gegen CD41 angefärbt. CD41 wird nahezu ausschließlich von Zellen der Megakaryozytenlinie exprimiert, allerdings bereits ab einem frühen Entwicklungsstadium. Somit ist die Unterscheidung zwischen reifen Megakaryozyten und deren Vorläufern anhand der CD41-Färbung nicht möglich, Antikörper gegen einen anderen Marker, der selektiv auf reifen Megakaryozyten ausgebildet wird, sind allerdings nicht verfügbar. Auch die von den Megakaryozyten abgeschnürten Thrombozyten besitzen den Marker CD41. Da diese aber nur maximal 4 µm groß sind, erscheinen sie in der Histologie als diffuse Färbung, die sich deutlich von der Megakaryozyten-Färbung unterscheidet. Zur Identifizierung von Plasmazellen wurde κ verwendet, die B220-Färbung diente zur Orientierung in der Milz. In Abb. 16a ist ein Ausschnitt der Milz einer 6 Wochen alten NZB/W Maus gezeigt. Die großen, rot dargestellten CD41(+) Megakaryozyten sind deutlich zu erkennen; sie befinden sich ebenso wie die Plasmazellen (grün dargestellt) außerhalb der folliculären Bereiche (B-Zellen, blau dargestellt). Ein deutlicher Anteil der Plasmazellen hatte direkten Kontakt mit den CD41(+) Megakaryozyten oder lag in unmittelbarer Nähe zu ihnen.

Für die quantitative Analyse der Mikroskopiedaten zur Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit CD41(+) Megakaryozyten wurden Milzschnitte von 6 und 14 Wochen alten NZB/W Mäusen (jeweils 3 Individuen) angefertigt. In zufällig ausgewählten Ausschnitten wurden dann alle Plasmazellen entsprechend ihrer räumlichen Distanz zum nächsten Megakaryozyten in Gruppen eingeordnet, wobei im Schnitt 286 +/- 40,1 Plasmazellen bewertet wurden. Die Ergebnisse

dieser Zählungen sind in Abb. 16b gezeigt. 30,9 +/- 9,2 % aller Plasmazellen fanden sich in direktem Kontakt zu Megakaryozyten. Zusätzliche 13,2 +/- 3,6 % lagen in unmittelbarer Nähe in Gruppen mit anderen Plasmazellen, von denen einige direkten Kontakt hatten. In der Umgebung von 49,9 +/- 12,4 % der Plasmazellen konnten keine CD41(+) Megakaryozyten gefunden werden und bei 7,2 +/- 2,2 % war die Zuordnung unklar. Da die Analyse mit Mikroskopie-Bildern aus zweidimensionalen Scans durchgeführt wurde, ist die tatsächliche Anzahl von Plasmazellen, die mit Megakaryozyten assoziiert waren, höher als die hier angegebenen Werte.

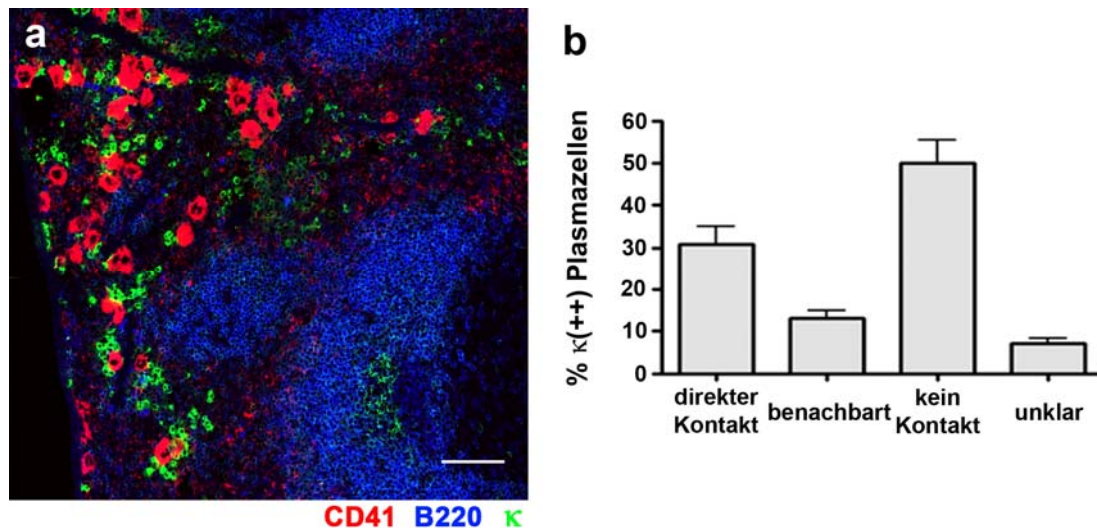


Abb. 16: Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit CD41(+) Megakaryozyten in der Milz von NZB/W Mäusen. Milzschnitte von NZB/W Mäusen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die κ -leichte Kette zur Färbung von Plasmazellen (grün), CD41 zur Visualisierung von Megakaryozyten (rot) und dem B-Zell Marker B220 gefärbt und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert (a). Die Anzahl der Plasmazellen ($n = 286 \pm 40,1$ je Individuum), die direkten Kontakt, in großer Nähe, ohne Kontakt zu CD41(+) Zellen oder deren Position nicht bestimmbar waren, wurde auf Aufnahmen von 6 verschiedenen Individuen gezählt (b). Balken: 75 μ m.

3.8.2 Bestimmung der Anzahl CD41 positiver Megakaryozyten in der Milz autoimmuner NZB/W und NZB Mäuse und nicht-autoimmuner BALB/c und C57BL/6 Mäuse

Megakaryozyten in der Milz nicht-autoimmuner Mäuse sind sehr seltene Zellen. In NZB/W Mäusen ist die Anzahl langlebiger Plasmazellen im Vergleich zu nicht-autoimmunen Tieren um ein vielfaches erhöht (siehe Punkt 3.1.1). Sollten die Megakaryozyten für das Überleben dieser Zellen tatsächlich eine wichtige Rolle spielen, so würde man erwarten, dass auch die Anzahl der Megakaryozyten erhöht ist. Daher wurden Übersichtsbilder von Milzschnitten von etwa 12 Wochen alten NZB, BALB/c und C57BL/6 Mäusen angefertigt (jeweils 4 Individuen) und von jeweils 3 6 und 14 Wochen alten NZB/W Tieren. Die Mikroskopiebilder sind in Abb. 17 dargestellt, wobei jeweils eine halbe Milz gezeigt ist. In der Milz von NZB/W (Abb. 17a, hier 14 Wochen alt) und NZB Mäusen (Abb. 17b) sind deutlich mehr CD41(+) Megakaryozyten (grün dargestellt) vorhanden als in den nicht-autoimmunen BALB/c (Abb. 17c) und C57BL/6 (Abb. 17d) Tieren. Zur Orientierung sind die B-Zell-Follikel mitgefärbt (rote Färbung für B220).

Zum quantitativen Vergleich der Anzahl der CD41(+) Megakaryozyten in den Milzen der verschiedenen Mausstämme wurde die durchschnittliche Anzahl der CD41(+) Riesenzellen, die auf einer Fläche von 10 mm² detektierbar waren, gezählt. Zwischen den 6 und 14 Wochen alten NZB/W Tieren bestand kein signifikanter Unterschied, daher wurden sie in einer Gruppe zusammengefasst. Je Individuum wurden 3 Übersichtsbilder angefertigt. Wie in Abb. 17e dargestellt, fanden sich in den Milzen der autoimmunen NZB/W und NZB Mäuse signifikant mehr CD41(+) Megakaryozyten als in den nicht-autoimmunen BALB/c und C57BL/6 Tieren. NZB/W Mäuse hatten 68,7 +/- 10,0 CD41(+) Riesenzellen je 10 mm², signifikant mehr hatten NZB Mäuse mit 155,3 +/- 46,1. Im Vergleich zu den NZB/W Mäusen hatten BALB/c Milzen mit 22,7 +/- 5,9 etwa 3-mal weniger dieser Zellen auf derselben Fläche und in C57BL/6 Milzen konnten lediglich 12,3 +/- 1,9 CD41(+) Megakaryozyten gefunden werden (etwa 6-mal weniger als in NZB/W Milzen).

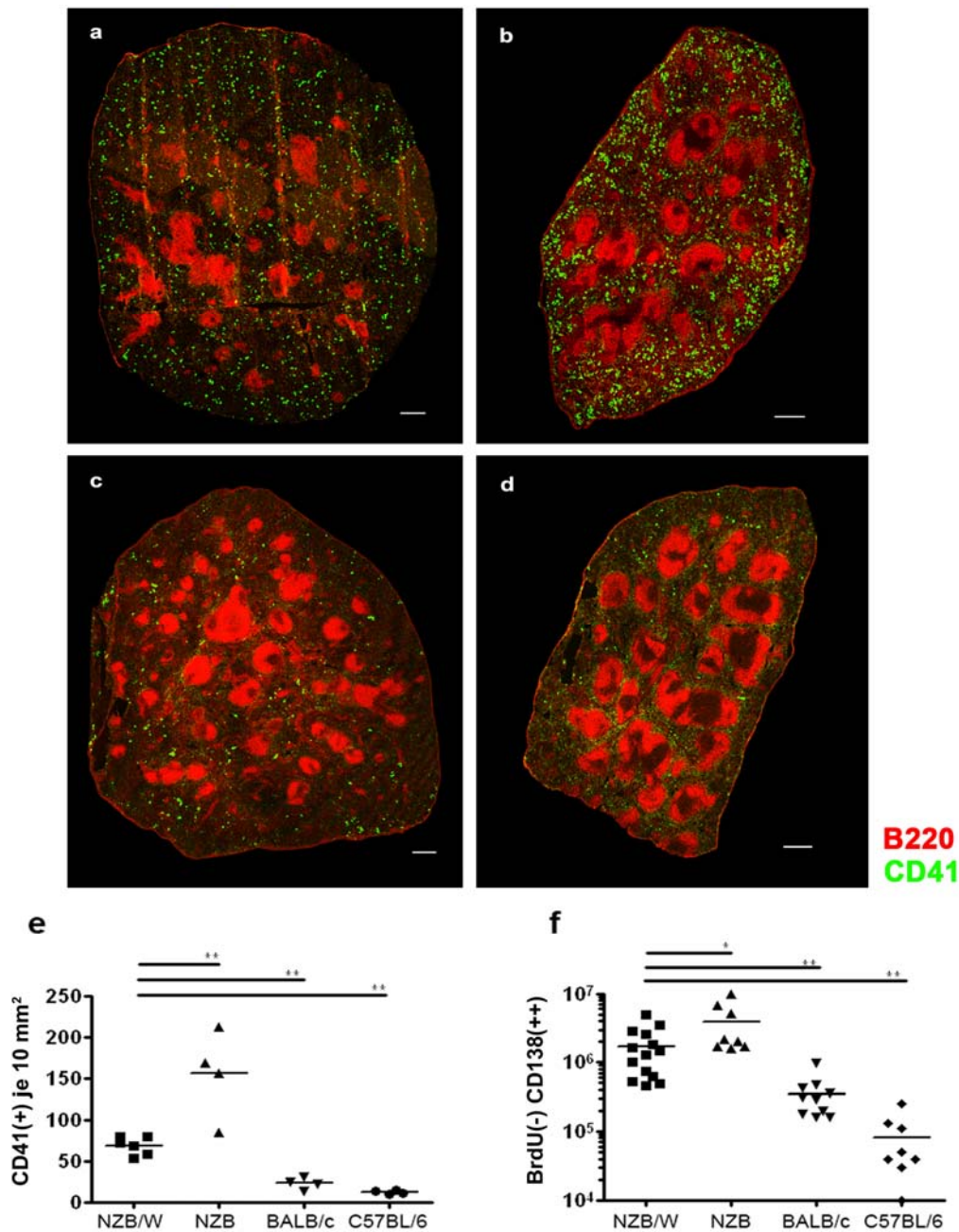


Abb. 17: Bestimmung der Anzahl CD41(+) Megakaryozyten in der Milz verschiedener Mausstämmen. Milzschnitte von 12 bis 14 Wochen alten autoimmunen NZB/W (a) und NZB (b) Mäusen und nicht-autoimmunen BALB/c (c) und C57BL/6 (d) Mäusen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD41 zur Identifizierung von Megakaryozyten und B220 zur Visualisierung der B-Zell Areale gefärbt. Gezeigt sind Übersichtsbilder von jeweils etwa einer halben Milz. Die Anzahl von CD41(+) Zellen, die auf einer Fläche von 10 mm² zu finden war, wurde anhand von jeweils 3 Mikroskopiebildern von 6 (NZB/W) bzw. 4 (NZB, BALB/c und C57BL/6) Individuen ermittelt (e). Die absoluten Anzahlen langlebiger BrdU(-) Plasmazellen in den Milzen dieser Mausstämmen nach 14-tägiger BrdU-Fütterung sind in f nochmals gezeigt. Balken: 300 µm.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Anstieg in der Anzahl langlebiger Plasmazellen in den Milzen der autoimmunen Mäuse (zur Veranschaulichung in Abb. f noch einmal gezeigt) mit dem Anstieg der Anzahl CD41(+) Megakaryozyten korreliert.

3.8.3 Untersuchung der Auswirkung einer Manipulation des Megakaryozyten-Kompartiments durch Injektion von TPO auf die Plasmazellen in BALB/c Mäusen

Aufgrund der gefundenen hohen Assoziation von Plasmazellen mit CD41(+) Megakaryozyten und der Beobachtung, dass die Anzahl beider Zellarten in der Milz autoimmuner Mäuse erhöht ist, stellte sich die Frage, ob ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Zelltypen besteht. Um darauf einen Hinweis zu bekommen, wurde die Auswirkung einer Manipulation des Kompartiments der Megakaryozyten auf das Plasmazell-Kompartiment untersucht.

Es ist beschrieben, dass die Injektion von TPO in BALB/c Mäusen die Megakaryopoese stimuliert. Auf reife Leukozyten hat TPO hingegen keinen direkten Effekt. BALB/c Mäuse wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen und zusätzlich an Tag 17 mit TPO behandelt. Zu den Analysezeitpunkten (Tag 10 und 24) wurde die Anzahl der Megakaryozyten in der Milz dieser Tiere histologisch bestimmt. Die Analyse der Auswirkung auf das Plasmazell-Kompartiment erfolgte anhand der durchflusszytometrischen Messung der MHCII(+) Plasmablasten und der MHCII(-) Plasmazellen.

3.8.3.1 Auswirkungen der TPO-Injektionen auf das Kompartiment der CD41+ Megakaryozyten in der Milz

Die Auswirkung der TPO-Injektionen auf die Anzahl CD41(+) Megakaryozyten in der Milz wurde histologisch untersucht und wie unter 3.8.2 beschrieben quantitativ bestimmt. Abb. 18 zeigt die Anzahl der CD41(+) Riesenzellen an Tag 10 und Tag 24, die durchschnittlich auf einer Fläche von 10 mm² gefunden

werden konnten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren mit $15,3 \pm 8,1$ CD41(+) Megakaryozyten war ihre Anzahl in den behandelten Tieren an Tag 10 signifikant um das 2,7-fache erhöht ($52,4 \pm 13,8$). An Tag 24 waren die Megakaryozyten nicht mehr signifikant erhöht ($16,9 \pm 7,2$).

Die Injektion von TPO führte in der Milz somit zu einer transienten, an Tag 10 sichtbaren Zunahme der Anzahl CD41(+) Megakaryozyten.

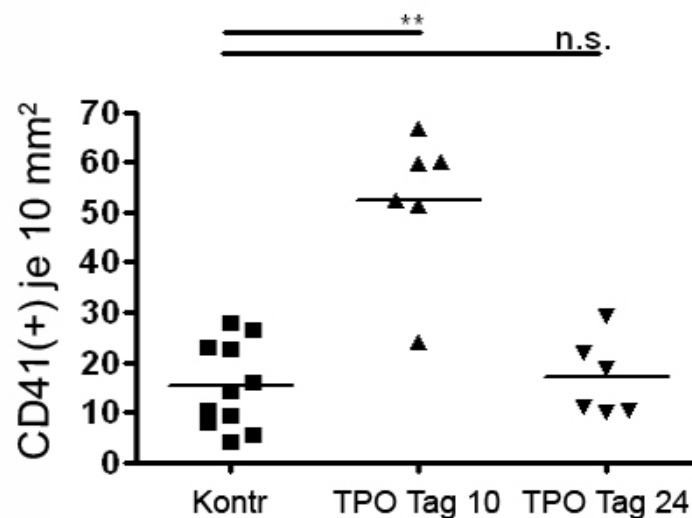


Abb. 18: Stimulation der Megakaryozyten-Entwicklung in der Milz von BALB/c Mäusen durch Injektion von TPO. BALB/c Mäuse wurden mit TPO behandelt (d 0 – d 4, d 17). Zur Bestimmung der Anzahl CD41(+) Megakaryozyten an Tag 10 und Tag 24 wurden Milzschnitte angefertigt, mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD41 gefärbt und die Anzahl dieser Zellen auf Arealen von je 10 mm^2 gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Anzahl CD41(+) Zellen von jeweils 3 untersuchten Gewebeschnitten je Tier. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

3.8.3.2 Auswirkungen der TPO-Injektion auf das Plasmazell-Kompartiment der Milz und des Knochenmarks

Zur Analyse der Auswirkungen der TPO-Injektionen auf das Plasmazell-Kompartiment der Milz wurden Frequenz und Anzahl von MHCII(+) CD138(++) Plasmablasten und reifer, MHCII(-) CD138(++) Plasmazellen durchflusszytometrisch bestimmt. Bei den absoluten Zellzahlen zeigten sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten zwischen den Kontrolltieren und den mit TPO

behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede ($9,4 \pm 1,4 \times 10^7$ in den Kontrolltieren gegenüber $8,0 \pm 1,8 \times 10^7$ in den behandelten an Tag 10 und $8,4 \pm 1,4 \times 10^7$ bzw. $7,9 \pm 1,7 \times 10^7$ an Tag 24; Abb. 19a). Bei den MHCII(+) Plasmablasten hingegen konnte an Tag 10 eine signifikante ($p = 0,026$) Reduktion von $3,1 \pm 0,9 \times 10^5$ in den Kontrolltieren auf $2,0 \pm 0,4 \times 10^5$ in den mit TPO behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 19b). Diese Abnahme erreichte an Tag 24 keinen signifikanten Wert mehr ($2,6 \pm 1,0 \times 10^5$ in den Kontrolltieren gegenüber $2,0 \pm 0,6 \times 10^5$ in den behandelten).

Die absolute Zahl der MHCII(-) Plasmazellen zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede nach Behandlung an Tag 10 ($4,2 \pm 1,6 \times 10^5$ in den Kontrolltieren gegenüber $3,2 \pm 1,0 \times 10^5$ in den behandelten; Abb. 19c). Dafür konnte hier an Tag 24 eine signifikante Reduktion ($p = 0,0022$) um etwa 40 % nach TPO-Injektion festgestellt werden: die absolute Anzahl reifer Plasmazellen betrug in den Kontrolltieren $5,7 \pm 0,8 \times 10^5$ und in den behandelten lediglich $3,3 \pm 0,9 \times 10^5$. Bei der Wiederholung dieses Experiments in unserer Arbeitsgruppe konnten die hier gezeigten Ergebnisse reproduziert werden.

Die Auswirkung der TPO-Injektion auf das Plasmazell-Kompartiment wurde auch im Knochenmark untersucht. Da sich die MHCII-Expression auf Plasmablasten und reifen Plasmazellen aus dem Knochenmark nur gering unterscheidet und daher eine getrennt Analyse nicht möglich war, wurden hier lediglich Unterschiede in der absoluten Anzahl aller CD138(++) k(++) Plasmablasten und Plasmazellen zusammen bewertet. Ebenso wie bei den absoluten Zellzahlen im Knochenmark konnten auch bei den totalen Plasmazellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

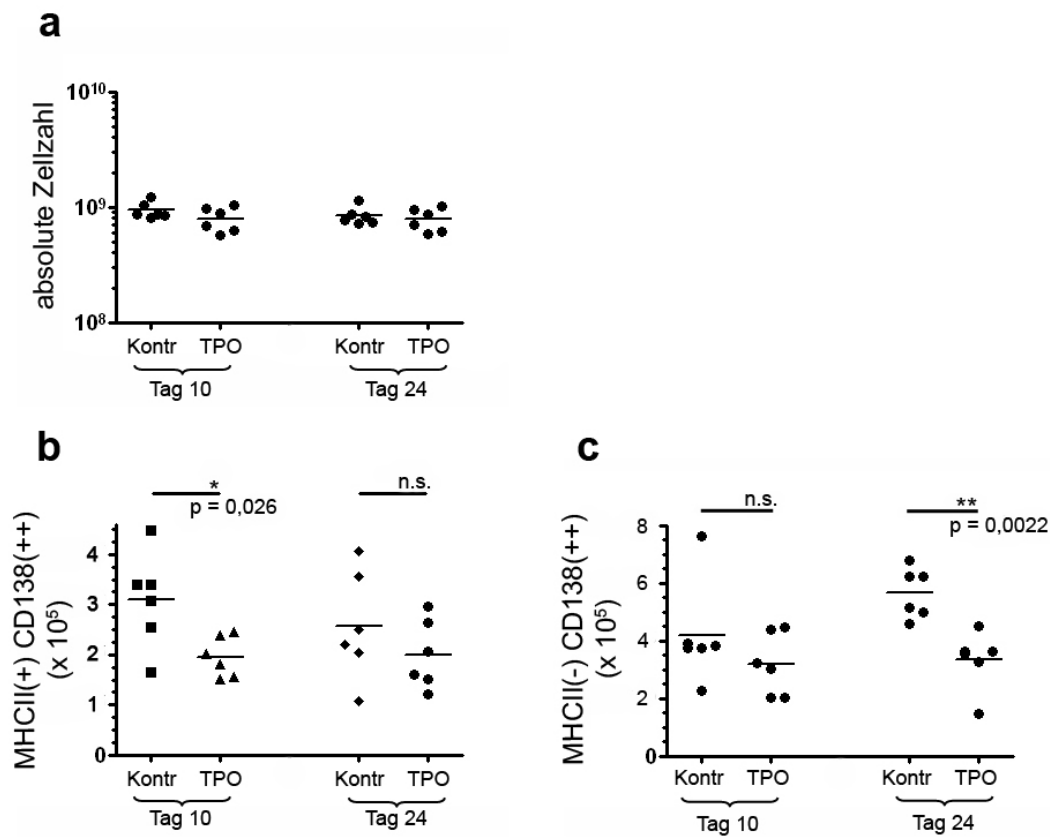


Abb. 19: Auswirkungen der Injektion von TPO auf Plasmazellen der Milz von BALB/c Mäusen. BALB/c Mäuse wurden mit TPO behandelt (d 0 – d 4, d 17). An Tag 10 und Tag 24 wurden die absoluten Zellzahlen bestimmt (a). Die Frequenzen MHCII(+) CD138(++) Plasmablasten (b) und MHCII(-) CD138(++) Plasmazellen (c) der Milz wurden durchflusszytometrisch gemessen und daraus die absoluten Zahlen errechnet. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Zunahme der Anzahl von Megakaryozyten nach TPO-Injektion in der Milz zu einem frühen Zeitpunkt eher auf die Plasmablasten auswirkt, während Auswirkungen auf die reifen Plasmazellen erst zum späten Analysezeitpunkt feststellbar sind. Bei den beobachteten Effekten handelt es sich in beiden Fällen um eine Abnahme der absoluten Plasmablasten-/Plasmazell-Zahlen in Folge der TPO-Injektionen. Die Knochenmarks-Plasmazellen waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte betroffen. Die spezifische Manipulation der Megakaryopoese hatte somit in der Milz einen Einfluss auf das Plasmazell-Kompartiment. Da TPO nicht direkt auf

Plasmazellen wirkt, zeigt dies, dass Megakaryozyten mit Plasmazellen wechselwirken.

3.9 Ansätze zur Depletion von Plasmazellen

Bei der Pathogenese der Autoimmunerkrankung SLE spielen Autoantikörper eine wichtige Rolle. Therapeutische Ansätze zur vollständigen Eliminierung der (Auto)Antikörper produzierenden Plasmazellen waren bisher wenig erfolgreich. Viele therapeutische Ansätze richten sich gegen proliferierende Zellen. Dem entsprechend sind reife, nicht mehr teilungsaktive Plasmazellen im Gegensatz zu den Plasmablasten relativ therapieresistent (65). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Ansätze zur Depletion von Plasmazellen getestet werden.

3.9.1 Versuche zur Eliminierung von Plasmablasten und Plasmazellen durch depletierende Antikörper

Zum einen wurde die Auswirkung der Injektion depletierender Antikörper gegen die Oberflächenmarker MHCII und B220 in Mäusen untersucht. Beide Moleküle werden während der Reifung von Plasmazellen herunter reguliert, werden allerdings auch auf reifen Plasmazellen schwach ausgeprägt. Außerdem wurde versucht, Plasmazellen durch Injektion des Fusionsproteins IP-10:Fc zu eliminieren. Dieser Ansatz basiert auf vorangegangenen Resultaten der Arbeitsgruppe Manz, dass die Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR3 auf Plasmablasten durch die Anwesenheit des inflammatorischen Zytokins IFN- γ während der B-Zell Stimulation induziert wird (26). Entsprechend prägen 40 % der Plasmablasten in der Milz von NZB/W Mäusen und 60 % der Plasmablasten, die in den entzündeten Nieren dieser Mäuse gefunden werden können, CXCR3 aus (Panne et al, Manuskript in Revision).

In den durchgeführten Versuchen hatten weder die Injektion von depletierenden Antikörpern gegen MHCII und B220 signifikante Effekte auf die Homöostase der Plasmazellen, noch die Injektion von IP-10:Fc (Daten nicht gezeigt).

3.9.2 Versuche zur Eliminierung von Plasmazellen durch Störung der Homöostase der Knochenmarks-Zellen

In einem anderen Ansatz sollte versucht werden, durch die Verabreichung der Substanz Poly(I:C) die Homöostase der Plasmazellen zu beeinflussen. Poly(I:C) ist ein synthetisches Analog doppelsträngiger RNA (dsRNA) und bindet an den Rezeptor Toll-Like Rezeptor (TLR) 3. Dies induziert die Expression von Interferonen und anderen Zytokinen. Eine Folge der Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C) ist eine transiente Abnahme der mononukleären Zellen im Knochenmark. Entsprechend könnten auch Plasmazellen betroffen sein.

In einem Experiment wurden die Auswirkungen der Behandlung von autoimmunen NZB/W Tieren mit Poly(I:C) auf das Plasmazell-Kompartiment in der Milz und im Knochenmark untersucht. Als Kontrolle dienten eine mit PBS behandelte Gruppe von Tieren, eine Gruppe, der das zytostatische Agens Cyclophosphamid verabreicht wurde und eine Gruppe von Tieren, die Poly(I:C) und Cyclophosphamid zusammen bekommen hat. Keine der Behandlungen hatte signifikante Effekte auf das Plasmazell-Kompartiment der Milz. Im Knochenmark hingegen hatte die Verabreichung von Cyclophosphamid eine signifikante Reduktion der BrdU(+) Plasmablasten zur Folge. Die Gabe von Poly(I:C) hingegen resultierte in einem leichten Anstieg der Plasmablasten. In den Tieren, die sowohl mit Cyclophosphamid, als auch mit Poly(I:C) behandelt wurden, war die Anzahl BrdU(+) Plasmablasten kaum verändert im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe. Die Anzahl der BrdU(-) Plasmazellen wies zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

3.9.3 Versuche zur Eliminierung von Plasmazellen in NZB/W Mäusen durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Die Behandlung von Patienten mit Multiplen Myelom, einer Krebserkrankung, der eine Expansion maligner Plasmazellen im Knochenmark zugrunde liegt, mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib führt in der Klinik bei etwa einem Drittel der Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Erkrankung (100, 101). Plasmazellen weisen aufgrund der massiven Produktion von Antikörpermolekülen eine extrem hohe Protein-Biosyntheserate auf. Wie die Arbeitsgruppe von Reinhard Voll, Nikolaus-Fiebiger-Zentrum für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum Erlangen, zeigen konnte, sind sie daher sehr anfällig für den Proteasom-Inhibitor Bortezomib (102). Auch die Behandlung von BALB/c Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion der Plasmazellen in Milz und Knochenmark (Neubert et al, Manuskript in Revision). In Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe sollten die Effekte einer Bortezomib-Behandlung auf kurz- und langlebige Plasmazellen von NZB/W Mäusen untersucht werden. Hierfür wurden die Tiere 14 Tage mit BrdU gefüttert und 48 und 12 Stunden vor der Analyse mit Bortezomib behandelt. Die Milz-Plasmazellen wurden durchflusszytometrisch anhand der Expression von CD138 auf der Oberfläche und einer starken intrazellulären Färbung der κ -leichten Kette identifiziert. Wie in Abb. 20a dargestellt ist, hatte die Bortezomib-Behandlung keine Auswirkung auf die absoluten Zellzahlen der Milz ($1,03 \pm 0,32 \times 10^8$ im Vergleich zu $7,70 \pm 2,65 \times 10^8$ in den Kontrolltieren). Die kurz- und langlebigen Plasmazellen wurden hingegen gleichermaßen durch die Gabe von Bortezomib reduziert: während in den Kontrolltieren $7,77 \pm 3,23 \times 10^5$ BrdU(+) Plasmazellen gefunden wurden, war die absolute Anzahl in den behandelten Tieren mit $2,60 \pm 1,79 \times 10^5$ signifikant ($p=0,0087$) geringer (Abb. 20b). Die absolute Anzahl von BrdU(-) Plasmazellen wurde signifikant ($p=0,0022$) von $6,42 \pm 2,06 \times 10^5$ in den Kontrolltieren auf $2,54 \pm 1,29 \times 10^5$ in den Bortezomib-behandelten Tieren reduziert (Abb. 20c).

Die Injektion des Proteasom-Inhibitors Bortezomib hatte somit eine signifikante Reduktion kurz- und langlebiger Plasmazellen in der Milz um etwa 60 % zur Folge.

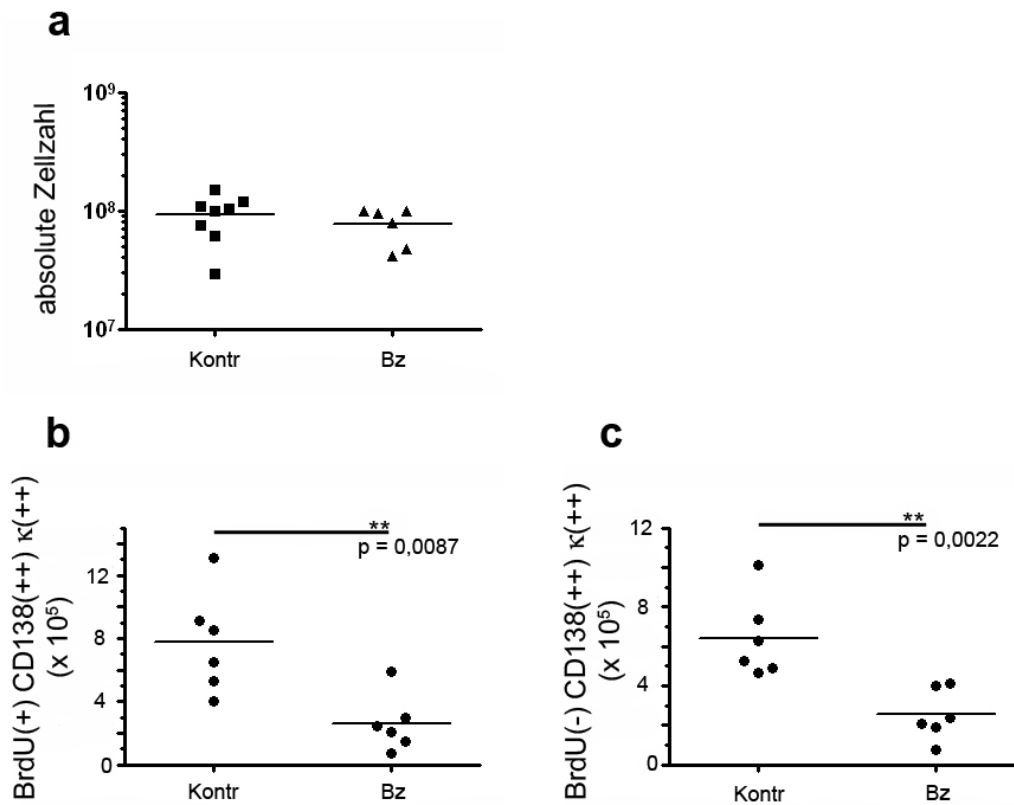


Abb. 20: Auswirkungen der Injektion von Bortezomib auf Plasmazellen in NZB/W Mäusen. NZB/W Mäuse wurden 14 Tage mit BrdU gefüttert und 48 und 12 Stunden vor der Analyse mit Bortezomib behandelt. An Tag 14 wurden die absoluten Zellzahlen der Milz (a) bestimmt. Die Frequenzen kurz- und langlebiger Plasmazellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und daraus die absoluten Anzahlen kurzlebiger (b) und langlebiger (c) Plasmazellen errechnet. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

An der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sind verschiedene Zellen des Immunsystems beteiligt. Im Falle des Systemischen Lupus Erythematoses spielen hyperreaktive T- und B-Zellen, die nach Toleranzbruch Autoantigene erkennen können, und Makrophagen, die tote Zellen nicht effizient beseitigen können, eine wichtige Rolle. Terminal differenzierte B-Zellen, also Plasmazellen, können durch die Produktion von Autoantikörpern entscheidend zur Krankheitsentwicklung beitragen. Im Fall des SLE spielen insbesondere Antikörper gegen nukleäre Antigene wie dsDNA eine wichtige Rolle (38, 39). Die Ablagerung von Immunkomplexen in der Niere löst Entzündungsreaktionen aus und kann eine fatale Nephritis zur Folge haben (40, 103).

Trotz der Verwendung wirksamer Immunsuppressiva zeigen sich manche Autoantikörpertiter im Blut von einigen Lupuspatienten erstaunlich stabil (68). Während man früher davon ausging, dass Antikörper von kurzlebigen Plasmazellen gebildet werden, die kontinuierlich neu aus B-Zellen hervorgehen, weiß man heute, dass wenigstens in der Maus ein Teil der Plasmazellen langlebig ist mit einer Lebensdauer von mehreren Monaten bis Jahren (13, 29). Diese langlebigen Plasmazellen finden sich hauptsächlich im Knochenmark, in welches sie nach Entstehung in den sekundären lymphatischen Organen einwandern. Hier wird ihr Überleben vermutlich von Umgebungsfaktoren in so genannten Überlebensnischen gewährleistet (11, 29).

In autoimmunen NZB/W Tieren ist die Anzahl der Plasmazellen in der Milz im Vergleich zu nicht-autoimmunen Tieren stark erhöht und entspricht in etwa der im Knochenmark (23). Wie Hoyer et al zeigen konnte, ist ein erstaunlich hoher Anteil dieser Plasmazellen langlebig (65). Unter Behandlung mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid erwies sich die Population der langlebigen

Plasmazellen als relativ therapieresistent und beinhaltete einen bemerkenswerten Anteil autoreaktiver Plasmazellen.

Die Ursachen für die ungewöhnlich hohe Anzahl langlebiger Plasmazellen in den Milzen der NZB/W Mäuse sind bisher nicht bekannt und wurden in dieser Arbeit untersucht. Zugleich wurden Ansätze entwickelt, um langlebige Plasmazellen gezielt zu eliminieren.

4.2 Diskussion der Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Methoden angewandt, um verschiedene Aspekte der Biologie von Plasmazellen und deren Interaktion mit anderen Zellarten zu untersuchen.

4.2.1 Identifizierung von Plasmazellen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Plasmazellen der Milz über das Oberflächenmolekül CD138 identifiziert. Da dieser Marker im Knochenmark aber auch auf anderen Zellen ausgeprägt wird, z.B. auf bestimmten B-Zell-Vorläufern, wurde zur Identifizierung von Knochenmarks-Plasmazellen zusätzlich eine intrazelluläre Färbung der κ -leichten Kette der Antikörpermoleküle verwendet. Da 95 % der B-Zellen (und Plasmazellen) in der Maus Immunglobulin dieser leichten Kette besitzen und außerdem in verschiedenen Experimenten keine Unterschiede zwischen $\kappa(++)$ und $\lambda(++)$ Plasmazellen gefunden werden konnten, ist die Analyse CD138(++) $\kappa(++)$ Zellen gut geeignet, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen.

In den histologischen Untersuchungen von Milzschnitten wurden Plasmazellen zunächst über CD138 identifiziert. Diese Färbung erwies sich aber als unzuverlässig, da sie aus unbekanntem Gründen oft nicht funktionierte. Daher erfolgte der Großteil der Analysen mit der Anfärbung der κ -leichten Kette allein:

bei entsprechender Justierung der Detektoren konnten B-Zellen, die Immunglobulin auf der Oberfläche ausprägen, deutlich von den sehr viel helleren Plasmazellen unterschieden werden, die als Antikörper-Produzenten große Mengen von Immunglobulin im Zytoplasma enthalten.

4.2.2 Identifizierung langlebiger Plasmazellen durch BrdU-Einbau-Experimente

Zur Identifizierung langlebiger Plasmazellen für durchflusszytometrische Analysen wurden Mäuse für 14 Tage mit BrdU im Trinkwasser gefüttert. Zellen, die sich über diesen Zeitraum nicht geteilt haben, blieben demnach BrdU(-). Die kontinuierliche Fütterung für 14 Tage erwies sich in NZB/W Mäusen als ausreichend, da die Frequenz der BrdU(-) Plasmazellen auch bei längerer Fütterung ab diesem Zeitpunkt konstant blieb (65). Daher wurden BrdU(-) Plasmazellen als langlebig bezeichnet. Bei den BrdU(+) CD138(++) bzw. κ(++) Zellen handelte es sich entsprechend sowohl um Plasmablasten als auch um reife Plasmazellen, die aber nicht in das Kompartiment der langlebigen Plasmazellen aufgenommen werden. Der Verständlichkeit wegen wurden diese neu gebildeten Plasmazellen in der vorliegenden Arbeit als kurzlebige Plasmazellen bezeichnet.

Für histologische Untersuchungen musste das Schema der BrdU-Fütterung modifiziert werden und die BrdU-Fütterung im Anschluss an die 14 Tagen für einen Tag abgesetzt werden, um nicht eingebautes BrdU aus dem Organismus auszudünnen. Obwohl der anti-BrdU-Antikörper nach Beschreibung lediglich BrdU im Komplex mit DNS erkennen sollte, zeigte die Färbung ohne Absetzen einen sehr hohen Hintergrund, der vermutlich auf die Bindung des Antikörpers an nicht eingebautes, lösliches BrdU im Gewebe zurückzuführen ist. Bei diesem Fütterungsschema wurde der Haupt-Anteil der unmarkierten, BrdU(-) Plasmazellen von langlebigen Plasmazellen gebildet. Unter Umständen befanden sich darunter allerdings auch solche Zellen, die sich in den letzten Stunden vor der Organentnahme nochmals geteilt haben, wodurch der BrdU-

Gehalt in der DNS so weit verdünnt wurde, dass er sich unter dem Detektionslimit befand. Für einige histologische Untersuchungen wurden daher die Mäuse über einen Zeitraum von einigen Wochen mit BrdU gefüttert und die Gabe dann für mindestens 2 Wochen abgesetzt. Alle BrdU(+) Plasmazellen sind demnach langlebig, während die BrdU(-) Plasmazellen ein Gemisch aus kurz- und langlebigen Zellen bilden. Die Ergebnisse beider angewandter BrdU-Fütterungsschemata ergänzen sich und lassen eindeutige Aussagen zu.

4.2.3 Untersuchung des Beitrags Zell-autonomer Eigenschaften zum erhöhten Plasmazell-Überleben in NZB/W Milzen durch Kulturexperimente

Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Plasmazell-Überlebensfaktoren nach Stimulation von Plasmazellen aus verschiedenen Mausstämmen wurden in Kulturexperimenten untersucht. Reife Plasmazellen wurden anhand der starken Ausprägung von CD138 und der Abwesenheit von B220 und MHCII auf der Oberfläche durch eine kombinierte magnetische und fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung aufgereinigt. In dieser Zellpopulation können sich aber immer noch einige teilungsaktive Plasmablasten befinden, die nach Zugabe von Zytokinen zur Proliferation angeregt werden und die Kultur überwachsen könnten. Um sicherzugehen, dass ausschließlich Überlebens Effekte auf reife Plasmazellen untersucht werden, wurde den Kulturen daher der Proliferationshemmer Hydroxyurea zugegeben. Diese Substanz hat auf nicht-proliferierende Plasmazellen in der eingesetzten Konzentration keine negativen Effekte und wurde bereits in vergleichbaren Studien verwendet (27).

Da *ex vivo* isolierte Plasmazellen in Kultur ohne Zugabe von Überlebensfaktoren im Gegensatz zu vielen anderen Zellarten innerhalb von 3 Tagen absterben, kann eine erhöhte Rate überlebender Zellen nach Zugabe löslicher Faktoren zu diesem Zeitpunkt direkt auf die Effekte der Stimulation zurückgeführt werden. Diese Überlebens Effekte waren bei Plasmazellen verschiedener Mausstämme unterschiedlich stark ausgeprägt, was auf Zell-autonome Unterschiede zwischen

den Mausstämmen hindeutet. Insgesamt zeigte sich im Verlauf der Versuche allerdings, dass sich die angewandte Methodik nur begrenzt eignet, um die Fragestellung nach Zell-autonomen Unterschieden zwischen Plasmazellen der verschiedenen Mausstämme optimal zu untersuchen. Innerhalb einzelner Experimente und bei wiederholter Durchführung zeigten sich große Schwankungen. Daher führte diese Methodik nur bei manchen Fragestellungen zu klaren Resultaten, bei anderen sind die Ergebnisse lediglich als Hinweise zu verstehen.

4.2.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie zur Untersuchung von Zellen im Gewebeverband

Um die Mikroumgebung der Plasmazellen in der Milz zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte nach Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern am konfokalen Mikroskop analysiert. Zur Untersuchung der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit anderen Zellarten wurden zweidimensionale Bilder angefertigt. Zellen, die außerhalb der Scanebene, also im Gewebe über oder unter der Plasmazelle lagen, konnten somit nicht gesehen werden. Die anhand dieser Bilder bestimmten Frequenzen, mit welcher Plasmazellen mit anderen Zellarten ko-lokalisiert waren, geben dem entsprechend lediglich einen unteren Grenzwert an. Die Anfertigung dreidimensionaler Bilder am Mikroskop ist extrem zeitaufwändig. Da Chemokinsignale allerdings sehr punktuell sind, erfolgte die Analyse der Ko-Lokalisation von Plasmazellen mit SDF-1 Signalen anhand dreidimensionaler Scans. Durch die Verwendung von 25 µm dicken Gewebeschnitten konnte etwa ein Tiefenbereich von 10 - 15 µm gescannt werden. Dies entspricht dem Durchmesser von Plasmazellen, deren Oberfläche demnach komplett nach SDF-1 Signalen abgesucht werden konnte. Angeschnittene Plasmazellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die mikroskopische Analyse von Gewebeschnitten wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen für Ko-Lokalisationsstudien genutzt und schafft eine gute Basis, um Bestandteile der Plasmazell-Überlebensnische zu identifizieren (32).

4.2.5 Induktion der Megakaryopoese durch wiederholte TPO-Injektionen

Um die Bildung neuer Megakaryozyten zu induzieren, wurde nicht-autoimmunen BALB/c Mäusen das Zytokin Thrombopoietin (TPO) injiziert. Das in dieser Arbeit angewandte Behandlungsschema sah 5 Injektionen an jeweils aufeinanderfolgenden Tagen vor und zusätzlich eine weitere Gabe an Tag 17. Dadurch kam es in der Milz zu einem transienten, an Tag 10 beobachtbaren Anstieg der Anzahl von Megakaryozyten. Bei einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten Wiederholung dieses Experiments sollte die Anzahl der Megakaryozyten und deren Reifegrade über Messung der Ploidie durchflusszytometrisch bestimmt werden. Aufgrund der auch nach TPO-Injektion sehr geringen Frequenz der Megakaryozyten war dies in der Milz leider nicht möglich. Im Knochenmark zeigte sich aber, dass es in Folge der Injektion zu einem Austausch reifer, polyploider Megakaryozyten durch neu gebildete Megakaryozyten geringerer Ploidie kam. Dies lässt vermuten, dass auch in der Milz durch die TPO-Injektion alte, reife Megakaryozyten durch neu gebildete ersetzt wurden. TPO wirkt nicht direkt auf Plasmazellen. Veränderungen im Plasmazell-Kompartiment nach TPO Gabe zeigen daher eindeutig, dass Plasmazellen mit TPO-empfindlichen Zellen, vermutlich Megakaryozyten, interagieren und dass man TPO verwenden kann, um reife Plasmazellen zu eliminieren.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Die Ursachen für die erhöhte Anzahl langlebiger Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen liegen in den Genen des NZB-Elternstammes

Der Entstehung der Lupus-ähnlichen Erkrankung, die (NZB x NZW)F1 Hybride entwickeln, liegen eine Vielzahl genetischer Faktoren zugrunde, zu denen beide Elternstämme beitragen. Ein ungewöhnlich stark ausgeprägtes Plasmazell-Kompartiment und entsprechend eine Hypergammaglobulinämie ist nicht nur für NZB/W Mäuse beschrieben, sondern auch für den parentalen Mausstamm NZB (62). NZW Mäuse hingegen entwickeln zwar auch zeitweise anti-DNS Antikörper, weisen aber keine vergleichbar erhöhten Serum-Antikörpertiter auf (60). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BrdU-Einbauexperimente zeigten, dass nach 14-tägiger BrdU-Gabe die Anzahl von BrdU(-), also langlebigen Plasmazellen in der Milz von NZB Mäusen sogar mehr als doppelt so hoch war wie in NZB/W Mäusen. NZW Milzen beinhalteten hingegen ähnlich viele langlebige Plasmazellen wie nicht-autoimmune BALB/c Mäuse, nämlich etwa 10-mal weniger als NZB Mäuse. Daraus kann man schließen, dass im genetischen NZB-Hintergrund die Ursachen für das erhöhte Plasmazell-Überleben in der Milz autoimmuner NZB/W Mäuse liegen. In den letzten Jahren wurden viele Studien unternommen, um die so genannten Lupus-Suszeptibilitäts-Loci im Genom von NZB und NZW Mäusen zu identifizieren, in denen Gene lokalisiert sind, die zur Pathogenese der Lupuserkrankung beitragen (44, 63, 104). Die bereits beschriebenen genetischen Abnormalitäten betreffen unterschiedliche Zellen und Faktoren des Immunsystems, z.B. die HLA-Antigene, Komponenten des Komplementsystems, Fc-Rezeptoren und viele andere Gene, die an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind (u.a. Zytokine und Todesrezeptoren) (105). Die Position der bisher identifizierten Lupus-Suszeptibilitäts-Loci im Genom der NZB und NZW Mäuse ist bekannt. Da die Ursachen für die hohe

Anzahl langlebiger Plasmazellen in NZB/W Mäusen wie gezeigt im NZB-Elternstamm zu suchen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit recherchiert, ob innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der bekannten Suszeptibilitäts-Loci von NZB Mäusen Gene liegen, deren Produkte am Überleben von Plasmazellen beteiligt sein könnten. Ein Schwerpunkt lag hierbei auf Zytokinen wie IL-6, IL-5, TNF- α , BAFF und APRIL und deren Rezeptoren und auf bekannten Adhäsionsmolekülen wie VLA-4, die von Plasmazellen ausgeprägt werden (siehe 1.3.4) (29). Hierbei konnten keine Korrelationen in den genetischen Positionen gefunden werden. Allerdings liegen viele genetische Regulationselemente in der DNS auch abseits der codierenden Regionen. Es ist also dennoch nicht auszuschließen, dass die Genexpression der angeführten Plasmazell-relevanten Moleküle durchaus durch Besonderheiten der Lupus-assoziierten Genabschnitte betroffen sind. Auch können andere, bisher unbekannte Faktoren betroffen sein, die zur Regulation der Lebensdauer von Plasmazellen beitragen.

4.3.2 Die Rolle von Zell-autonomen Faktoren für das verstärkte Überleben von Plasmazellen in der Milz

Das Überleben von Plasmazellen ist abhängig von der kontinuierlichen Stimulation durch verschiedene Zytokine und von Zell-Kontakt-vermittelten Signalen, welche *in vivo* vermutlich in bestimmten Mikrokompartimenten (Nischen) bereitgestellt werden.

Eine mögliche Ursache für die hohe Anzahl langlebiger Plasmazellen in den autoimmunen Mausstämmen NZB und NZB/W könnte in einer Plasmazell-autonomen erhöhten Überlebensfähigkeit liegen. So ist es denkbar, dass Plasmazellen autoimmuner NZB/W und NZB Mäuse genetisch bedingt empfänglicher für Überlebenssignale von IL-6 und anderen Überlebensfaktoren sind als solche nicht-autoimmuner Mausstämmen. Außerdem ist beschrieben, dass Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen BAFF und APRIL produzieren, solche nicht-autoimmuner BALB/c und C57BL/6 Mäuse hingegen lediglich BAFF (106). Derartige Plasmazell-autonomen Eigenschaften können

möglicherweise zur Folge haben, dass Plasmazellen von NZB/W Mäusen weniger stark auf Überlebensfaktoren aus der Umgebung angewiesen sind. In Hinblick auf das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische würde das bedeuten, dass die Nische in der Milz von NZB und NZB/W Mäusen weniger hohen Anforderungen entsprechen müsste, als dies in Milzen nicht-autoimmuner Mausstämme der Fall ist. Das Stroma der Milz autoimmuner Mäuse unterscheidet sich dabei allerdings nicht vom Milz-Stroma nicht-autoimmuner Tiere.

Um zu untersuchen, ob Zell-autonome Besonderheiten von Plasmazellen der NZB/W Mäuse zum erhöhten Überleben in den Milzen dieser Tieren beitragen, wurde das Überleben von Plasmazellen dieser und nicht-autoimmuner BALB/c und C57BL/6 Tiere nach Stimulation mit verschiedenen Faktoren in Kulturexperimenten verglichen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass *ex vivo* isolierte Plasmazellen in Kultur innerhalb weniger Tage absterben. Durch Zugabe von Überlebensfaktoren, z.B. IL-6, IL-5, TNF- α , SDF-1 α , und den BCMA-Liganden BAFF und APRIL kann aber das Überleben eines Teiles dieser Zellen für einige Tage verlängert werden (11, 27, 28, 34). Entsprechend sollte untersucht werden, ob Plasmazellen von NZB/W Mäusen in Kultur in Gegenwart dieser Faktoren zu einem höheren Prozentsatz überleben als solche von nicht-autoimmunen C57BL/6 Mäusen.

Wie bereits unter 4.2.3 diskutiert, erwies sich die angewandte Methodik nur als begrenzt geeignet, um die Fragestellung nach Zell-autonomen Unterschieden zwischen Plasmazellen der verschiedenen Mausstämme optimal zu untersuchen. In allen Experimenten zeigte sich aber, dass unabhängig vom Mausstamm Knochenmarks-Plasmazellen besser überlebten als Plasmazellen, die aus der Milz isoliert wurden. In nicht-autoimmunen Tieren ist hauptsächlich das Knochenmark der Ort, an dem Plasmazellen persistieren und protektive Antikörper sezernieren (107). Das verbesserte Überleben von Plasmazellen aus diesem Organ kann somit als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Überlebensnischen in diesem Organ den Plasmazellen optimale Grundbedingungen geben, was sich in den Kulturexperimenten in einem

Überlebensvorteil gegenüber Milz-Plasmazellen niedergeschlagen hat. Im Gegensatz dazu könnten entsprechend die geringeren Überlebensraten von Milz-Plasmazellen daraus resultieren, dass diese aufgrund der qualitativ geringwertigeren Überlebensnischen in der Milz schlechtere Grundvoraussetzungen hatten. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass die reifen Plasmazellen in der Milz aus B-Zellen hervorgegangen sind, die anders aktiviert wurden als die B-Zell-Vorläufer von reifen Knochenmarks-Plasmazellen.

Der Vergleich zwischen Knochenmarks-Plasmazellen von NZB/W und C57BL/6 Mäusen zeigte, dass unter allen getesteten Kulturbedingungen Plasmazellen von NZB/W Mäusen besser überlebten. Die höchsten Überlebensraten wurden nach Zugabe des Zytokins IL-6 erzielt, auf das NZB/W Plasmazellen mehr als 10-fach sensitiver reagierten als C57BL/6 Plasmazellen. Der Vergleich mit Plasmazellen eines anderen nicht-autoimmunen Mausstammes, den BALB/c Mäusen, ergab aber, dass diese ähnlich gut nach IL-6 Stimulation überlebten wie Plasmazellen aus NZB/W Mäusen. Die Frequenz langlebiger Plasmazellen in der Milz ist in BALB/c Mäusen zwar etwa doppelt so hoch wie in C57BL/6 Mäusen, in NZB/W Mäusen allerdings trotz vergleichbarer Sensitivität gegenüber IL-6 noch einmal etwa um das 5-fache gegenüber BALB/c Tieren erhöht. Es ist somit durchaus möglich, dass diese hohe Sensitivität von NZB/W Plasmazellen zum erhöhten Überleben in Milzen dieses Mausstamms beiträgt. Die alleinige Ursache für dieses Phänomen kann sie aber nicht sein.

4.3.3 IL-6 ist kein essentieller Überlebensfaktor für langlebige Plasmazellen *in vivo*

In der Literatur ist beschrieben, dass das Zytokin IL-6 *in vitro* ein sehr wirksamer Überlebensfaktor für Plasmazellen ist (27, 28). Diese Beobachtung konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Kulturexperimenten bestätigt werden. Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass Plasmazellen in Ko-Kulturen mit stromalen Zellen in diesen die Expression der mRNA für IL-6 induzieren (28). Über die Rolle von IL-6 für das Überleben von Plasmazellen *in vivo* gibt es Hinweise aus

Immunisierungsexperimenten in IL-6^{-/-} Mäusen: diese Tiere zeigen eine verlangsamte Kinetik im Aufbau stabiler Antikörper-Titer gegen das TD-Antigen Ovalbumin (27, 108). Allerdings gleichen sich die Antikörper-Titer etwa 4 Wochen nach der Sekundärimmunisierung dem der Kontrolltiere an und bleiben dann auch in den IL-6^{-/-} Tieren im Verlauf der folgenden 5 Monate stabil (27). Da beschrieben ist, dass die spezifischen Antikörper gegen Ovalbumin von langlebigen Plasmazellen produziert werden, ist dies bereits ein Hinweis darauf, dass IL-6 vermutlich kein essentieller Überlebensfaktor für Plasmazellen *in vivo* ist (10, 12). In der vorliegenden Arbeit wurde das gesamt-Plasmazell-Kompartiment von IL-6^{-/-} Mäusen nach 14-tägiger BrdU-Fütterung bestimmt. Im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren wiesen die ko-Tiere weder in der Milz, noch im Knochenmark signifikante Unterschiede in der Anzahl kurz- oder langlebiger Plasmazellen auf. Somit konnte gezeigt werden, dass IL-6 *in vitro* zwar ein sehr wirksamer Überlebensfaktor für Plasmazellen ist, *in vivo* allerdings kein essentieller Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische sein kann. In den von Cassese et al durchgeführten Kultur-Experimenten konnten die besten Überlebensraten erzielt werden, wenn isolierte Plasmazellen in Gegenwart von IL-6 und gleichzeitiger Stimulation des Oberflächenmoleküls CD44, das auf Plasmazellen ausgeprägt wird, kultiviert wurden (27). Die Liganden für CD44 sind extrazelluläre Matrixkomponenten wie Hyaluronsäure und Fibronectin. Die synergistischen Effekte verschiedener Stimuli scheinen somit die Langlebigkeit von Plasmazellen zu vermitteln. Neben IL-6 sind IL-5, TNF- α , SDF-1 α und die BCMA-Liganden BAFF und APRIL als Überlebensfaktoren für Plasmazellen bekannt. Außerdem scheinen Zell-Zell-Kontakte über Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle zu spielen (109). Entsprechend kann man davon ausgehen, dass die Überlebensnische für Plasmazellen auch *in vivo* durch das Vorhandensein mehrerer Faktoren definiert ist. Fehlt wie in den IL-6^{-/-} Mäusen einer der Bestandteile, scheinen andere Faktoren ausreichend zu sein, um die Abwesenheit von IL-6 zu kompensieren. Wahrscheinlich spielt hier auch IL-11 eine Rolle, da dieses Zytokin den gleichen Signalweg in der Zelle besitzt wie IL-6 (110).

4.3.4 Analyse des Plasmazell-Kompartiments von $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen

In nicht-autoimmunen Mäusen und im Mensch erreicht die Frequenz an Plasmazellen im Knochenmark maximal 1% aller Zellen (etwa 1×10^6 in der Maus und entsprechend etwa 1×10^9 im Mensch) (11). Im Laufe einer humoralen Immunreaktion entsteht zunächst eine Welle antigen-spezifischer Plasmazellen, von denen aber ein großer Teil innerhalb weniger Tage wieder verschwindet. Da die Frequenz der Knochenmarks-Plasmazellen sehr stabil ist, muss es Mechanismen zur Regulation geben, die insbesondere auch im Verlauf von Immunantworten greifen und die Anzahl der verbleibenden langlebigen Plasmazellen begrenzen. Neben dem Konzept der limitierten Anzahl von Plasmazell-Überlebensnischen im Knochenmark konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Fc Rezeptor für Antikörper der Klasse IgG, $Fc\gamma RIIb$, eine wichtige Rolle in der Regulation der Plasmazell-Homöostase spielt. So ist die Anzahl spezifischer Plasmazellen, die nach Immunisierung mit dem TD-Antigen NP-CGG im Knochenmark detektierbar waren, in $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ C57BL/6 Mäusen zunächst vergleichbar mit der in Kontrolltieren. Hingegen können nach 14 Tagen und insbesondere an Tag 54 nach Immunisierung in den $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen signifikant mehr NP-spezifische Plasmazellen gefunden werden (89). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass neben B-Zellen auch Plasmazellen $Fc\gamma RIIb$ auf der Oberfläche exprimieren und dass die Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren die Apoptose der Zellen induziert. $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ C57BL/6 Mäuse können eine dem Lupus vergleichbare Autoimmunerkrankung entwickeln, die mit einer Produktion von Autoantikörpern gegen nukleäre Bestandteile einhergeht (90). In 8-10 Monate alten $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ C57BL/6 Mäusen fanden sich in der Milz signifikant mehr Plasmazellen als in den entsprechenden Wildtyp-Tieren (90, 111). Interessanterweise tragen mehrere Mausstämme, die eine Lupus-ähnliche Erkrankung entwickeln (u.a. NZB und MRL Mäuse), in der Promoterregion des $Fcgr2$ Gens bestimmte Deletionen, die eine verminderte Expression des inhibitorischen Rezeptors $Fc\gamma RIIb$ auf der Oberfläche von B-Zellen zur Folge haben (92). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Plasmazellen von NZB

und MRL Mäusen im Gegensatz zu solchen nicht-autoimmuner Mausstämme keinen $Fc\gamma RIIb$ tragen und entsprechend nicht durch Kreuzvernetzung in Apoptose getrieben werden können (89). Es gibt somit viele Hinweise, dass der Rezeptor $Fc\gamma RIIb$ am Aufbau und bei der Regulation des langlebigen Plasmazell-Kompartiments eine Rolle spielt. Daher wurde in dieser Arbeit nach 14-tägigem BrdU-Einbau das Plasmazell-Kompartiment von Milz und Knochenmark in $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Mäusen untersucht. Überraschenderweise unterschied sich das Plasmazell-Kompartiment der hier untersuchten, 4 - 6 Monate alten Tiere nicht von dem der Kontrolltiere. Lediglich in der Milz war die Anzahl der BrdU(+), neu gebildeten Plasmazellen und der BrdU(-) langlebigen Plasmazellen in den $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tieren leicht, aber nicht signifikant erhöht. Dies steht im Widerspruch zu den zuvor erwähnten Publikationen, die erhöhte Gesamt-Plasmazellzahlen insbesondere in der Milz dieser Tiere beobachten konnten. Allerdings wurden in wenigstens einer der Arbeiten ältere Mäuse (8 – 10 Monate) untersucht (90). Es ist durchaus möglich, dass die Unterschiede in der Anzahl der BrdU(+) und BrdU(-) Plasmazellen in der Milz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse zu einem späteren Analysezeitpunkt signifikante Werte angenommen hätten. Trotz der auch in den hier untersuchten $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ Tieren beobachteten kontinuierlichen Neubildung von Plasmazellen scheint die absolute Anzahl langlebiger Plasmazellen limitiert zu sein. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass andere Regulationsmechanismen zur Begrenzung der Plasmazell-Zahl existieren müssen, die einen wichtigeren Einfluss ausüben als die negative Regulation über $Fc\gamma RIIb$. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die Tatsache, dass $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ BALB/c Mäuse nicht die für $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ C57BL/6 Mäusen beschriebenen Lupus-ähnlichen Symptome entwickeln (90).

Zusammenfassend kann über die untersuchten Plasmazell-autonomen Faktoren, also Zytokin-Sensitivität und $Fc\gamma RII$ Funktion, gesagt werden, dass diese nicht die alleinigen Ursachen für das in NZB/W Mäusen beobachtete erhöhte Milz-Plasmazell-Kompartiment sind. Die gezeigten Ergebnisse zusammen mit der Tatsache, dass die Anzahl langlebiger Plasmazellen, unabhängig vom

Mausstamm, limitiert ist, deuten vielmehr darauf hin, dass die Umgebung dieser Zellen in der Milz von NZB/W Mäusen Besonderheiten aufweisen muss, wodurch die Anzahl an Überlebensnischen erhöht ist.

4.3.5 Die Milz, nicht aber die Lymphknoten von NZB/W Mäusen, weist Besonderheiten in der Stromalen Umgebung auf, die ein erhöhtes Plasmazell-Überleben ermöglichen

Die Milz von NZB/W Mäusen ist das einzige lymphatische Organ dieser Tiere, für das ein ungewöhnlich erhöhtes Auftreten langlebiger Plasmazellen beschrieben ist (65). Normalerweise kommen langlebige Plasmazellen hauptsächlich im Knochenmark vor. Diese Plasmazellen gehen aus follikulären B-Zellen hervor. Follikuläre B-Zellen finden sich neben der Milz auch in den Lymphknoten. Es kann daher angenommen werden, dass in NZB/W Mäusen die Vorläufer langlebiger Plasmazellen sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten entstehen. Der Befund, dass in den Lymphknoten von NZB/W Mäusen wesentlich geringere Frequenzen langlebiger Plasmazellen zu finden sind als in der Milz, kann als ein weiterer deutlicher Hinweis darauf angesehen werden, dass das ungewöhnliche Plasmazell-Überleben in der Milz nicht aufgrund Zellautonomer Veränderungen zustande kommt. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Milz dieser Tiere Besonderheiten im Stroma aufweist, die das Überleben von Plasmazellen in besonderer Weise begünstigen, z.B. in der Ausbildung einer erhöhten Anzahl oder qualitativ veränderter Plasmazell-Nischen.

Um die Mikroumgebung der Plasmazellen in der Milz zu untersuchen, wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die histologische Untersuchung von Milzschnitten am Mikroskop verlagert.

4.3.6 Lokalisation der Plasmazellen in NZB/W Milzen

Durch histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass in der Milz von NZB/W Mäusen kurz- und langlebige Plasmazellen räumlich nicht von einander getrennt vorliegen. Vielmehr finden sich sowohl Anhäufungen bestehend aus kurz- und langlebigen Plasmazellen, als auch vereinzelt liegende Plasmazellen beider Sorten in der roten Pulpa verteilt. Eine ähnliche Verteilung wurde auch für Antigen-spezifische Plasmazellen in der Milz nicht-autoimmuner C57BL/6 Mäuse an Tag 18 nach Sekundärimmunisierung festgestellt (6). Dies deutet darauf hin, dass die Überlebensnischen der Plasmazellen sowohl in nicht-autoimmunen, als auch in autoimmunen Mäusen verstreut über die komplette rote Pulpa liegen. In den NZB/W Mäusen lagen die Plasmazellen häufig neben faserähnlichen Strukturen oder Blutgefäßen.

4.3.7 Die Anzahl der Überlebensnischen in Milzen von NZB/W Mäusen ist nicht durch retikuläre, SDF-1 produzierende Stromazellen limitiert

Im Knochenmark nicht-autoimmuner C57BL/6 Mäuse sind über 90 % der IgG(+) Plasmazellen ko-lokalisiert mit SDF-1 produzierenden VCAM-1(+) retikulären Zellen (32). Diese auf Histologie basierende Untersuchung ist die bisher einzige Beschreibung der Plasmazell-Überlebensnische *in vivo*. Es ist bekannt, dass Plasmablasten gegen das Chemokin SDF-1 wandern und dass es reifen, nicht-migratorischen Plasmazellen als Überlebensfaktor *in vitro* dient (15, 27). Ähnlich wie für IL-6 gilt jedoch auch hier, dass SDF-1 für das Plasmazell-Überleben im Knochenmark nicht essentiell ist: Immunisierungsexperimente mit dem TD-Antigen NP-KLH in Mäusen mit einem CXCR4-defizienten B-Zell-Kompartiment zeigten, dass die Akkumulation NP-spezifischer Plasmazellen im Knochenmark dieser Tiere stark verlangsamt war. An Tag 90 nach Immunisierung unterschied sich die Anzahl dieser langlebigen Plasmazellen hingegen nur geringfügig von

den Wildtyp-Kontrolltieren (16). Da dennoch vieles darauf hindeutet, dass SDF-1 eine wichtige Rolle für Plasmazellen spielt, wurde histologisch untersucht, ob auch in der Milz autoimmuner NZB/W Mäuse die von Tokoyoda et al beschriebene SDF-1 produzierende VCAM-1(+) Zelle in direkter Nähe von Plasmazellen gefunden werden kann. In der Tat lagen nahezu alle Plasmazellen neben VCAM-1(+) Zellen. Allerdings zeigten die Färbungen, dass in der roten Pulpa sehr viele Zellen VCAM-1 exprimieren. Daher kann diese beobachtete Ko-Lokalisation von CD138(+) Plasmazellen und VCAM-1(+) Zellen auch stochastisch bedingt sein. Entsprechend lässt sich keine Aussage darüber machen, ob die Assoziation von biologischer Relevanz für das Überleben von Plasmazellen ist.

SDF-1 wird in der roten Pulpa von Stromalen Zellen exprimiert (112). Die Assoziation von Plasmazellen mit SDF-1 α Signalen wurde nach entsprechender Antikörperfärbung in dreidimensionalen Scans am konfokalen Mikroskop analysiert. Somit konnte im Gewebeverband die komplette Oberfläche der Plasmazellen nach SDF-1 Signalen untersucht werden. Bei über 80 % der analysierten Plasmazellen wurde in unmittelbarer Nähe eine SDF-1 Färbung gefunden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass das Chemokin auch für Plasmazellen in der Milz von NZB/W Mäusen eine wichtige Rolle spielt. Berücksichtigt man allerdings, dass in diesem Organ lediglich etwa 40 – 50 % der Plasmazellen langlebig sind, scheinen SDF-1-Signale alleine kein ausreichender Faktor für das Plasmazell-Überleben in der Milz zu sein. Dass SDF-1 dennoch eine wichtige Rolle für (autoreaktive) Plasmazellen in NZB/W Mäusen spielt, konnte in einer Arbeit gezeigt werden, in der diese Tiere mit einem monoklonalen anti-SDF-1 Antikörper behandelt wurden. Wurde den Tieren beginnend mit einem Alter von 3 Wochen über einen Zeitraum von 30 Wochen der Antikörper verabreicht, so konnten auch am Ende der Behandlung nur niedrige anti-DNS IgG Titer nachgewiesen werden, während sich der Gesamt-IgG Titer nicht von der Kontrollgruppe unterschied (82). In dieser Arbeit blieb es jedoch unklar, ob die Behandlung mit dem anti-SDF-1 Antikörper die Entstehung oder das Überleben von Plasmazellen inhibierte.

4.3.8 Untersuchungen zur Rolle von Gr-1 positiven myeloiden Zellen für das Plasmazell-Überleben

In Gen-Expressionsanalysen von *ex vivo* isolierten murinen Knochenmarks-Plasmazellen konnte die mRNA für das Chemokin MIP-1 α (CCL3) nachgewiesen werden (93). Der Rezeptor CCR5 ist u.a. auf den Knochen-resorbierenden Osteoklasten-Vorläufern ausgeprägt, deren Ausreifung durch die Bindung von MIP-1 α stimuliert wird (113). Auch Multiple Myelom-Zellen, also maligne Plasmazellen, exprimieren MIP-1 α (114). Diese Zellen findet man im Knochenmark häufig assoziiert mit Osteoklasten, die aus myeloiden Vorläuferzellen hervorgehen. Es konnte gezeigt werden, dass Osteoklasten *in vitro* in der Lage sind, maligne Plasmazellen am Überleben zu halten (115). Osteoklasten können *in vitro* auch aus Vorläuferzellen aus der Milz gewonnen werden (116). Daher sollte hier untersucht werden, ob Zellen der myeloiden Linie für Plasmazellen auch in der Milz autoimmuner NZB/W Mäuse eine Rolle spielen. Zunächst wurde histologisch untersucht, ob in der Milz von NZB/W Mäusen Osteoklasten gefunden werden können. Die Färbung mit Osteopontin zur Detektion von Osteoklasten und Osteoblasten (knochenbildende Zellen) zeigte in diesem Organ im Gegensatz zu Knochenmarksschnitten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Knochenmarks-Färbungen nicht-autoimmuner Mäuse haben ergeben, dass etwa 70 % der Plasmazellen mit Gr-1(+) Zellen assoziiert war. Gr-1 wird in unterschiedlichem Ausmaß auf allen myeloiden Zellen, besonders stark aber auf Granulozyten exprimiert (117). Allerdings bilden Gr-1(+) Zellen im Knochenmark eine große Population (etwa 50 % der Zellen); die beobachtete Ko-Lokalisation kann also ebenso stochastisch bedingt sein. In immunhistologischen Färbungen der Milz von NZB/W Mäusen konnten hingegen sehr viel weniger Gr-1(+) Zellen gefunden werden, ihre Anzahl war vergleichbar mit der von κ (++) Zellen. Die Analyse der Mikroskopie-Daten ergab, dass etwa 30 % aller κ (++) Plasmazellen mit Gr-1(+) myeloiden Zellen assoziiert waren. Da diese Zählung anhand zweidimensionaler Bilder

durchgeführt wurde, ist der reale Prozentsatz an Plasmazellen, die im dreidimensionalen Raum Kontakt zu Gr-1(+) Zellen haben, entsprechend höher und könnte damit die Größenordnung langlebiger Plasmazellen erreichen (ca. 45 %). Langlebige Plasmazellen waren jedoch nicht häufiger mit Gr-1(+) Zellen assoziiert als kurzlebige (Daten nicht gezeigt). Die Rolle der Gr-1(+) Zellen für Plasmazellen in NZB/W Milzen konnte anhand der Histologie nicht bestimmt werden. Daher wurde die Auswirkung einer Eliminierung der Gr-1(+) Zellen in NZB/W Mäusen auf das Plasmazell-Kompartiment durch Injektion eines depletierenden Antikörpers untersucht (85). Wie durch die Gegenfärbung mit CD11b gezeigt werden konnte, war die Depletion der Gr-1(+) Zellen erfolgreich. Bei den Plasmazellen konnte lediglich in der Milz eine geringfügige, statistisch aber nicht signifikante Abnahme BrdU(-) langlebiger Plasmazellen beobachtet werden. Trotz der histologisch beobachteten Ko-Lokalisation sind Gr-1(+) Zellen für das Überleben von Plasmazellen demnach nicht essentiell. Die Depletion der Gr-1(+) Zellen stellt also keinen potentiellen Therapieansatz dar.

4.3.9 Megakaryozyten als potentieller Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische in der Milz von NZB/W Mäusen

Die in dieser Arbeit gezeigte histologische Untersuchung von Milzen von NZB/W Mäusen ergab, dass über 40% der Plasmazellen im unmittelbaren Kontakt oder großer Nähe zu CD41(+) Megakaryozyten liegen. Diese Zellen, deren Hauptaufgabe die Produktion der Thrombozyten ist, finden sich in nicht-autoimmunen Individuen hauptsächlich im Knochenmark, wo sie Frequenzen von unter 0,1 % erreichen und somit ähnlich selten sind wie Plasmazellen (95, 118). In der Milz finden sich in gesunden Mäusen sehr viel weniger Megakaryozyten als im Knochenmark (94). Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe im Knochenmark von nicht-autoimmunen BALB/c und C57BL/6 Mäuse zeigten, dass auch hier etwa 30 % der Plasmazellen mit Megakaryozyten assoziiert sind. Ein Zusammenhang zwischen Plasmazellen und Megakaryozyten ist bisher noch nicht beschrieben worden. Da es sich aber um zwei sehr seltene Zellarten

handelt, erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass die beobachtete Ko-Lokalisation auf Zufall basiert. Außerdem wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von David Tarlinton, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australien, das Plasmazell-Kompartiment von $c-Mpl^{-/-}$ Mäusen untersucht. Die Anzahl der Megakaryozyten ist in diesen Tieren um 85 % reduziert (119). Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass in diesen Tieren die Anzahl IgG-sezernierender Plasmazellen im Knochenmark reduziert ist und dass nach der Immunisierung mit dem TD-Antigen NP-KLH weniger NP-spezifische Plasmazellen im Knochenmark überleben (David Tarlinton, persönliche Mitteilung). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Megakaryozyten tatsächlich ein Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische sein können.

Im Knochenmark spielt das Chemokin SDF-1 α eine wichtige Rolle für Megakaryozyten: zum einen induziert SDF-1 α Wachstum und Differenzierung dieser Zellen, zum anderen wandern die unmittelbaren Vorläufer der reifen Megakaryozyten gegen SDF-1 α und lokalisieren so als reife Megakaryozyten in der vaskulären Nische, um Thrombozyten in die Blutgefäße abzuschneiden (99, 120-122). Ebenso besitzen Plasmablasten die Fähigkeit, gegen dieses Chemokin zu migrieren (15). Chemotaxis beider Zellarten gegen SDF-1 α könnte somit die Grundlage dafür sein, dass sich Megakaryozyten und Plasmazellen am gleichen Ort finden. Mögliche Faktoren, die das Überleben von Plasmazellen in ihrer Nische unterstützen, sind neben SDF-1 α unter anderem IL-6, TNF- α und die BCMA-Liganden APRIL und BAFF. Interessanterweise ist bekannt, dass Megakaryozyten mehrere dieser Zytokine produzieren können. So konnte in *ex vivo* isolierten Megakaryozyten die mRNA für IL-6 und TNF- α nachgewiesen werden (96, 97). Das Zytokin IL-6 wurde nach Stimulation *in vitro* auch auf Proteinebene in signifikanten Mengen sezerniert. Ebenso konnte der BCMA-Ligand APRIL in Megakaryozyten nachgewiesen werden, wobei es allerdings unklar ist, ob er diesen Zellen nur als autokriner Wachstumsfaktor dient, oder auch in die Umgebung abgegeben wird (98). Ob die Megakaryozyten, die in der Milz autoimmuner NZB/W Mäuse neben Plasmazellen gefunden werden können, auch in der Lage sind, die genannten Überlebensfaktoren zu produzieren, ist

noch unklar, wenn auch sehr wahrscheinlich. Versuche zum Nachweis der mRNA von IL-6, TNF- α , BAFF und APRIL aus Gewebestücken, die mit einem Laser Capture Mikroskop gewonnen wurden, mittels quantitativer real time PCR führten bisher leider aufgrund technischer Probleme zu keinen Resultaten, sind aber Gegenstand laufender Arbeiten. Sollten die genannten Plasmazell-Überlebensfaktoren auch von den Megakaryozyten in der Milz produziert werden, wäre dies ein weiteres Indiz dafür, dass Megakaryozyten neben der SDF-1 α produzierenden Stromal-Zelle tatsächlich Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische in NZB/W Milzen sind.

4.3.9.1 Der Anstieg der Megakaryozytenzahl in der Milz autoimmuner NZB/W und NZB Mäuse korreliert mit dem Anstieg langlebiger Plasmazellen

Die histologische Untersuchung von Milzschnitten der autoimmunen Mausstämmen NZB/W und NZB und von nicht-autoimmunen BALB/c und C57BL/6 Mäusen zeigte große Unterschiede in der Anzahl CD41(+) Megakaryozyten: in den autoimmunen Milzen fanden sich deutlich mehr dieser Zellen als in denen nicht-autoimmuner Tiere. Vergleichbar verhielt es sich mit der Anzahl langlebiger Plasmazellen. Die geringsten Anzahlen beider Zellarten konnte in C57BL/6 Tieren beobachtet werden, in BALB/c Mäusen jeweils etwas mehr. Das stark ausgeprägte Kompartiment langlebiger Plasmazellen in NZB/W Mäusen ging mit einer Zunahme der Megakaryozytenzahl einher und die höchsten Zahlen beider Zelltypen konnten in NZB Mäusen gefunden werden. Über die Anzahl der Megakaryozyten in der Milz von Lupuspatienten ist nichts bekannt. Von NZB/W Mäusen weiß man, dass diese Tiere eine Thrombozytopenie ausbilden (123). Auch im Menschen geht die Erkrankung in etwa 25 % der Fälle mit einer Thrombozytopenie einher (124). So können im Serum von einem Teil der Patienten Antikörper gegen Thrombozyten- und Megakaryozyten-spezifische Antigene wie Glykoprotein (GP) IIb/IIIa und den Thrombopoietin Rezeptor c-Mpl gefunden werden (96, 97). In

Knochenmarksbiopsien von Lupuspatienten mit Thrombozytopenie weisen die Megakaryozyten eine veränderte Morphologie auf. Außerdem ist ihre Anzahl in einigen Fällen reduziert (124). Die Regulation der Megakaryopoese und der Thrombozyten-Bildung erfolgt in erster Linie über das Zytokin TPO, welches im Körper konstitutiv in der Leber, in geringen Mengen auch in den Nieren, in der Milz, der Lunge, dem Knochenmark und dem Gehirn gebildet wird (125, 126). Hohe systemische TPO-Level haben zur Folge, dass durch Bindung von TPO an den Rezeptor c-Mpl Megakaryozyten-Vorläufer zur Proliferation und Ausdifferenzierung in reife Megakaryozyten stimuliert werden (127-129). Diese Zellen geben Thrombozyten in den Blutkreislauf ab, die ebenso c-Mpl auf ihrer Oberfläche tragen. Über diesen Rezeptor werden die Thrombozyten aktiviert und gleichzeitig wird das TPO aus dem Serum entfernt. Somit wird verhindert, dass zu viele Megakaryozyten und entsprechend Thrombozyten gebildet werden (126, 130). Es ist also denkbar, dass die Ursache für die erhöhten Megakaryozytenzahlen in den autoimmunen NZB/W und NZB Mäusen in der Thrombozytopenie liegt: da nur ein geringer Anteil des systemischen TPOs von Thrombozyten gebunden werden kann, werden mehr Megakaryozyten-Vorläufer zur Ausdifferenzierung stimuliert. Dies findet neben dem Knochenmark zur Kompensation auch in der Milz statt und entsprechend ist hier die Anzahl stark erhöht.

4.3.9.2 Die durch Injektion von TPO hervorgerufene Veränderung der Megakaryozytenhomöostase beeinflusst die Plasmazellhomöostase

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hatte die Injektion von TPO in BALB/c Mäuse eine signifikante Abnahme der Anzahl frisch gebildeter Plasmablasten an Tag 10 und insbesondere reifer Plasmazellen 24 Tage nach Beginn der TPO-Behandlung in der Milz zur Folge. Die histologische Untersuchung der Milzen der TPO-behandelten Tiere ergab, dass die Injektion einen zeitlich begrenzten Anstieg der Megakaryozytenzahl hervorgerufen hat, der an Tag 10 nach Injektionsbeginn beobachtbar war, nicht aber an Tag 24. Der TPO Rezeptor wird

auf allen Zellen der Megakaryozytenlinie ausgeprägt, auf hämatopoietischen Stammzellen und in geringen Ausmaß auf Endothelzellen. In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte kein direkter Einfluss dieses Zytokins auf das Überleben von isolierten Plasmazellen beobachtet werden. Außerdem sind in $c\text{-Mpl}^{-/}$ Mäusen keine Defekte im Pool reifer Leukozyten beschrieben (131). Daher kann angenommen werden, dass für die hier gefundene Reduktion der Plasmazell-Zahl nach TPO-Injektion eine Wechselwirkung zwischen Megakaryozyten und Plasmazellen verantwortlich ist. Es konnte somit erstmals ein Zusammenhang zwischen der Homöostase der Megakaryozyten und der Homöostase von Plasmazellen gezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung der beobachteten Abnahme der Anzahl reifer Plasmazellen nach TPO-Injektion lässt sich wie folgt formulieren. Reife Plasmazellen, die in unmittelbarer Nähe oder in Kontakt mit Megakaryozyten oder deren Vorläufern stehen, beziehen von diesen Überlebenssignale in Form löslicher Faktoren oder direkter Zellkontakte über Adhäsionsmoleküle. TPO induziert die Ausreifung von Megakaryozyten-Vorläufern und deren Neubildung aus hämatopoietischen Stammzellen; somit sind alle Entwicklungsstufen dieser Zellen betroffen (130). Hieraus folgt, dass die Injektion von TPO zu Folge hatte, dass alte, reife Megakaryozyten durch neue ersetzt wurden, ebenso ein Teil der Megakaryozyten-Vorläufer. Eine entsprechende Veränderung in der Megakaryozyten-Population in Folge der TPO-Injektion ist beschrieben (132) und konnte in unserer Arbeitsgruppe auch bei dem hier angewandten Behandlungsschema durchflusszytometrisch nachgewiesen werden: nach Behandlung von BALB/c Mäusen mit TPO kam es zu einer Frequenzverschiebung in Richtung solcher Megakaryozyten, die einen geringeren Grad an Ploidie zeigten, also unreifer waren (Winter et al, Manuskript in Vorbereitung). Während der beschriebene Austausch in normalen, physiologischen Situationen ein langsamer Prozess ist, kam es im beschriebenen Experiment zu einem unnatürlich raschen Austausch der Megakaryozyten-Populationen. Dies könnte entsprechend zur Folge gehabt haben, dass mit dem schnellen Verschwinden der Megakaryozyten-Population,

die an der Plasmazell-Homöostase beteiligt sind, den Plasmazellen eine wichtige Überlebensgrundlage genommen wurde, ohne dass ein „neuer“ überlebensfördernder Megakaryozyt rechtzeitig diese Funktion übernehmen konnte. Ein derartiges Szenario könnte dann in der beobachteten Abnahme der Plasmazell-Zahl resultieren.

Eine andere Möglichkeit der Interaktion zwischen Megakaryozyten und Plasmazellen könnte sein, dass sie beide durch die gleiche, SDF1- α produzierende Stromazelle angelockt werden und daher im Gewebe benachbart liegen, ohne dass Megakaryozyten aktiv an der Regulation des Plasmazell-Überlebens beteiligt sind. Aufgrund des vorübergehenden raschen Anstiegs der Megakaryozytenzahlen wären Plasmazellen aus dieser gemeinsamen Nische verdrängt worden und so vermutlich apoptotisch geworden. Um dies auszuschließen, sind weitere Studien notwendig.

Das TPO-Experiment ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die Wechselwirkung mit der Umgebung eine entscheidende Rolle für die Lebensdauer von Plasmazellen in der Milz hat. Außerdem zeigt sich, dass die Behandlung mit TPO als potentieller Therapieansatz zur Regulation langlebiger Plasmazellen in Frage kommt.

4.3.10 Versuche zur Depletion von Plasmazellen in NZB/W Mäusen

Ziel dieser Arbeit war es, die Biologie langlebiger Plasmazellen in NZB/W Mäusen zu untersuchen, um Ansätze für neue Therapien zur Reduktion der Plasmazell-Zahlen in NZB/W Mäusen zu identifizieren. Zusätzlich wurden einige Versuche zur Depletion dieser Zellen durchgeführt.

Zum einen wurden die Tiere mit depletierenden Antikörpern behandelt. Als Zielantigene dienten B220 und MHCII, die auf der Oberfläche von B-Zellen und Plasmablasten ausgeprägt werden und im Verlauf der Ausdifferenzierung in reife Plasmazellen herunterreguliert, allerdings dennoch schwach ausgeprägt werden. Vergleichbar hierzu verhält es sich mit dem Oberflächenmolekül CD20, das auf humanen B-Zellen ausgeprägt ist und im Lauf der terminalen Differenzierung zur

Plasmazelle verloren geht. Im Menschen führt die Behandlung mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab in einigen Patienten zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsbildes. Unter der in der vorliegenden Arbeit angewandten Behandlungsform hingegen führte weder die Injektion von anti-B220 Antikörpern, noch die von anti-MHCII Antikörpern zu einer messbaren Reduktion der Zahl Antikörper-produzierender Zellen in Milz oder Knochenmark von NZB/W Mäusen. Auch die Behandlung mit dem Fusionsprotein IP-10:Fc zeigte keinen Effekt auf diese Zellen. Die Injektion der Substanz Poly(I:C), die eine massive Störung der Homöostase der Knochenmarks-Zellen zur Folge hatte, führte sogar zu einem Anstieg in der Anzahl von Plasmablasten im Knochenmark. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Injektion eine Immunantwort hervorgerufen hat, die zur Bildung neuer Plasmablasten geführt hat.

Sehr gute Resultate wurden hingegen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib erzielt. Dieser wird in der Klinik bereits erfolgreich zur Therapie von Patienten mit Multiplem Myelom angewandt. Die Wirkungsweise beruht auf der Inhibition des NF- κ B Signalweges, was zum einen durch veränderte Zytokinproduktion die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst und ein verändertes Adhäsionsverhalten zwischen Tumor- und Stromazellen zur Folge hat (100). Zum anderen führt Bortezomib aber auch direkt zur Apoptose der Myelomzellen, indem aufgrund der Akkumulation fehlerhaft gefalteter Proteine die terminale „unfolded protein response“ (UPR) induziert wird (102, 133). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Reinhard Voll aus Erlangen wurden die Auswirkungen dieses Proteasom-Inhibitors auf kurz- und langlebige Plasmazellen in NZB/W Mäusen untersucht. Die zweimalige Injektion innerhalb von 48 Stunden führte in der Milz zu einer signifikanten Depletion beider Plasmazell-Populationen. Im Knochenmark konnte lediglich bei den Plasmablasten eine signifikante Abnahme beobachtet werden, nicht jedoch bei den langlebigen Plasmazellen. In der Arbeitsgruppe von Reinhard Voll wurden auch die Auswirkungen einer Langzeit-Behandlung von NZB/W Mäusen mit Bortezomib untersucht. Hierbei waren Milz- und Knochenmarks-Plasmazellen gleichermaßen betroffen (Neubert et al,

Manuskript in Revision). Wurde mit der Therapie begonnen, ehe die Tiere messbare IgG anti-dsDNS Antikörpertiter im Serum aufwiesen, so blieben diese auch in den folgenden 10 Monaten kaum nachweisbar. Auch die Therapie von Tieren mit bereits messbaren IgG anti-dsDNS Antikörpertitern zeigte ein drastische Wirkungen: in diesen Tieren konnten keine Anzeichen einer Glomerulonephritis gefunden werden, sie entwickelten keine Proteinurie und kein Tier war 10 Monate nach Beginn der Behandlung gestorben, im Vergleich zu 9 von 10 bei den Kontrolltieren. Neben den Plasmazellen kam es lediglich bei den follikulären B-Zellen und Keimzentrums B-Zellen zu signifikanten Reduktionen (Neubert et al, Manuskript in Revision). CD4(+) und CD8(+) T-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen blieben nach der Bortezomib-Gabe in ihrer Anzahl unverändert.

Die Behandlung mit Bortezomib ist die erste beschriebene Therapie zur Eliminierung sowohl kurz- als auch langlebiger Plasmazellen in NZB/W Mäusen, die guten Erfolg zeigt. Bortezomib stellt also eine neue, sehr viel versprechende Therapieoption für Lupuspatienten dar.

Interessanterweise führte auch die Behandlung von BALB/c Mäusen mit TPO zu einer signifikanten Reduktion insbesondere der Anzahl langlebiger Plasmazellen. Die TPO Behandlung ist somit ein anderer, neuer Ansatz, um diese Zellen zu eliminieren.

4.3.11 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mikroumgebung in der Milz der autoimmunen NZB/W Mäuse eine wichtige Rolle für das erhöhte Überleben dieser Zellen spielt. Der genaue Beitrag von Plasmazell-autonomen Faktoren blieb unklar. Durch die Analyse chimärer Mäuse, deren Milz-Stroma von einem nicht-autoimmunen Mausstamm aufgebaut ist, wogegen das B-Zell-Kompartiment vom NZB-Hintergrund stammt, soll der Beitrag der Zell-autonomen Eigenschaften zum erhöhten Plasmazell-Überleben in zukünftigen Experimenten direkt untersucht werden.

Als potentieller Bestandteil der Plasmazell-Überlebensnische konnten Megakaryozyten identifiziert werden. Um die Rolle der Megakaryozyten am Plasmazell-Überleben genauer zu untersuchen, sind weitere Studien nötig. So soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob die Megakaryozyten, die in der Milz von NZB/W Mäusen neben Plasmazellen gefunden werden können, Plasmazell-Überlebensfaktoren wie IL-6, TNF- α oder APRIL produzieren, wie dies für humane Knochenmarks-Megakaryozyten beschrieben ist. Außerdem kann der Beitrag von Megakaryozyten für das Plasmazell-Überleben durch die Analyse des Plasmazell-Kompartiments von genetisch veränderten Mäusen untersucht werden, die eine verminderte (c-Mpl^{-/-} Mäuse) bzw. eine erhöhte Megakaryozytenzahl (PECAM^{-/-} Mäuse, (134)) aufweisen.

Wie in der Arbeit gezeigt werden konnte, führte die Behandlung nicht-autoimmuner Mäuse mit TPO zu einer Reduktion der Anzahl langlebiger Plasmazellen. Vermutlich ist dies die Folge einer Störung der Plasmazell-Überlebensnische. Ob diese Behandlung auch in autoimmunen NZB/W Mäusen eine Depletion langlebiger Plasmazellen zur Folge hat, ist in zukünftigen Versuchen zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Die Ursachen für die ungewöhnlich hohe Anzahl langlebiger Plasmazellen in den Milzen von autoimmunen NZB/W Mäusen sind bisher nicht bekannt und wurden in dieser Arbeit untersucht. Zugleich wurden Ansätze entwickelt, um langlebige Plasmazellen gezielt zu eliminieren.

Die Analyse des Plasmazell-Kompartiments in IL-6^{-/-} und Fc γ RIIb^{-/-} Mäusen und die Untersuchung des Überlebens isolierter Plasmazellen aus verschiedenen Mausstämmen zeigten, dass Zell-autonome Faktoren eine Rolle beim verstärkten Überleben von Plasmazellen im NZB/W Mausstamm spielen können, jedoch nicht die maßgeblichen Ursachen sind. Lymphknoten von NZB/W Mäusen enthielten wesentlich geringere Frequenzen langlebiger Plasmazellen als die Milzen, obwohl Plasmazellen in beiden Organen die intrinsischen Voraussetzungen besitzen um langlebig zu werden. Dies kann als deutlicher Hinweis darauf angesehen werden, dass das ungewöhnliche Plasmazell-Überleben in der Milz durch eine veränderte stromale Umgebung zustande kommt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde beobachtet, dass die Plasmazellen in der Milz der NZB/W Mäuse mit SDF-1 produzierenden Zellen kolo-kalisiert sind, welche auch Bestandteil von Plasmazell-Überlebensnischen im Knochenmark sind. Außerdem wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben, dass Plasmazellen mit Megakaryozyten assoziiert sind, und dass die Anzahl dieser Zellen in der Milz der NZB/W Mäuse, ebenso wie die Anzahl von Plasmazellen, deutlich erhöht ist. Es ist bekannt, dass Megakaryozyten mehrere Plasmazell-Überlebensfaktoren produzieren. Eine spezifische experimentelle Beeinflussung der Megakaryopoese mittels Thrombopoietin-Injektion hatte eine deutliche Depletion reifer Plasmazellen *in vivo* zur Folge. Diese Ergebnisse zeigen, dass Plasmazellen in NZB/W Milzen mit Megakaryozyten wechselwirken und dass die Modulation der Megakaryopoese einen neuen Ansatzpunkt zur Eliminierung autoreaktiver Plasmazellen darstellt. Unter den hier getesteten Ansätzen zur Depletion langlebiger Plasmazellen war

außerdem die Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib sehr erfolgreich.

Summary

The number of long-lived plasma cells in spleen of autoimmune NZB/W mice is highly increased compared to non-autoimmune mice. In this study, the basis for the abnormal plasma cell survival in NZB/W mice was investigated and different strategies for therapeutic depletion of these cells were tested.

Analysis of the plasma cell compartments in IL-6^{-/-} and FcγRIIb^{-/-} mice together with *in vitro* results on the survival of isolated plasma cells of different mouse strains indicated that plasma cell autonomous factors may contribute to the increased survival, but could not solely explain this phenomenon.

The frequency of long-lived plasma cells was much lower in the lymph nodes of NZB/W mice than in their spleens, though lymph node plasma cells exhibit all intrinsic pre-requisites to become long-lived. These results suggest that changes in the stromal environment of the spleen lead to an increased plasma cell survival in this organ. In accordance with this hypothesis, most splenic NZB/W plasma cells were found to be co-localized with SDF-1 producing cells. Such cells are part of the plasma cell survival niche in the bone marrow. Additionally, in this study it was shown that about 40 % of all plasma cells are associated with megakaryocytes, which has never been reported so far. The numbers of megakaryocytes, though very rare in normal spleens, were increased in the spleens of autoimmune mice, which goes along with the increase of long-lived plasma cells. It is known that megakaryocytes produce multiple plasma cell survival factors. A manipulation of the megakaryopoiesis by the injection of thrombopoietin *in vivo* resulted in a remarkable depletion of long-lived plasma cells. These results clearly show an interplay between plasma cells and megakaryocytes in the spleen of NZB/W mice. Manipulation of megakaryopoiesis by thrombopoietin administration is a novel strategy to eliminate long-lived plasma cells. Also, application of bortezomib, a potent proteasome inhibitor, was successfully used for depletion of long-lived plasma cells.

6 Referenzen

1. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5:606.
2. Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. 2002. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
3. Meffre, E., R. Casellas, and M. C. Nussenzweig. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* 1:379.
4. Tsuiji, M., S. Yurasov, K. Velinzon, S. Thomas, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J Exp Med* 203:393.
5. Smith, K. G., T. D. Hewitson, G. J. Nossal, and D. M. Tarlinton. 1996. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 26:444.
6. Sze, D. M., K. M. Toellner, C. Garcia de Vinuesa, D. R. Taylor, and I. C. MacLennan. 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192:813.
7. O'Connor, B. P., M. W. Gleeson, R. J. Noelle, and L. D. Erickson. 2003. The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev* 194:61.
8. Chen-Kiang, S. 2005. Biology of plasma cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:493.
9. Fischer, S. F., P. Bouillet, K. O'Donnell, A. Light, D. M. Tarlinton, and A. Strasser. 2007. Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* 110:3978.
10. Manz, R. A., M. Lohning, G. Cassese, A. Thiel, and A. Radbruch. 1998. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 10:1703.
11. Radbruch, A., G. Muehlinghaus, E. O. Luger, A. Inamine, K. G. Smith, T. Dorner, and F. Hiepe. 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6:741.
12. Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133.
13. Slifka, M. K., and R. Ahmed. 1998. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 10:252.
14. McHeyzer-Williams, M. G., and R. Ahmed. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 11:172.
15. Hauser, A. E., G. F. Debes, S. Arce, G. Cassese, A. Hamann, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 169:1277.
16. Nie, Y., J. Waite, F. Brewer, M. J. Sunshine, D. R. Littman, and Y. R. Zou. 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 200:1145.

17. McMillan, R., R. L. Longmire, R. Yelenosky, J. E. Lang, V. Heath, and C. G. Craddock. 1972. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol* 109:1386.
18. Terstappen, L. W., S. Johnsen, I. M. Segers-Nolten, and M. R. Loken. 1990. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76:1739.
19. Brieva, J. A., E. Roldan, M. L. De la Sen, and C. Rodriguez. 1991. Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation. *Immunology* 72:580.
20. Kunkel, E. J., C. H. Kim, N. H. Lazarus, M. A. Vierra, D. Soler, E. P. Bowman, and E. C. Butcher. 2003. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 111:1001.
21. Kunkel, E. J., and E. C. Butcher. 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3:822.
22. Cyster, J. G. 2003. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* 194:48.
23. Cassese, G., S. Lindenau, B. de Boer, S. Arce, A. Hauser, G. Riemekasten, C. Berek, F. Hiepe, V. Krenn, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2001. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 31:2726.
24. Kim, H. J., V. Krenn, G. Steinhauser, and C. Berek. 1999. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 162:3053.
25. Piali, L., C. Weber, G. LaRosa, C. R. Mackay, T. A. Springer, I. Clark-Lewis, and B. Moser. 1998. The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur J Immunol* 28:961.
26. Muehlinghaus, G., L. Cigliano, S. Huehn, A. Peddinghaus, H. Leyendeckers, A. E. Hauser, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Arce, and R. A. Manz. 2005. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood* 105:3965.
27. Cassese, G., S. Arce, A. E. Hauser, K. Lehnert, B. Moewes, M. Mostarac, G. Muehlinghaus, M. Szyska, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171:1684.
28. Minges Wols, H. A., G. H. Underhill, G. S. Kansas, and P. L. Witte. 2002. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol* 169:4213.
29. Manz, R. A., A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23:367.
30. Nagasawa, T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6:107.

31. Moser, K., K. Tokoyoda, A. Radbruch, I. MacLennan, and R. A. Manz. 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 18:265.
32. Tokoyoda, K., T. Egawa, T. Sugiyama, B. I. Choi, and T. Nagasawa. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707.
33. Harada, H., M. M. Kawano, N. Huang, Y. Harada, K. Iwato, O. Tanabe, H. Tanaka, A. Sakai, H. Asaoku, and A. Kuramoto. 1993. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81:2658.
34. O'Connor, B. P., V. S. Raman, L. D. Erickson, W. J. Cook, L. K. Weaver, C. Ahonen, L. L. Lin, G. T. Mantchev, R. J. Bram, and R. J. Noelle. 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199:91.
35. Hofer, T., G. Muehlinghaus, K. Moser, T. Yoshida, E. M. H. K. Hebel, A. Hauser, B. Hoyer, O. L. E. T. Dorner, R. A. Manz, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2006. Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 211:295.
36. Moser, K., G. Muehlinghaus, R. Manz, H. Mei, C. Voigt, T. Yoshida, T. Dorner, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett*.
37. Odendahl, M., H. Mei, B. F. Hoyer, A. M. Jacobi, A. Hansen, G. Muehlinghaus, C. Berek, F. Hiepe, R. Manz, A. Radbruch, and T. Dorner. 2005. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105:1614.
38. Riemekasten, G., and B. H. Hahn. 2005. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology (Oxford)* 44:975.
39. Alarcon-Segovia, D., and A. R. Cabral. 1996. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 8:403.
40. Raz, E., M. Brezis, E. Rosenmann, and D. Eilat. 1989. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 142:3076.
41. Citera, G., and W. A. Wilson. 1993. Ethnic and geographic perspectives in SLE. *Lupus* 2:351.
42. Sels, F., J. Dequeker, J. Verwilghen, and J. M. Mbuyi-Muamba. 1996. SLE and osteoporosis: dependence and/or independence on glucocorticoids. *Lupus* 5:89.
43. Kono, D. H., and A. N. Theofilopoulos. 1996. Genetic contributions to SLE. *J Autoimmun* 9:437.
44. Wakeland, E. K., K. Liu, R. R. Graham, and T. W. Behrens. 2001. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 15:397.
45. Mohan, C. 2001. Murine lupus genetics: lessons learned. *Curr Opin Rheumatol* 13:352.

46. GaipI, U. S., A. Kuhn, A. Sheriff, L. E. Munoz, S. Franz, R. E. Voll, J. R. Kalden, and M. Herrmann. 2006. Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr Dir Autoimmun* 9:173.
47. Kyttaris, V. C., S. Krishnan, and G. C. Tsokos. 2006. Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function. *Autoimmunity* 39:705.
48. Nath, S. K., J. Kilpatrick, and J. B. Harley. 2004. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Curr Opin Immunol* 16:794.
49. Mok, C. C., and C. S. Lau. 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481.
50. Folzenlogen, D., M. F. Hofer, D. Y. Leung, J. H. Freed, and M. K. Newell. 1997. Analysis of CD80 and CD86 expression on peripheral blood B lymphocytes reveals increased expression of CD86 in lupus patients. *Clin Immunol Immunopathol* 83:199.
51. Desai-Mehta, A., L. Lu, R. Ramsey-Goldman, and S. K. Datta. 1996. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97:2063.
52. Odendahl, M., A. Jacobi, A. Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, A. Radbruch, and T. Dorner. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 165:5970.
53. Jacobi, A. M., M. Odendahl, K. Reiter, A. Bruns, G. R. Burmester, A. Radbruch, G. Valet, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2003. Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:1332.
54. Yurasov, S., T. Tiller, M. Tsuiji, K. Velinzon, V. Pascual, H. Wardemann, and M. C. Nussenzweig. 2006. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med* 203:2255.
55. Hahn, B. H. 1998. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 338:1359.
56. Chan, O. T., L. G. Hannum, A. M. Haberman, M. P. Madaio, and M. J. Shlomchik. 1999. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189:1639.
57. Chan, O. T., M. P. Madaio, and M. J. Shlomchik. 1999. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 169:107.
58. Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain, and F. E. Lund. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1:475.
59. Chan, O. T., M. P. Madaio, and M. J. Shlomchik. 1999. B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas-intact MRL model of systemic autoimmunity. *J Immunol* 163:3592.
60. Kelley, V. E., and A. Winkelstein. 1980. Age- and sex-related glomerulonephritis in New Zealand white mice. *Clin Immunol Immunopathol* 16:142.

61. Theofilopoulos, A. N., and F. J. Dixon. 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37:269.
62. Roy, V., G. Bonventi, Y. Cai, R. Macleod, and J. E. Wither. 2007. Immune mechanisms leading to abnormal B cell selection and activation in New Zealand Black mice. *Eur J Immunol* 37:2645.
63. Santiago-Raber, M. L., C. Laporte, L. Reininger, and S. Izui. 2004. Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun Rev* 3:33.
64. Theofilopoulos, A. N., D. L. Shawler, R. A. Eisenberg, and F. J. Dixon. 1980. Splenic immunoglobulin-secreting cells and their regulation in autoimmune mice. *J Exp Med* 151:446.
65. Hoyer, B. F., K. Moser, A. E. Hauser, A. Peddinghaus, C. Voigt, D. Eilat, A. Radbruch, F. Hiepe, and R. A. Manz. 2004. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 199:1577.
66. Toubi, E., and A. Kessel. 2000. Intravenous cyclophosphamide in SLE. *Lupus* 9:478.
67. Gescuk, B. D., and J. C. Davis, Jr. 2002. Novel therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 14:515.
68. Goldblatt, F., and D. A. Isenberg. 2005. New therapies for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 140:205.
69. Chambers, S. A., and D. Isenberg. 2005. Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. *Lupus* 14:210.
70. Thatayatikom, A., and A. J. White. 2006. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 5:18.
71. Grammer, A. C., R. Slota, R. Fischer, H. Gur, H. Girschick, C. Yarboro, G. G. Illei, and P. E. Lipsky. 2003. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest* 112:1506.
72. Kelsoe, G. 2003. Therapeutic CD154 antibody for lupus: promise for the future? *J Clin Invest* 112:1480.
73. Anolik, J. H., J. Barnard, A. Cappione, A. E. Pugh-Bernard, R. E. Felgar, R. J. Looney, and I. Sanz. 2004. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3580.
74. Ferraro, A. J., M. T. Drayson, C. O. Savage, and I. C. MacLennan. 2008. Levels of autoantibodies, unlike antibodies to all extrinsic antigen groups, fall following B cell depletion with Rituximab. *Eur J Immunol* 38:292.
75. Passweg, J., and A. Tyndall. 2007. Autologous stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Semin Hematol* 44:278.
76. Daikh, D. I., and D. Wofsy. 2001. Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide. *J Immunol* 166:2913.
77. Ramanujam, M., X. Wang, W. Huang, L. Schiffer, C. Grimaldi, A. Akkerman, B. Diamond, M. P. Madaio, and A. Davidson. 2004. Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 173:3524.

78. Schneider, P. 2005. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 17:282.
79. Lin, W. Y., Q. Gong, D. Seshasayee, Z. Lin, Q. Ou, S. Ye, E. Suto, J. Shu, W. Pun Lee, C. W. Lee, G. Fuh, M. Leabman, S. Iyer, K. Howell, T. Gelzleichter, J. Beyer, D. Danilenko, S. Yeh, L. E. Deforge, A. Ebens, J. S. Thompson, C. Ambrose, M. Balazs, M. A. Starovasnik, and F. Martin. 2007. Anti-BR3 antibodies: a new class of B-cell immunotherapy combining cellular depletion and survival blockade. *Blood* 110:3959.
80. Stohl, W. 2005. BlySfulness does not equal blissfulness in systemic lupus erythematosus: a therapeutic role for BLYS antagonists. *Curr Dir Autoimmun* 8:289.
81. Liang, B., D. B. Gardner, D. E. Griswold, P. J. Bugelski, and X. Y. Song. 2006. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunology* 119:296.
82. Balabanian, K., J. Couderc, L. Bouchet-Delbos, A. Amara, D. Berrebi, A. Foussat, F. Baleux, A. Portier, I. Durand-Gasselien, R. L. Coffman, P. Galanaud, M. Peuchmaur, and D. Emilie. 2003. Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol* 170:3392.
83. Jecker, P., A. Beuleke, I. Dressendorfer, R. Pabst, and J. Westermann. 1997. Long-term oral application of 5-bromo-2-deoxyuridine does not reliably label proliferating immune cells in the LEW rat. *J Histochem Cytochem* 45:393.
84. Ikawa, K., T. Nishioka, Z. Yu, Y. Sugawara, J. Kawagoe, T. Takizawa, V. Primo, B. Nikolic, T. Kuroishi, T. Sasano, H. Shimauchi, H. Takada, Y. Endo, and S. Sugawara. 2005. Involvement of neutrophil recruitment and protease-activated receptor 2 activation in the induction of IL-18 in mice. *J Leukoc Biol* 78:1118.
85. Matsuzaki, J., T. Tsuji, K. Chamoto, T. Takeshima, F. Sendo, and T. Nishimura. 2003. Successful elimination of memory-type CD8⁺ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell Immunol* 224:98.
86. Chervenick, P. A., D. R. Boggs, J. C. Marsh, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe. 1968. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am J Physiol* 215:353.
87. Pritchard, N. R., and K. G. Smith. 2003. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* 108:263.
88. Ravetch, J. V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275.
89. Xiang, Z., A. J. Cutler, R. J. Brownlie, K. Fairfax, K. E. Lawlor, E. Severinson, E. U. Walker, R. A. Manz, D. M. Tarlinton, and K. G. Smith. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8:419.

90. Bolland, S., and J. V. Ravetch. 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13:277.
91. Bolland, S., Y. S. Yim, K. Tus, E. K. Wakeland, and J. V. Ravetch. 2002. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcgammaRIIB(-/-) mice. *J Exp Med* 195:1167.
92. Pritchard, N. R., A. J. Cutler, S. Uribe, S. J. Chadban, B. J. Morley, and K. G. Smith. 2000. Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcgammaRII. *Curr Biol* 10:227.
93. Delogu, A., A. Schebesta, Q. Sun, K. Aschenbrenner, T. Perlot, and M. Busslinger. 2006. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24:269.
94. Long, M. W., and N. Williams. 1982. Differences in the regulation of megakaryocytopoiesis in the murine bone marrow and spleen. *Leuk Res* 6:721.
95. Tomer, A. 2004. Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* 104:2722.
96. Jiang, S., J. D. Levine, Y. Fu, B. Deng, R. London, J. E. Groopman, and H. Avraham. 1994. Cytokine production by primary bone marrow megakaryocytes. *Blood* 84:4151.
97. Wickenhauser, C., J. Lorenzen, J. Thiele, A. Hillienhof, K. Jungheim, B. Schmitz, M. L. Hansmann, and R. Fischer. 1995. Secretion of cytokines (interleukins-1 alpha, -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal human bone marrow megakaryocytes. *Blood* 85:685.
98. Bonci, D., M. Hahne, N. Felli, C. Peschle, and R. De Maria. 2004. Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis. *Blood* 104:3169.
99. Avecilla, S. T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D. K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T. E. Hartman, N. R. Hackett, R. G. Crystal, L. Witte, D. J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage, and S. Rafii. 2004. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10:64.
100. Rajkumar, S. V., P. G. Richardson, T. Hideshima, and K. C. Anderson. 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 23:630.
101. Richardson, P. G., C. Mitsiades, T. Hideshima, and K. C. Anderson. 2006. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57:33.
102. Meister, S., U. Schubert, K. Neubert, K. Herrmann, R. Burger, M. Gramatzki, S. Hahn, S. Schreiber, S. Wilhelm, M. Herrmann, H. M. Jack,

- and R. E. Voll. 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 67:1783.
103. Shlomchik, M. J., and M. P. Madaio. 2003. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis. *Springer Semin Immunopathol* 24:363.
 104. Kono, D. H., and A. N. Theofilopoulos. 2006. Genetics of SLE in mice. *Springer Semin Immunopathol* 28:83.
 105. Kelly, J. A., K. L. Moser, and J. B. Harley. 2002. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 3 Suppl 1:S71.
 106. Chu, V. T., P. Enghard, G. Riemekasten, and C. Berek. 2007. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* 179:5947.
 107. Manz, R. A., S. Arce, G. Cassese, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14:517.
 108. Kopf, M., S. Herren, M. V. Wiles, M. B. Pepys, and M. H. Kosco-Vilbois. 1998. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med* 188:1895.
 109. Underhill, G. H., H. A. Minges Wols, J. L. Fornek, P. L. Witte, and G. S. Kansas. 2002. IgG plasma cells display a unique spectrum of leukocyte adhesion and homing molecules. *Blood* 99:2905.
 110. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1.
 111. Takai, T., M. Ono, M. Hikida, H. Ohmori, and J. V. Ravetch. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379:346.
 112. Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, T. T. Lu, V. N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, Y. R. Zou, D. R. Littman, and J. G. Cyster. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194:45.
 113. Oba, Y., J. W. Lee, L. A. Ehrlich, H. Y. Chung, D. F. Jelinek, N. S. Callander, R. Horuk, S. J. Choi, and G. D. Roodman. 2005. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol* 33:272.
 114. Abe, M., K. Hiura, J. Wilde, K. Moriyama, T. Hashimoto, S. Ozaki, S. Wakatsuki, M. Kosaka, S. Kido, D. Inoue, and T. Matsumoto. 2002. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 100:2195.
 115. Yaccoby, S., M. J. Wezeman, A. Henderson, M. Cottler-Fox, Q. Yi, B. Barlogie, and J. Epstein. 2004. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res* 64:2016.
 116. Speziani, C., A. Rivollier, A. Gallois, F. Coury, M. Mazzorana, O. Azocar, M. Flacher, C. Bella, J. Tebib, P. Jurdic, C. Roubardin-Combe, and C.

- Delprat. 2007. Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially regulated by innate and adaptive cytokines. *Eur J Immunol* 37:747.
117. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, and J. R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147:22.
118. Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili, and W. Vainchenker. 2007. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:318.
119. Gurney, A. L., K. Carver-Moore, F. J. de Sauvage, and M. W. Moore. 1994. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 265:1445.
120. Hodohara, K., N. Fujii, N. Yamamoto, and K. Kaushansky. 2000. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood* 95:769.
121. Junt, T., H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D. D. Wagner, T. Graf, J. E. Italiano, Jr., R. A. Shivdasani, and U. H. von Andrian. 2007. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317:1767.
122. Lane, W. J., S. Dias, K. Hattori, B. Heissig, M. Choy, S. Y. Rabbany, J. Wood, M. A. Moore, and S. Rafii. 2000. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood* 96:4152.
123. Sthoeger, Z. M., H. Zinger, and E. Mozes. 2003. Beneficial effects of the anti-oestrogen tamoxifen on systemic lupus erythematosus of (NZBxNZW)F1 female mice are associated with specific reduction of IgG3 autoantibodies. *Ann Rheum Dis* 62:341.
124. Ziakas, P. D., J. G. Routsias, S. Giannouli, A. Tasidou, A. G. Tzioufas, and M. Voulgarelis. 2006. Suspects in the tale of lupus-associated thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol* 145:71.
125. Nagahisa, H., Y. Nagata, T. Ohnuki, M. Osada, T. Nagasawa, T. Abe, and K. Todokoro. 1996. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* 87:1309.
126. Wolber, E. M., and W. Jelkmann. 2002. Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. *News Physiol Sci* 17:6.
127. de Sauvage, F. J., K. Carver-Moore, S. M. Luoh, A. Ryan, M. Dowd, D. L. Eaton, and M. W. Moore. 1996. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 183:651.
128. de Sauvage, F. J., P. E. Hass, S. D. Spencer, B. E. Malloy, A. L. Gurney, S. A. Spencer, W. C. Darbonne, W. J. Henzel, S. C. Wong, W. J. Kuang, and et al. 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369:533.
129. Kaushansky, K., S. Lok, R. D. Holly, V. C. Broudy, N. Lin, M. C. Bailey, J. W. Forstrom, M. M. Buddle, P. J. Oort, F. S. Hagen, and et al. 1994.

- Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369:568.
130. Kaushansky, K. 1997. Thrombopoietin: understanding and manipulating platelet production. *Annu Rev Med* 48:1.
 131. Alexander, W. S., A. W. Roberts, N. A. Nicola, R. Li, and D. Metcalf. 1996. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 87:2162.
 132. Arnold, J. T., N. C. Daw, P. E. Stenberg, D. Jayawardene, D. K. Srivastava, and C. W. Jackson. 1997. A single injection of pegylated murine megakaryocyte growth and development factor (MGDF) into mice is sufficient to produce a profound stimulation of megakaryocyte frequency, size, and ploidy. *Blood* 89:823.
 133. Obeng, E. A., L. M. Carlson, D. M. Gutman, W. J. Harrington, Jr., K. P. Lee, and L. H. Boise. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107:4907.
 134. Wu, Y., T. Welte, M. Michaud, and J. A. Madri. 2007. PECAM-1: a multifaceted regulator of megakaryocytopoiesis. *Blood* 110:851.

Anhang**Abkürzungsverzeichnis**

(-)	negative für einen Merkmal
(+)	positiv für einen Merkmal
(++)	stark positiv für ein Merkmal
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ASZ	Antikörper-sezernierende Zelle
BAFF	B lymphocyte activation factor
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue
BCMA	B cell maturation antigen
bio	Biotin
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CC	C-Chemokin
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
CGG	chicken gamma globulin
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CXCL	CX-Chemokin
Cy5	Cychrome 5
DAPI	4', 6-diamino-2-phenylindole, dilactate
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
FACS	fluorescence-activated cell sorting

FDC	Follikuläre Dendritische Zelle
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GALT	gut-associated lymphoid tissue
HCl	Salzsäure
HLA	human leukozyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	interferon-gamma-inducible protein-10
KLH	keyhole limpet hemocyanin
l	Liter
L	Ligand
m	milli bzw. meter
M	Molar
MACS	magnetic cell sorting
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
μ	mikro
NP	(4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl)Acetyl
NZB	New Zealand Black
NZW	New Zealand White
Ova	Ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyllprotein
PNA	peanut agglutinin
R	Rezeptor

RNA	ribonucleic acid
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAC1	transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoietin
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Hoyer, B. F., K. Moser, A. E. Hauser, A. Peddinghaus, C. Voigt, D. Eilat, A. Radbruch, F. Hiepe, and R. A. Manz. 2004. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 199:1577.

Moser, K., G. Muehlinghaus, R. Manz, H. Mei, C. Voigt, T. Yoshida, T. Dorner, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett*.

Manz, R. A., K. Moser, G. R. Burmester, A. Radbruch, and F. Hiepe. 2006. Immunological memory stabilizing autoreactivity. *Curr Top Microbiol Immunol* 305:241.

Moser, K., K. Tokoyoda, A. Radbruch, I. MacLennan, and R. A. Manz. 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 18:265.

Hofer, T., G. Muehlinghaus, K. Moser, T. Yoshida, E. M. H, K. Hebel, A. Hauser, B. Hoyer, O. L. E, T. Dorner, R. A. Manz, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2006. Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 211:295.

Panne, D., K. Moser, I. Mumtaz, O. Winter, C. Voigt, P. Enghard, B. F. Hoyer, A. Radbruch, G. Riemekasten, S. Fillatreau, R. A. Manz and F. Hiepe. 2008. B cell and plasma cell homing to inflamed kidneys of NZB/W mice through distinct CXCR3- and CXCR5-mediated mechanisms. Manuskript in Revision (*Arthritis & Rheumatism*)

Neubert, K., S. Meister, K. Moser, F. Weisel, D. Maseda, K. Amann, C. Wiethe, T. Winkler, J. R. Kalden, R. A. Manz and R. Voll. 2008. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects NZB/W F1 lupus mice from nephritis. Manuskript in Revision (*Nature Medicine*)

Kongressbeiträge

2005

36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2005, Kiel

Posterpräsentation: "Analyzing plasma cell survival in NZB/W mice."

2006

4. B-Zell Forum, März 2006, Kloster Banz

Posterpräsentation: "Analyzing plasma cell survival in NZB/W mice."

2007

37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2007, Heidelberg

Vortrag und Posterpräsentation: "Plasma cell environment and survival in the spleen of NZB/W mice."

Danksagung

Mein Dank gilt zahlreichen Personen, die mich über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Betreuer Rudi Manz bedanken, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und immer wieder ein motivierendes „schneller arbeiten“ auf den Lippen hatte. Vielen Dank für Deine erstklassige Betreuung!

Ferner gilt mein Dank Andreas Radbruch für die Möglichkeit, diese Arbeit am DRFZ anzufertigen.

Anette, Oliver, Martin und Nicole danke ich für die praktische Unterstützung. Ihnen und zusätzlich allen ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich außerdem für die intensiven Diskussionen und insbesondere für die gute Arbeitsatmosphäre.

Für das kritische Gegenlesen dieser Arbeit danke ich Ati und Martin. Zusätzlich hierfür und vieles, vieles mehr Anna, meiner Motivatorin in jeglicher Hinsicht!

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Tim gilt mein allergrößter Dank. Ihr habt mich auf all meinen Schritten bis hierher stets unterstützt und motiviert.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Katrin Moser, geb. 20.04.1975 in Bonn, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

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

Berlin, den 12.02.2008

(Katrin Moser)