

Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Etablierung eines humanen Kokultur-Systems zwischen Plasmazellen
und mesenchymalen Knochenmarkstromazellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Hiepe

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. R. Manz
2. Prof. Dr. med. J. Sieper
3. Prof. Dr. med. Th. Kamradt

Datum der Promotion: 18. September 2009

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	4
2	<i>Einleitung</i>	7
2.1	Das angeborene und erworbene Immunsystem	7
2.2	Die humorale Immunität	8
2.2.1	B-Zellentwicklung	8
2.2.2	B-Zellaktivierung und –differenzierung zur Plasmazelle	9
2.2.3	Regulierung der Plasmazellentwicklung	10
2.2.4	Charakterisierung von Plasmazellen und ihren Vorläufern.....	11
2.2.5	Migrationsverhalten von Plasmablasten und Plasmazellen.....	13
2.2.6	Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen	15
2.2.7	Das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische	17
2.3	Das Knochenmark	19
2.3.1	Aufbau	19
2.3.2	Mesenchymale stromale Knochenmarkzellen.....	20
3	<i>Zielsetzung</i>	22
4	<i>Material und Methoden</i>	23
4.1	Übersicht über die verwendeten Materialien	23
4.1.1	Puffer, Lösungen und Medien.....	23
4.1.2	Antikörper und Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse	24
4.1.3	Materialien für die Isolierung von Plasmazellen.....	25
4.1.4	Geräte.....	25
4.2	Isolation von mononukleären Zellen/Zellisolierung	26
4.2.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension von mononukleären Zellen aus dem Blut.....	26
4.2.2	Herstellung einer Einzelzellsuspension von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark	26
4.3	Zellzahlbestimmung	27
4.3.1	CASY® Zellzählgerät	27
4.3.2	Neubauer-Zählkammer	28
4.4	Durchflusszytometrische Analyse	28
4.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	28
4.4.2	Probenmessungen und Datenauswertung	29
4.4.3	Oberflächenfärbungen.....	30

4.5	Isolation von Plasmazellen mittels magnetisch-assoziiierter Zellsortierung (MACS)	31
4.6	Generierung von mesenchymalen Knochenmarkzellen in Zellkultur.....	32
4.7	Kokultur von mesenchymalen Knochenmarkzellen und Plasmazellen	33
4.8	Graphische Darstellung und Statistik.....	34
5	<i>Ergebnisse</i>.....	35
5.1	Aufbau eines Kokultur-Systems zwischen mesenchymalen Knochenmarkzellen und Plasmazellen ..	35
5.1.1	Experiment - Übersicht	35
5.1.2	Charakterisierung von mesenchymalen Knochenmarkstromazellen.....	36
5.1.3	Isolierung und Charakterisierung von Plasmazellen aus dem peripheren Blut	38
5.1.4	Etablierung einer FACS-Einstellung zur Abgrenzung mesenchymaler Knochenmarkzellen und Plasmazellen	39
5.2	Einfluss der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen auf das Überleben von Plasmazellen	43
5.2.1	Überleben der Plasmazellen in Kokultur an Tag 3.....	43
5.2.2	Überleben der Plasmazellen in Kokultur bis Tag 29.....	45
5.3	Plasmazelladhäsion an mesenchymale Knochenmarkzellen.....	46
5.3.1	Transfer nicht-adhärenter Plasmazellen in Sekundärkulturen.....	47
5.3.2	Einfluss des Bindungsverhaltens auf das Plasmazellüberleben	49
5.4	Einfluss der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen auf die Plasmazellreifung	51
5.4.1	Analyse der CD38 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	51
5.4.2	Analyse der CD20 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	53
5.4.3	Analyse der CD138 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	54
5.4.4	Analyse der CD95 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	55
5.4.5	Analyse der CD19 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	56
5.4.6	Analyse der HLA-DR Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur	56
5.4.7	Analyse der CCR2 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur	57
5.4.8	Analyse der CD31 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur.....	59
5.4.9	Analyse der CD62L Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur	60
6	<i>Diskussion</i>.....	62
6.1	Einleitung	62
6.2	Diskussion der Methodik.....	62
6.2.1	Auswahl der Zellen	62

6.2.2	Isolierung und Identifizierung von Plasmablasten und Plasmazellen im Durchflusszytometer.....	64
6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	65
6.3.1	Mesenchymale stromale Knochenmarkzellen sind eine homogene nicht-hämatopoetische Zellpopulation.....	65
6.3.2	Mesenchymale Knochenmarkzellen unterstützen das Plasmazellüberleben.....	66
6.3.3	Mesenchymale Knochenmarkzellen unterstützen die Plasmazellreifung.....	70
6.3.4	Adhärenz und Nichtadhärenz von Plasmazellen an mesenchymale Knochenmarkzellen ist ein zeitlich begrenzter Prozess.....	76
6.4	Klinische Bedeutung der Arbeit und Ausblick.....	77
7	<i>Zusammenfassung.....</i>	78
8	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	80
9	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	93
10	<i>Danksagung.....</i>	95
11	<i>Lebenslauf</i>	96
12	<i>Erklärung.....</i>	97

2 Einleitung

Das menschliche Immunsystem ist ein hoch differenzierter Apparat, dessen Aufgabe es ist, den Organismus vor Fremdstoffen, Mikroorganismen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Eine Vielzahl von spezialisierten Organen, Geweben, Zellen und Molekülen sind für die Funktion und Aufrechterhaltung dieses komplexen Systems verantwortlich. Durch die Produktion spezifischer Antikörper tragen Plasmazellen maßgeblich zur humoralen Immunität bei (1). Neben dieser herausragenden Schutzfunktion können Plasmazellen aber auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (2, 3), malignen Erkrankungen wie z.B. Multiples Myelom (4), oder Allergien (5) beteiligt sein. Voraussetzung für den Einsatz erfolgreicher Therapien ist ein detailliertes Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen. Dafür ist die Kenntnis der Biologie normaler Plasmazellen und ihrer Vorläufer essentiell, wozu die vorliegende Arbeit beitragen soll.

2.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in die angeborene und erworbene Abwehr unterteilen. Bevor ein Erreger in den Organismus eindringen kann, wird er von physikalischen und chemischen Schutzbarrieren zurückgehalten. Zu ihnen zählen unter anderem eine intakte Epidermis, der Säureschutzmantel der Haut und die Hautflora, Enzyme sowie das Flimmerepithel des oberen Respirationstrakts. Schafft es ein Pathogen dennoch, diese erste Barriere zu überwinden, wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Die angeborenen Abwehrmechanismen werden auch als unspezifisch bezeichnet, da sie zunächst unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger schnell agieren. Bestandteil unspezifischer Abwehrmaßnahmen sind das Monozyten-Makrophagen-System und neutrophile Granulozyten, die fremde Organismen anhand ihrer Oberflächenstruktur erkennen und phagozytieren sowie mit Hilfe des Komplementsystems lysieren. Natürliche Killerzellen (NK Zellen) induzieren den programmierten Zelltod infizierter Zellen. Zudem werden Zytokine und Chemokine sezerniert, die eine akute Entzündungsreaktion im betroffenen Gewebe auslösen bzw. weitere Phagozyten zum Ort des Geschehens locken und somit eine zunehmende Ausbreitung der Krankheitserreger verhindern.

Mit einer Verzögerung von drei bis sieben Tagen folgt die erworbene (adaptive) Immunantwort, die im Gegensatz zur angeborenen Abwehrreaktion spezifisch Pathogene erkennt. Sie wird aktiviert, wenn das unspezifische Immunsystem den eingedrungenen Erreger nicht ausreichend

eliminieren kann. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die B- und T-Lymphozyten. Diese tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die jeweils nur ein bestimmtes Antigen hochspezifisch erkennen können. Durch die Bindung des entsprechenden Antigens werden die Lymphozyten aktiviert, was zu ihrer Proliferation und klonalen Expansion führt. Daraus resultieren viele identische Kopien dieser Zelle, die als Effektorzellen die Bekämpfung der Krankheitserreger gewährleisten. Die humorale Antwort wird mit der Sekretion von spezifischen Antikörpern ausdifferenzierter B-Zellen, den Plasmazellen und ihren unmittelbaren Vorläufern, den Plasmablasten, sichergestellt. Während der Großteil der Zellen nach erfolgreicher Eliminierung der Pathogene stirbt, überleben einige Lymphozyten in Form von langlebigen Gedächtniszellen. Diese bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses, das bei erneutem Kontakt mit demselben Pathogen einen schnelleren und effizienteren Schutz bietet als beim Erstkontakt.

2.2 Die humorale Immunität

2.2.1 B-Zellentwicklung

B-Zellen entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (6). Die Entwicklung ist durch die Abfolge mehrerer Zwischenstufen streng festgelegt und beinhaltet die Bildung eines funktionierenden B-Zellrezeptors. Der B-Zellrezeptor entspricht membrangebundenem Immunglobulin (Antikörper) einer einzigen Spezifität auf der Zelloberfläche. Im Verlauf des Reifungsprozesses der B-Zellen erfolgt eine zufällige Rearrangierung der Gensegmente, die für die schweren und leichten Ketten eines Antikörpers kodieren. Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher B-Zellrezeptoren, die eindringende Antigene spezifisch erkennen und binden können.

Jede B-Zell-Entwicklungsstufe wird anhand ihrer Oberflächenmoleküle und dem Status der Genrekombination der schweren und leichten Kette charakterisiert (7). Zunächst bilden sich antigenunabhängig über verschiedene Zwischenstadien unreife B-Zellen, die erstmalig auf ihrer Oberfläche einen vollständigen B-Zellrezeptor in Form von membranständigem IgM exprimieren. Stromale Zellen aus dem Knochenmark leisten einen wichtigen Beitrag in der B-Zellentwicklung. Als stromale Knochenmarkszellen werden fibroblastenartige, nicht-hämatopoetische Zellen bezeichnet, die u.a. das retikuläre Gerüst des Knochenmarks formen. Durch den Zell-Zell-Kontakt und die Produktion löslicher Faktoren unterstützen sie die Zelldifferenzierung und -proliferation (8). Es folgt ein Selektionsprozess, bei dem autoreaktive B-Zellen anergisch werden oder in Apoptose gehen (9). Überlebende unreife B-Zellen verlassen

dann das Knochenmark und werden in den peripheren sekundären lymphatischen Organen über zwei Übergangsstadien (die transitionalen Stadien T1 und T2) zur reifen, naiven B-Zelle, die neben IgM zusätzlich IgD auf ihrer Oberfläche tragen (10). Abhängig von ihrer Lokalisation ist eine Unterscheidung in zwei Populationen möglich. Ein kleiner Teil der T2 B-Lymphozyten migriert zur Marginalzone der Milz und persistiert dort als naive Marginalzonen B-Zellen (11). Die meisten B-Zellen der Übergangsphase T2 reifen jedoch zu naiven folliculären B-Zellen, die in die Follikel der Milz und Lymphknoten sowie ins Knochenmark wandern (12).

Grundsätzlich können B-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt werden: B1- und B2-Zellen. Während B1-Zellen vorwiegend in der Bauchhöhle anzutreffen sind, stellen B2-Zellen die klassischen B-Zellen dar. Zur Vereinfachung werden die B2-Zellen in dieser Arbeit als B-Zellen bezeichnet.

2.2.2 B-Zellaktivierung und –differenzierung zur Plasmazelle

Reife, naive B-Lymphozyten sind in der Lage, Antigen zu erkennen und werden über deren Bindung aktiviert. Marginalzonen B-Zellen sind die ersten B-Zellen, die auf Antigen reagieren und vermitteln dadurch einen sehr schnellen Schutz (11). Die Stimulation von B-Zellen führt entweder zum Zelltod aufgrund von Autoreaktivität, zur Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörper-sezernierende Plasmablasten (13). Es werden zwei Aktivierungsmechanismen unterschieden: die T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Immunantwort. Beide finden in den sekundären lymphatischen Organen statt.

Sobald ein Proteinantigen an den B-Zellrezeptor bindet, ist die zusätzliche Hilfe von T-Zellen zur Stimulation der B-Zelle notwendig und es kommt zur T-Zell-vermittelten Immunreaktion. Zunächst wird das Antigen von der B-Zelle aufgenommen und in seine Peptidbestandteile gespalten („prozessiert“). Anschließend werden die Peptidfragmente an den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) Klasse II gebunden und auf der B-Zelloberfläche präsentiert. Die so dargebotenen Moleküle können nun von CD4-T-Helferzellen erkannt werden, wenn diese vorher durch das gleiche Antigen einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) aktiviert wurden (14). Es entsteht eine Interaktion zwischen beiden Zellarten, bei der vor allem die Signalübertragung zwischen CD40 (B-Lymphozyt) und seinem Liganden CD40L (T-Lymphozyt) von Bedeutung ist. Außerdem werden die T-Zellen zur Sekretion verschiedener Zytokine wie z.B. den Interleukinen (IL) IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-21 angeregt. Diese Vorgänge fördern die Proliferation der B-Zelle und ihre Differenzierung zum Plasmablasten bis hin zur reifen Plasmazelle (14-17). Viele der

entstandenen, kurzlebigen Plasmazellen residieren in den extrafollikulären Regionen der lymphatischen Organe und sezernieren zumeist IgM Antikörper geringer Affinität (18). Eine Blockade von CD40L hemmt die klonale Expansion der B-Zellen (19).

Ein Teil der follikulären B-Zellen, die entsprechende T-Zellhilfe erhalten, kann zusätzlich Keimzentren bilden. In der so genannten Keimzentrumsreaktion, die mit Phasen starker Proliferation einhergeht, kommt es zur somatischen Hypermutation, bei der sich die variable Region und damit die Affinität des B-Zellrezeptors verändern (20, 21). Im Verlauf der Affinitätsreifung werden B-Zellen positiv selektiert, deren Bindungsaffinität zum spezifischen Antigen dadurch gesteigert wird. Nach wenigen Tagen entstehen aus dieser Reaktion langlebige, ruhende Gedächtnis-B-Zellen (22) und zunächst Plasmablasten mit hoch affinen Antikörpern, die dann zu Plasmazellen reifen (20). Von T-Helferzellen produzierte Zytokine können außerdem einen Klassenwechsel der Antikörper bewirken. Gedächtnis-B-Zellen sind nicht in der Lage Antikörper zu sezernieren. Bei einer Reinfektion oder Auffrischimpfung kommt die Keimzentrumsreaktion schneller zustande und auch die durchschnittliche Affinität der sezernierten Antikörper ist höher.

B-Zellen können auch ohne T-Zellhilfe, das heißt, direkt durch zusätzliche Signale des Antigens selbst aktiviert werden. Zu diesen Antigenen zählen bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide, welche die B-Zellen polyklonal stimulieren. Die meisten Plasmazellen, die aus der T-Zell-unabhängigen Immunantwort hervorgehen, sind kurzlebig und verbleiben in den extrafollikulären Regionen der sekundären lymphatischen Organe, Gedächtnis-B-Zellen werden nicht gebildet (4, 18).

Grundsätzlich können Plasmablasten aus jeder beliebigen aktivierten B-Zelle entstehen. Dazu gehören naive Marginalzonen-B-Zellen und follikuläre B-Zellen, stimulierte Keimzentrums-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen. Es ist jedoch nicht klar, ob die entstehenden Plasmablasten aller Ursprungszellen in der Lage sind, in langlebige Plasmazellen überzugehen (5).

2.2.3 Regulierung der Plasmazellentwicklung

Plasmazellen repräsentieren das Endstadium der B-Zellentwicklung. Die Fähigkeit, sich zur ausdifferenzierten Plasmazelle zu entwickeln, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine Voraussetzung ist die Aktivierung des Gens PRDM1 (positive-regulatory-domain containing 1), das den Transkriptionsfaktor BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) kodiert (23).

BLIMP1 wird von allen Plasmazellen, unabhängig von Entstehungsart und Lebensdauer, in der Milz und im Knochenmark, aber nicht in B-Zellen exprimiert (24, 25). Es gilt als ein molekulares Schlüsselement in der Plasmazellformierung und Antikörperproduktion (26). Folge der BLIMP1-Kodierung ist die Unterdrückung der Transkriptionsfaktoren PAX5 (paired box protein 5) und BCL-6 (B-cell lymphoma 6), die eine wichtige Rolle in der B-Zellfunktion, insbesondere in der Keimzentrumsreaktion, spielen (27). Diese Unterdrückung bewirkt wiederum die Ausprägung von XBP1 (X-box-binding protein 1), den als erstes nachgewiesenen Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Plasmazellen (28). XBP1 kontrolliert die Funktionsweise des endoplasmatischen Retikulums, das durch die erhebliche Antikörperproduktion sehr beansprucht wird (29). Die Arbeitsgruppe um Busslinger zeigte im Mausmodell eine weitere Folge der PAX5-Unterdrückung: die Reaktivierung verschiedener Gene in Plasmazellen, wie z.B. den Chemokinrezeptor CCR2 (30). Außerdem wurde beobachtet, dass Mäuse, deren B-Zellen CCR2 defizient sind, 10fach geringere Mengen spezifischer Antikörper produzierten. Dies deutet auf eine wichtige Funktion von CCR2 in der Plasmazelldifferenzierung hin.

Eine weitere Aufgabe von BLIMP1 ist die Repression des Proto-Onkogens *c-Myc*, das für die Zellteilung verantwortlich ist und in der Folge die Enddifferenzierung der Plasmazelle unterstützt (31). Die Zytokine IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21 sowie STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) sind für die Induktion der BLIMP1-Expression entscheidend (16, 32).

Größtenteils sind jedoch die genauen Signale und molekularen Mechanismen, welche die Entwicklung von Plasmazellen regulieren noch nicht vollständig verstanden und bedürfen weiterer Forschungsarbeiten.

2.2.4 Charakterisierung von Plasmazellen und ihren Vorläufern

Der Entwicklungsprozess von der B-Zelle über Plasmazellvorläufer (Plasmablasten) zur ausdifferenzierten Plasmazelle geht mit morphologischen und funktionellen Veränderungen einher. Aufgabe sowohl der Plasmazellen als auch ihrer Vorläufer ist es, bis zu 10^4 Moleküle pro Sekunde an löslichen Antikörpern zu sezernieren (33, 34). Um der hohen Immunglobulinsynthese im endoplasmatischen Retikulum gerecht zu werden, verfügen Plasmablasten und Plasmazellen über eine herausragende Anzahl dieser Organellen. Folglich ist das Zytoplasma im Verhältnis zum Zellkern stark vergrößert und verdrängt den Kern an den Rand der Zelle. Außerdem verändert sich die Expression zahlreicher spezifischer

Oberflächenmoleküle auf dem Entwicklungsweg zur Plasmazelle. Die Moleküle MHC II, CD19, CD21 und CD22, der murine B-Zellmarker B220 sowie der humane B-Zellmarker CD20 werden auf Plasmazellen deutlich schwächer exprimiert und der B-Zellrezeptor verschwindet von der Zelloberfläche (35-37). Dagegen wird CD38 in hohem Maße auf der Oberfläche von Plasmablasten und Plasmazellen ausgebildet (38, 39). Zusätzlich erscheint das Proteoglykan Syndekan-1 (CD138) auf der Oberfläche (40).

Eine Unterscheidung zwischen Plasmazellen und ihren unmittelbaren Vorläufern anhand der Oberflächenmoleküle ist schwierig. Hinweise kommen jedoch aus vergleichenden Analysen von Plasmablasten bzw. Plasmazellen aus dem Knochenmark, der Tonsille und dem peripheren Blut (41-43). Die in diesen Organen gefundenen Plasmazellen entsprechen verschiedenen Reifegraden. Medina und Koautoren (41) beobachteten auf Knochenmarkplasmazellen eine geringere Ausprägung der Marker CD19, CD20, CD21, CD22, HLA-DR (MHC II) und CD62L als auf Blutplasmazellen. Das Adhäsionsmolekül CD31 wurde dagegen auf Knochenmarkplasmazellen stärker exprimiert. Das Integrin VLA-4 (very late antigen 4) sowie CD44 zeigten auf Plasmazellen aus dem Blut und dem Knochenmark keine Unterschiede. Das Proteoglykan CD138 gilt als Differenzierungsmarker für reife Plasmazellen (44) und ist auf Knochenmarkplasmazellen stärker ausgebildet, die außerdem erhöhte Level des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 beinhalten (41). Eine Übersicht zum Plasmazell-Expressionsmuster in den verschiedenen Organen gibt Abbildung 1. Ein weiterer Marker zur Beurteilung der Plasmazellentwicklung ist CD38, das im Laufe der Enddifferenzierung an Intensität zunimmt und seine stärkste Expression in Knochenmarkplasmazellen erreicht (45, 46). Diese Heterogenität spricht für eine zunehmende Reife der Plasmazellen aus dem Knochenmark gegenüber Vorläuferzellen aus der Peripherie (41).

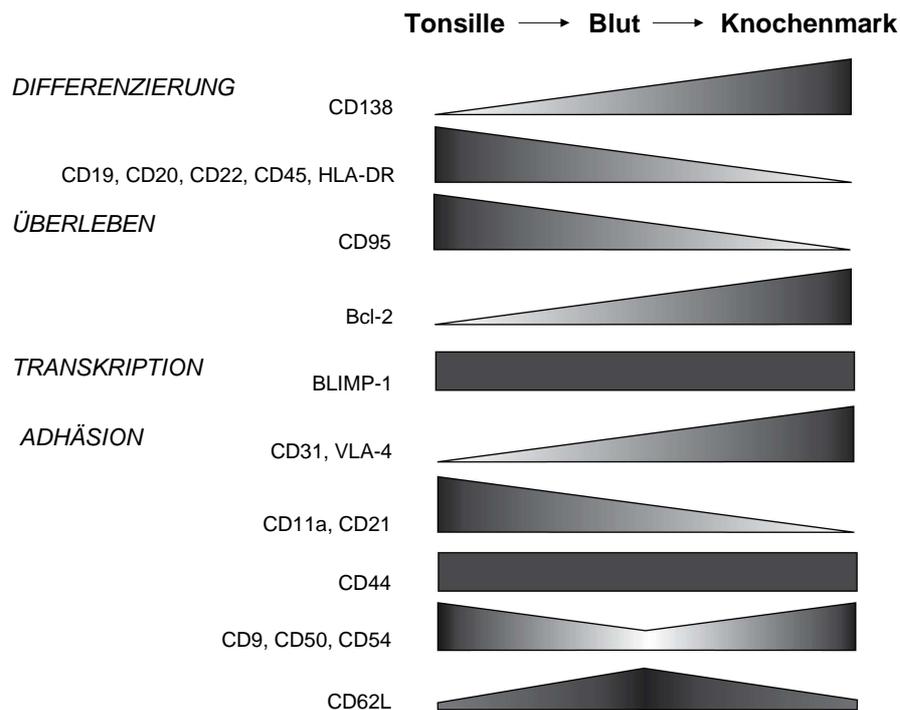


Abb. 1: Plasmazell-Expressionsmuster in verschiedenen Organen. Die Abbildung zeigt das Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle, die für Differenzierung, Überleben, Transkription und Adhäsion von Plasmazellen verantwortlich sind. Dabei weisen Plasmazellen aus Tonsille, peripherem Blut und Knochenmark einen unterschiedlichen Phänotyp auf. Abbildung in Anlehnung an Medina et al. (41).

Ein entscheidendes Differenzierungsmerkmal zwischen Plasmablasten und Plasmazellen ist jedoch die Teilungsfähigkeit. Während Plasmablasten noch teilungsfähig sind, können enddifferenzierte Plasmazellen nicht mehr proliferieren (47). Beiden Zellarten gemein ist ihre Antikörperproduktion und -sekretion., weshalb in der Literatur auch der Begriff „Antikörper sezernierende Zelle“ (ASC) gewählt wird (5, 32). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Antikörpersekretion jedoch nicht untersucht, deshalb wurde in den Fällen, in denen nicht aufgrund von Oberflächenmolekülen zwischen Plasmablast und Plasmazelle unterschieden werden konnte, zur Vereinfachung der Term „Plasmazelle“ verwendet.

2.2.5 Migrationsverhalten von Plasmablasten und Plasmazellen

Aus aktivierten B-Zellen entstehen Plasmablasten, von denen sich ein Teil lokal zur Plasmazelle entwickelt und dann gemäß ihres Ursprungs in den sekundären lymphatischen Geweben sesshaft bleibt (18). Plasmablasten, die aus Keimzentrumsreaktionen hervorgehen, besitzen die

Eigenschaft, über die Lymphbahnen oder das periphere Blut in verschiedene Regionen zu wandern um dort zur Plasmazelle zu differenzieren (48). Ermöglicht wird diese Fähigkeit unter anderem durch ihre Sensibilität gegenüber Chemokinen. Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine, welche die Zellwanderung, insbesondere von Leukozyten regulieren. Sofern Leukozyten über die entsprechenden Rezeptoren oder auch Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche verfügen, können sie gezielt von Chemokinen entlang eines Konzentrationsgradienten in bestimmte Gebiete gelockt werden. Gebildet werden Chemokine sowohl vom Grundgewebe der lymphatischen Organe als auch von den einzelnen Zellen selbst, um sich gegenseitig anzuziehen. Am Ziel angekommen oder auch während der Reifung können die Zellen ihr Chemokinrezeptorprofil und so auch ihr Migrationsverhalten ändern (48, 49).

Während B-Zellen die Follikel-koordinierenden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 noch auf ihrer Oberfläche exprimieren, sind sie auf Plasmablasten nicht mehr vorhanden (50, 51). Plasmablasten verlieren daraufhin ihre Fähigkeit gegenüber den korrespondierenden Chemokinen und ihr Auswandern aus den lymphatischen Organen wird auf diese Weise vermutlich ermöglicht. Eine wichtige Rolle in der Migration von Plasmablasten spielen ihr Chemokinrezeptor CXCR4 und der zugehörige Ligand CXCL12 (SDF-1, stromal derived factor 1), welcher von der roten Pulpa der Milz, den Marksträngen der Lymphknoten und den stromalen Zellen des Knochenmarks gebildet wird (50, 52). Bei Plasmazellvorläufern, denen CXCR4 auf der Oberfläche fehlt, ist die Migration zum Knochenmark deutlich beeinträchtigt und es kommt zur Dislokalisierung innerhalb der Milz (50, 51). Dennoch ist die Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in Mäusen mit CXCR4 defizienten B-Zellen 90 Tage nach Sekundärimmunisierung vergleichbar mit dem Wildtyp, so dass CXCR4 zwar wichtig, aber nicht essentiell für die Zellwanderung in das Knochenmark scheint (53). Obwohl auch reife Plasmazellen aus dem Knochenmark den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren, sind sie zwei Wochen nach Sekundärkontakt nicht mehr in der Lage, gegen CXCL12 zu migrieren (54), weshalb CXCL12 als möglicher Überlebensfaktor für Plasmazellen eine neue Funktion zugeschrieben wird (55). Die Ausprägung des Rezeptors CXCR3 erlaubt die Anziehung von Plasmablasten in entzündete Gewebe (50). Dabei spielt Interferon- γ (IFN- γ) eine bedeutende Rolle, indem es CXCR3 auf Plasmablasten und die korrespondierenden Liganden auf Entzündungszellen hoch reguliert (56). Aber auch hier verlieren reife Plasmazellen die Fähigkeit, gegen CXCL9 und CXCL11, den Liganden von CXCR3 zu wandern. Das Ziel von IgA-sezernierenden Plasmablasten sind meistens mukosale Gebiete des Intestinaltrakts (48). Mit Hilfe ihrer Rezeptoren CCR9 und CCR10 wandern sie entlang des Konzentrationsgradienten zu den entsprechenden Liganden CCL25 und CCL28 (57, 58).

2.2.6 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen

Lange Zeit wurde vermutet, dass die Lebensspanne der Plasmazelle im Bereich weniger Tage liegt und wurde dementsprechend als relativ kurz angesehen (59-61). Mittlerweile hat sich diese Sichtweise geändert und eine Vielzahl von Studien belegt das Vorhandensein langlebiger Plasmazellen (62-64).

Aus der T-Zell-unabhängigen B-Zellaktivierung gehen zumeist Plasmazellen mit einer kurzen Lebenszeit hervor, sie residieren im extrafollikulären Gewebe der sekundären lymphatischen Organe und gehen innerhalb weniger Tagen in Apoptose (47). Dagegen überleben langlebige Plasmazellen mindestens mehrere Monate (62). Nach T-Zell-abhängiger Stimulation von B-Zellen sind zwei Differenzierungswege möglich. Einerseits erfolgt wiederum eine in extrafollikulären Regionen stattfindende primäre Immunantwort mit der Ausbildung von meist kurzlebigen Plasmazellen. Andererseits ist die Formation von Keimzentren möglich, aus deren Keimzentrumsreaktion langlebige Gedächtnis-B-Zellen sowie kurz- und langlebige Plasmazellen entstehen können. Das bedeutet, es existieren unterschiedliche Plasmazellpopulationen, wobei offenbar nicht alle Plasmablasten in der Lage sind, in langlebige Plasmazellen zu differenzieren (65).

Die maximale Zahl an spezifischen Plasmazellen nach einer primären Immunisierung mit einem T-Zell-abhängigen oder -unabhängigen Antigen wird nach etwa einer Woche erreicht. Sie verweilen für einige Tage in den extrafollikulären Regionen der sekundären lymphatischen Organe, bevor sie infolge eines programmierten Zelltodes sterben (18). Nach einer sekundären Immunantwort, wie z.B. bei einer Reinfektion oder einer Auffrischimpfung können im menschlichen Serum sehr lang anhaltende Antikörpertiter, im Fall von Tetanus und Diphtherie über mehrere Jahrzehnte lang nachgewiesen werden (1). Die Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in den sekundären lymphatischen Organen steigt in den ersten Tagen zunächst rapide an und fällt dann innerhalb einer Woche auf einen Wert, der nur wenig über dem vor der Immunisierung liegt (18). Parallel dazu erhöht sich die Plasmazellzahl im Knochenmark, wo sich die Mehrheit der Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen beim erwachsenen Menschen befindet (66). Insgesamt handelt es sich um eine relativ konstante Plasmazellfrequenz von ca. 0,2-0,4% (42) bzw. 0,1-1% (45) aller mononukleären Zellen im Knochenmark. Aufgrund der geringen Halbwertszeit ungebundener Immunglobuline von maximal drei Wochen (67), ist eine kontinuierliche Antikörperproduktion notwendig, um einen ausreichenden Spiegel schützender Antikörper beizubehalten. Die Aufrechterhaltung einer langjährigen Immunität wirft die Frage

nach den zu Grunde liegenden Mechanismen auf, die vermutlich in einem Zusammenspiel funktionieren (5).

Ein Erklärungsversuch beruht auf der Abhängigkeit von persistierendem Antigen und Gedächtnis-B-Zellen, einhergehend mit deren kontinuierlicher Proliferation und Differenzierung in kurzlebige Plasmazellen (68, 69). Die zweite Theorie beinhaltet die Entstehung von langlebigen Plasmazellen mit einer definierten Halbwertszeit aus Gedächtnis-B-Zellen über die Bystander-Aktivierung (70). Außerdem gibt es das Konzept, dass Plasmazellen unabhängig von Gedächtnis-B-Zellen und T-Zell-Hilfe in bestimmten Überlebensnischen im Knochenmark für eine lange Zeit am Leben bleiben können. Dieses Konzept wurde durch Untersuchungen zur Lebensdauer von Knochenmarkplasmazellen in der Maus bestätigt. Mit Hilfe von BrdU-Inkorporationsstudien zeigten Manz et al. (62), dass Plasmazellen aus dem Knochenmark drei bis sechs Wochen nach einer Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin nicht mehr proliferieren und später mindestens drei Monate ohne DNA-Synthese überleben können. In weiteren Experimenten, bei denen Plasmazellen aus dem Knochenmark in naive Mäuse transferiert wurden, konnten Antikörpertiter über mehrere Monate nachgewiesen werden, ohne dass Antigen in die naive Maus injiziert wurde (64). Slifka et al. (63) verfolgten die Lebensspanne von LCMV-spezifischen Antikörpertitern und Plasmazellen, indem sie diese in naive Mäuse transferierten, deren Gedächtnis-B-Zellen vorher depletiert wurden. In diesem Versuch wurden noch länger als ein Jahr nach dem Transfer virusspezifische Plasmazellen im Knochenmark nachgewiesen. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass diese Plasmazellen infolge einer kontinuierlichen Repopulation von virusspezifischen Gedächtnis-B-Zellen neu entstanden sind.

Aufgrund mangelnder Nachweismöglichkeiten ist es im Menschen schwieriger, das Vorkommen von langlebigen Plasmazellen zu zeigen. Die Ergebnisse beruhen hier auf der Detektion protektiver, spezifischer Antikörpertiter, meist der Immunglobulin-Klasse G (IgG) und IgA, viele Jahre bis Jahrzehnte nach Infektion oder Auffrischimpfung (1). In einer kürzlich veröffentlichten Longitudinalstudie von Amanna et al. (71) wurden die Antikörperspiegel gegen Masern, Mumps, Röteln, Pocken, Epstein-Barr-Virus sowie Varizella-Zoster-Virus und der nicht-replizierenden Antigene wie Tetanus- und Diphtherietoxin über eine Zeitspanne bis zu 26 Jahren untersucht. Für die Antikörper gegen Mumps- und Masernviren wurden Halbwertszeiten von über 200 Jahren beobachtet. Die Antigen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen waren langlebig, jedoch ergab sich keine Korrelation zu den Antikörpertitern in den Fällen, die mehrfach Antigenkontakt hatten oder die wiederholt geimpft wurden. Das würde dafür sprechen, dass Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen unabhängig voneinander reguliert werden. Einen

weiteren Hinweis für langlebige Plasmazellen im Menschen ergeben Studien an Patienten, bei denen CD20⁺ B-Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab eliminiert wurden (72-74). Die Antikörperkonzentration im Serum blieb dennoch unverändert, so dass wahrscheinlich langlebige Plasmazellen, die aufgrund des Fehlens von CD20 nicht von der Depletion betroffen sind, für die anhaltende Immunität verantwortlich sind (72-74).

Neben dem Knochenmark, das im gesunden Organismus als physiologisches Hauptreservoir von langlebigen Plasmazellen fungiert, kann eine Anhäufung von Plasmazellen auch in anderen Geweben vorkommen. In der Milz findet sich normalerweise nur ein kleiner Anteil von langlebigen Antikörper-sezernierenden Zellen (18, 62, 65, 75). Im Zustand chronischer Entzündung sind Plasmazellen auch in entzündeten Geweben anzutreffen (5) und tragen durch die Produktion von Immunglobulinen vor Ort effektiv zur Bekämpfung des Pathogens bei. Beispiel für eine vermehrte Plasmazellakkumulation sind entzündete Nieren von NZB/W-Mäusen, dem Mausmodell für die Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematoses (SLE) (76), sowie von SLE-Patienten mit Nephritis (77). In den Nieren von NZB/W-Mäusen konnten zwar vielfach höhere Plasmazellzahlen detektiert werden, jedoch keine Bildung von Keimzentren (76). Dies deutet darauf hin, dass die Plasmazellen von den sekundären lymphatischen Organen in das chronisch entzündete Gewebe einwandern. Ein weiteres Beispiel sind Plasmazellen in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis (78, 79). Die Lebensdauer dieser in entzündete Gewebe eingewanderten Plasmazellen beschränkt sich aber wahrscheinlich auf die Dauer der Inflammation (5). Ein anderer Ort der Plasmazellbildung ist die Mukosa. Ob sich hier auch langlebige Plasmazellen finden ist bisher unklar (80).

2.2.7 Das Konzept der Plasmazell-Überlebensnische

Plasmazellen aus dem Knochenmark haben *in vivo* eine sehr lange Lebensspanne ohne sich weiterhin zu teilen. Werden diese Zellen jedoch *ex vivo* isoliert oder *in vitro* generiert, sterben sie innerhalb weniger Tage in Kultur infolge Apoptose (55, 81). Das Knochenmark scheint somit ein besonderes Mikromilieu zu bieten, das eine entscheidende Rolle bei der terminalen Differenzierung, beim Überleben und bei der Funktionsweise der Plasmazellen spielt: die so genannte Plasmazell-Überlebensnische (5, 82, 83). Man nimmt an, dass dieses Mikromilieu von einem oder mehreren Zelltypen gebildet wird, die lokal verschiedene Faktoren bereitstellen, die synergistisch das Überleben von Plasmazellen ermöglichen. Bei diesen Überlebensfaktoren handelt es sich um Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Voraussetzung für eine gesteigerte

Lebensdauer ist zusätzlich die intrinsische Fähigkeit der Plasmazellen, diese Überlebenssignale zu erkennen und darauf zu reagieren (5). Auch andere hämatopoetische Zellen, z.B. der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark, benötigen verschiedene Nischen zum Überleben und zur gerichteten Differenzierung (9). Diese sind jedoch vermutlich nicht mit der Plasmazellnische identisch.

In vitro Studien in der Maus konnten einige Moleküle aufdecken, welche die Lebensdauer von isolierten Knochenmarkplasmazellen für einige Tage in Kultur verlängern. Den größten alleinigen Effekt zeigt das Zytokin IL-6, aber auch IL-5, TNF- α , CXCL12 und Liganden für CD44 sind wichtige Vertreter, die besten Überlebensraten wurden jedoch durch synergistische Wirkungen der einzelnen Faktoren erzielt (55, 81). Die Bedeutung von IL-6 entweder als Überlebens-, Wachstums- oder Differenzierungsfaktor wurde in normalen Antikörper-sezernierenden Zellen (84-86), und auch intensiv in Myelomzellen, den malignen Plasmazellen, untersucht (87-90). Es ist bekannt, dass IL-6 über zwei unterschiedliche Signalwege Myelomzellen vor Apoptose schützen kann (91). Plasmazellen können einen gewissen Anteil an IL-6 endogen produzieren, die Hauptsynthese leisten aber mesenchymale retikuläre Stromazellen aus dem Knochenmark. Mit der Bildung und Bereitstellung von verschiedenen Wachstumsfaktoren sowie Zellkontakt-abhängigen Signalen in der Hämatopoese, sind mesenchymale retikuläre Stromazellen ein entscheidendes Element der Knochenmarksumgebung (92, 93). Hinweisend auf ihre Beteiligung an der Plasmazellnische ist die enge *in vivo* Kolokalisation von Plasmazellen zu VCAM-1⁺ (vascular cell-adhesion molecule 1) stromalen Zellen, die CXCL12 produzieren (94). Bisherige Kokultur-Experimente zwischen murinen (81), humanen Stromazellen (95) oder Stromazelllinien (96) und Antikörper-sezernierenden Zellen unterschiedlicher Gewebe verdeutlichen den positiven Einfluss mesenchymaler, retikulärer Zellen auf das Überleben und die Reifung von Plasmablasten bzw. Plasmazellen. Überlebensfördernde Interaktionen zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Zellen sind über mehrere Adhäsionsmoleküle möglich. Plasmazellen exprimieren das Integrin VLA-4 und binden darüber an VCAM-1 und Fibronectin, beides typische Oberflächenmoleküle von retikulären stromalen Zellen (97). Die Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen VLA-4 in eine Plasmazell-Stromazell-Kokultur resultierte in einer verminderten Immunglobulinsekretion, so dass VLA-4 maßgeblich zur Stromazelladhäsion beizutragen scheint (81). Außerdem können Plasmazellen über CD44 mit der extrazellulären Matrix mesenchymaler Zellen interagieren, der Ligand hierfür ist u.a. Hyaluronsäure.

Weitere essentielle Überlebenssignale beziehen Plasmazellen von BAFF (B-cell-activating factor) und/oder APRIL (a proliferation inducing ligand), beides Liganden für den von Plasmazellen

exprimierten Rezeptor BCMA (B-cell maturation antigen) (98). So demonstrierten O'Connor et al. (98), dass eine Blockierung von BAFF und APRIL durch TACI-Ig zu einer Verminderung von ansässigen Knochenmarkplasmazellen um etwa zwei Drittel führt. Die Bedeutung von BCMA wird in BCMA^{-/-} Mäusen ersichtlich, deren Plasmazellzahl im Knochenmark nach 6-8 Wochen einer Immunisierung stark reduziert ist im Vergleich zu Wildtypmäusen (98).

Auf molekularer Ebene wird der Transkriptionsfaktor Aiolos, Mitglied der Ikaros-Familie, als relevant beschrieben. In Aiolos-defizienten Mäusen entstehen zwar kurzlebige, aber keine langlebigen Knochenmarkplasmazellen, wobei dieser Defekt bereits in den B-Zellen anzusiedeln ist (99). Wichtige Transkriptionsfaktoren der Plasmazelldifferenzierung sind in Aiolos^{-/-} Tieren nicht beeinträchtigt, das heißt, der genaue Wirkungsmechanismus von Aiolos muss noch ermittelt werden.

Dem Konzept der Plasmazell-Überlebensnische entspricht die Tatsache, dass in gesunden Menschen die Kapazität des Knochenmarks für langlebige Plasmazellen begrenzt ist. Die Frequenz der Plasmazellen erreicht ein stabiles Plateau bei ca. 0,1-1% aller mononukleären Zellen im Knochenmark (42, 45), dementsprechend können ungefähr 10⁹ langlebige Antikörpersezernierende Zellen beherbergt werden (100). Da der Körper ständig verschiedenen Erregern ausgesetzt ist, die eine Immunantwort mit der Bildung von neuen Plasmablasten auslösen, ist ein Konkurrenzkampf um die limitierte Überlebensnische unumgänglich (101). Einen Hinweis dafür, dass neu entstandene Plasmablasten mit den ansässigen Plasmazellen konkurrieren und möglicherweise deren Platz in der Nische einnehmen, gibt die Arbeit von Odendahl et al. (52). Einmal verdrängte Plasmazellen gehen aufgrund ihres Unvermögens weiterhin in andere Regionen zu migrieren, vermutlich in Apoptose (52).

2.3 Das Knochenmark

2.3.1 Aufbau

Das Knochenmark ist Bestandteil des Knochens und befindet sich in der Markhöhle zwischen den Bälkchen der Spongiosa. Es zeichnet sich durch seine hochkomplexe Architektur aus und kann in zwei voneinander abhängige Zellkompartimente eingeteilt werden: das hämatopoetische System und das Stromagewebe, dessen Funktion die Regulierung der Blutbildung ist (102).

2.3.2 Mesenchymale stromale Knochenmarkzellen

Das Wort „Stroma“ stammt ursprünglich aus dem Griechischen und beschreibt das Gerüst oder das bindegewebige Stützgewebe eines Organs (103). Allerdings gibt es keine einheitliche Definition darüber, welche Zellarten dem Stroma zuzuordnen sind. Teilweise werden sowohl hämatopoetische Zellen wie Makrophagen als auch Endothelzellen mit eingeschlossen (104). Andere Arbeitsgruppen verstehen darunter fibroblastenartige, nicht-hämatopoetische Zellen, die allgemein als Stromazellen zusammengefasst werden (105, 106). Zu ihnen gehören Osteoblasten, Fibroblasten, retikuläre Zellen und Adipozyten (105).

Pionierarbeit auf dem Gebiet der Erforschung nicht-hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark leisteten Friedenstein und seine Mitarbeiter in den 60er und 70er Jahren (107-109). Sie etablierten die Isolierung von Zellen aus Knochenmarkproben anhand ihrer Fähigkeit an Plastikoberflächen zu haften. Neben der Plastikadhärenz ist ein spindelförmiger, d.h. „fibroblastenartiger“ Phänotyp dieser als heterogen beschriebenen Zellpopulation kennzeichnend. In Kultur formieren sich die adhären Zellen anfangs zu vereinzelt Kolonien von mehreren Zellen („colony-forming unit-fibroblasts“, CFU-Fs), die sich nach einer Verzögerung von 2 bis 4 Tagen rapide vermehren (108). Der Anteil der CFU-Fs an den mononukleären Zellen aus dem Knochenmark ist sehr gering und variiert zwischen nur 0,01 und 0,1 % (110). In Abhängigkeit vom Spender werden 38 Populationsverdopplungen und folglich bis zu $1,2 \times 10^9$ -fache Expansionen beschrieben (111). Erreichen die kultivierten Knochenmarkzellen eine hohe Dichte, dann gehen sie in eine Ruhephase über, in der sie nicht weiter proliferieren (112). Außerdem werden nicht-adhären hämatopoetische Zellen, die zu Beginn der *in vitro* Kultur noch zu ca. 30% vorhanden sind (108), im Laufe der Kulturzeit heraus gewaschen (108, 113).

Bereits Friedenstein beobachtete eine spontane Differenzierung dieser CFU-Fs in Knorpel- und Knochenzellen. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden die Untersuchungen weiter verfolgt, welche die multipotenten Progenitoreigenschaften von CFU-Fs, in mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren, unterstreichen. Dies führte zur Einführung des Begriffs der mesenchymalen Stammzelle (mesenchymal stem cell, MSC) durch Maureen Owen (105). Aufgrund ihrer Eigenschaften rückte nun die multipotente mesenchymale Stammzelle in den Fokus der klinischen Forschung. Das Interesse gilt insbesondere der therapeutischen Anwendung, z.B. in der regenerativen Medizin durch „tissue engineering“, Transplantation oder Gentherapie (114).

Parallel zu diesen Forschungsarbeiten beschäftigten sich verschiedene Gruppen mit der Rolle von Knochenmarkzellen bezüglich ihres Einflusses auf die murine Hämatopoese (115) insbesondere der B-Zellentwicklung (92, 116). In diesen Mausstudien und auch im humanen System (97, 117) wurden Langzeitkulturen von Knochenmarkproben etabliert, in denen Zellvermehrung und –überleben von der adhärennten Zellschicht abhängig ist.

Da zahlreiche Arbeitsgruppen sehr unterschiedliche Kulturbedingungen und Anwendungsgebiete für diese Knochenmarkzellen entwickelten, ist in der Literatur eine Vielzahl zu Verwirrung führender Bezeichnungen entstanden. Die Namen variieren von CFU-Fs, mesenchymaler Vorläuferzelle, Knochenmarkstromazelle und mesenchymaler Stammzelle (118). Für Klärung dieser uneinheitlichen Terminologie sorgte 2005 die „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) (119). Hier formuliert sie eine allgemeingültige Nomenklatur basierend auf der mesenchymalen Herkunft der Zellen unabhängig von ihrem Differenzierungs- und Therapipotential: multipotente mesenchymale Stromazelle (MSC). Das Wort multipotent beruht auf der Fähigkeit in verschiedene Abkömmlinge zu differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft der adhärennten Knochenmarkzellen jedoch nicht untersucht, weshalb auf diesen Zusatz verzichtet wird und der Begriff mesenchymale Knochenmarkstromazelle bzw. mesenchymale stromale Knochenmarkzelle verwendet wird.

3 Zielsetzung

Plasmazellvorläufer aus dem Blut wandern unter anderem ins Knochenmark, um dort weiter auszudifferenzieren und humorale Gedächtnis-Antikörper zu produzieren. Mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark unterstützen hier die terminale Plasmazelldifferenzierung. Vermutlich finden die Prozesse in eng abgegrenzten Mikrokompartimenten, so genannten „Nischen“, statt.

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines humanen *in vitro* Kokultur-Systems zwischen Plasmazellen aus dem peripheren Blut und mesenchymalen stromalen Knochenmarkzellen. Dieses Modell soll der Untersuchung von Interaktionen zwischen beiden Zellarten dienen. Insbesondere soll überprüft werden, ob diese Interaktionen das Überleben der Plasmazellvorläufer und deren Differenzierung zur reifen Plasmazelle fördern. Es soll untersucht werden, ob mögliche Wechselspiele auf einem Zell-Zell-Kontakt beruhen oder lösliche Faktoren die entscheidende Rolle spielen. Letztendlich ist die Frage der Exklusivität von mesenchymalen Stromazellen zu beantworten. In diesem Zusammenhang sollen die stromalen Knochenmarkzellen hinsichtlich ihres Phänotyps und der Homogenität charakterisiert werden. Außerdem soll die Frage geklärt werden, ob die eingesetzten Knochenmarkstromazellen mit ihrer Produktion von Wachstumsfaktoren und Zellkontakt-abhängigen Signalen allein ausreichend sind, um die spezifische Plasmazellnische zu bilden.

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

4.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Herkunft</u>
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2)	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
DMEM Plus	DMEM 20% fetales Kälberserum 20 µM β-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Gibco, D Invitrogen, USA Invitrogen, USA Invitrogen, USA Invitrogen, USA
FACS-Flow Puffer	PBS 0.05% Azid	DRFZ
CASI-Flow Puffer	PBS 0.05% Azid, Lösung steril filtriert (0.2µm Ø)	DRFZ
Ficoll-Hypaque™ PLUS		Amersham Biosciences, S

4.1.2 Antikörper und Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse

<u>Spezifität</u>	<u>Klon</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Herkunft</u>
CD3-APC	UCHT1	1:20	BD Pharmingen, D
CD9-FITC		1:100	ImmunoKontakt, D
CD9-PE	M-L13	1:20	BD Pharmingen, D
CD10-FITC		1:100	ImmunoKontakt, D
CD11a-FITC		1:20	DRFZ
CD14-PE	M5E2	1:20	BD Pharmingen, D
CD16-PE		1:20	BD Pharmingen, D
CD19-FITC	HIB19	1:20	BD Pharmingen, D
CD19-PE	HIB19	1:20	BD Pharmingen, D
CD20-FITC	2H7	1:20	BD Pharmingen, D
CD20-PE	2H7	1:20	BD Pharmingen, D
CD29-PE	MAR4	1:20	BD Pharmingen, D
CD31-PE	WM59	1:20	BD Pharmingen, D
CD32-FITC	FLI8.26 (2003)	1:100	BD Pharmingen, D
CD38-APC	HIT2	1:20	BD Pharmingen, D
CD44-PE	G44-26	1:1000	BD Pharmingen, D
CD45-APC	HI30	1:20	BD Pharmingen, D
CD49d (VLA-4)-FITC	HP2/1	1:20	Immunotech, F
CD62L (L-Selektin)-FITC	145	1:50	DRFZ
CD64-PE	10.1	1:10	Serotech
CD95-FITC	DX2	1:20	BD Pharmingen, D
CD106-PE (VCAM)	51-10C9	1:20	BD Pharmingen, D
CD138-FITC		1:20	ImmunoKontakt, D
HLA-DR (MHC II)-FITC	TU36	1:20	BD Pharmingen, D
CCR2-PE	48607	1:10	R&D, USA
DAPI			Molekular Probes, USA

4.1.3 Materialien für die Isolierung von Plasmazellen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
Plasma Cell Isolation Kit: •Non-Plasma Cell Depletion Cocktail (Biotin-konjugierte Antikörper gegen CD2, CD3, CD14, CD15, CD22, CD34, CD56, CD123, CD235a) •Anti-Biotin MicroBeads (an monoklonale anti-biotin Antikörper konjugierte MicroBeads) •CD38 MicroBeads (an monoklonale anti-CD38 Antikörper konjugierte MicroBeads)	Miltenyi Biotec, D
Preseparations Filter	Miltenyi Biotec, D
LD-Säulen	Miltenyi Biotec, D
MS-Säulen	Miltenyi Biotec, D
MidiMACS Magnet	Miltenyi Biotec, D
MiniMACS Magnet	Miltenyi Biotec, D
MultiStand Magnetständer	Miltenyi Biotec, D

4.1.4 Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus, D
Invertmikroskop Olympus, CK 30	Olympus, D
Sterile Werkbank HERA safe	Heraeus, D
Durchflusszytometer FACS LSR II	BD, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, D
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, D
Zellzählgerät Casy®, Modell TT	Schärfe Systems, D
autoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, D

4.2 Isolation von mononukleären Zellen/Zellisolierung

4.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension von mononukleären Zellen aus dem Blut

Zur Gewinnung von Blutzellen wurden Leukozytenfilter aufbereitet, die vom Blutspendedienst des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst mussten die Filter mit Hilfe einer Schere von dem anhängenden Schlauchsystem getrennt werden. Danach wurde der Inhalt mit einer 20 ml Spritze und einem Volumen von 100 ml PBS gegen die gekennzeichnete Pfeilrichtung aus dem Filter gespült. Basierend auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation, einer von Boyum entwickelten Methode (120), wurden nun die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert. Hierzu wurden in ein 50 ml Röhrchen vorsichtig 25 ml des Blut-PBS-Gemisches auf 15 ml erwärmtes Ficoll-Hypaque geschichtet, so dass keine Vermischung der 2 Phasen entstehen konnte. Ficoll-Hypaque ist ein Separationsmedium, dessen Dichte so eingestellt ist, dass bedingt durch die Zentrifugalkraft, Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen sedimentieren, jedoch Lymphozyten und Monozyten sich als abgesetzter weißer Ring in der Interphase ansammeln. Nach anschließender Zentrifugation (bei Raumtemperatur, 2000 rpm über 20 min, ohne Bremse) wurden die mononukleären Zellen in der Interphase mit einer Pipette abgenommen, zweimal mit kaltem PBS/BSA gewaschen und nochmals zentrifugiert (1200 rpm, 4° C über 10 min).

4.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark

Mesenchymale stromale Zellen wurden aus Knochenmarksproben von Oberschenkelköpfen gewonnen, die im Rahmen einer Hüftgelenksoperation entfernt wurden. Die Abteilung für Orthopädie der Charité Berlin stellte freundlicherweise diese Präparate nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten zur Verfügung.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die frisch entnommenen Knochenmarksproben wurden unter Verwendung einer Kanüle und einer 10 ml Spritze mit 100-200 ml PBS/BSA kräftig gespült. Die gespülte Zellsuspension wurde in einer Petrischale gesammelt, anschließend durch ein Zellsieb aufgereinigt und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Auch bei der Isolation von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation ausgenutzt (121-124): die

Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen auf 15 ml Ficoll-Hypaque Separationsmedium geschichtet und zentrifugiert (bei Raumtemperatur, 2000 rpm über 20 min, ohne Bremse). Anschließend erfolgten die Abnahme des Zellschichtes in der Interphase und das zweimalige Waschen mit PBS/BSA mit nachfolgender Zentrifugation (1200 rpm, 4  C über 10 min).

4.3 Zellzahlbestimmung

4.3.1 CASY[®] Zellzählgerät

Die CASY[®]-Technologie wurde zur Bestimmung der Zellzahl von mononukleären und stromalen Zellen verwendet. Basierend auf dem Prinzip der elektronischen Pulsfl chenanalyse der Zelloberfläche, können Zellen auf Durchmesser und Oberflächenbeschaffenheit mittels einer Analyseaufl sung von 0,1  m charakterisiert werden. Mit diesem Verfahren ist parallel zur Zellzählung auch eine Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen, eine Zellgr ssenverteilung sowie der Ausschluss von Zelltrümmern möglich.

Vor der Probenanalyse wurde entsprechend des Zelltyps der zu messende Grössenbereich festgelegt. Dieser lag bei der Messung von PBMC zwischen 5,96 und 11,96  m, für stromale Knochenmarkzellen wurde der Bereich von 11 bis 25  m gewählt. Die Berechnung der Zellzahl beruhte auf drei vom Gerät vollzogenen Probenmessungen, deren Mittelwert als Zellkonzentration pro ml angegeben wurde. Die Daten wurden anschließend in einem 2D-Diagramm dargestellt, in dem die Zellzahl gegen die Zellgrösse aufgetragen wurde (Abb.2).

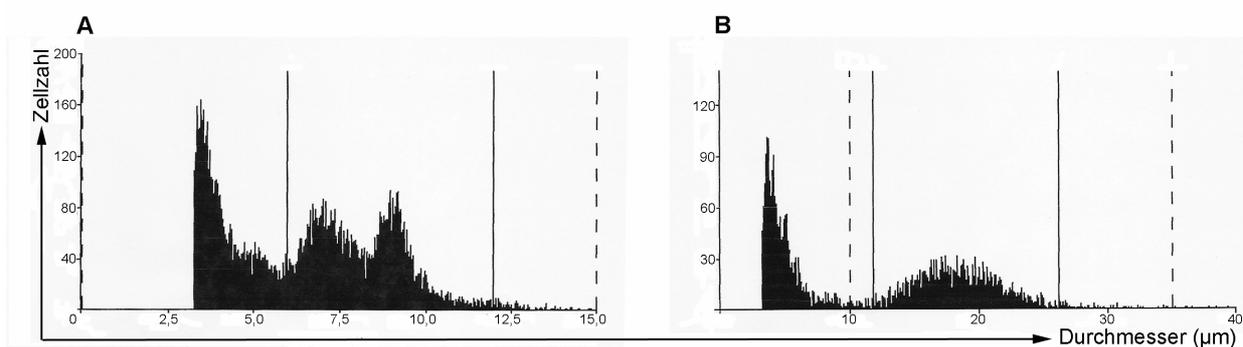


Abb. 2: Ergebnisdiagramme der Zellzahlbestimmung mittels CASY[®]-Technologie. Dargestellt sind typische Zellanalysen von PBMCs (A) und mesenchymalen Knochenmarkzellen (B) im 2D-Diagramm. Die x-Achse repräsentiert den Durchmesser, die y-Achse die Zellzahl der untersuchten Proben. Die durchgehenden senkrechten Linien begrenzen den gemessenen Grössenbereich.

4.3.2 Neubauer-Zählkammer

Zur Zellzahlbestimmung von frischen MACS-isolierten Plasmablasten aus dem peripheren Blut wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Aufgrund der geringen Zellzahl der Plasmablasten lieferte diese Methode zuverlässigere Ergebnisse als die CASY®-Technologie. Es wurden 10 µl einer vorher verdünnten Zellsuspension in das Neubauer-Hämozytometer pipettiert und die lebenden Zellen unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times V_f \times \text{Vol} \times 10^4$$

n = durchschnittliche Zellzahl aus den 4 Großquadranten der Zählkammer

V_f = Faktor der Vorverdünnung

Vol = Volumen in ml, in dem die Zellen resuspendiert wurden

4.4 Durchflusszytometrische Analyse

4.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom anhand ihrer Größe, Granularität und ihrer Expression intrazellulärer sowie membranständiger Moleküle zu charakterisieren. Gut charakterisierte Antigene, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, werden in der internationalen Nomenklatur unter der Bezeichnung Cluster of differentiation (CD) zusammengefasst.

Grundlegende Voraussetzung für die durchflusszytometrische Analyse dieser Arbeit war die Färbung von Oberflächenmolekülen mit Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern. Zellen, die mit einem oder mehreren fluoreszierenden Antikörpern gekennzeichnet wurden, können spezifisch von einem Laser detektiert werden, weshalb auch von Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS, Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung) gesprochen wird. Beruhend auf dem Prinzip der „hydrodynamischen Fokussierung“ kann man sich die Zellen wie Perlen an einer Perlenkette vorstellen, die den Messbereich an einer bestimmten Stelle passieren. Getroffen von einem fokussierten Laserstrahl, werden die Zellen abhängig von Größe, Granularität und gebundener Fluoreszenz zur Emission von Licht angeregt, welches für jede einzelne Zelle durch spezielle Filter absorbiert wird. Durch die Lichtstreuung an der Zelle entstehen unterschiedliche Streusignale. Während das nach vorne gelenkte Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) mit

der Zellgröße korreliert, entspricht das um 90° reflektierte Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) der Granularität. In diesem Bereich können Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifiziert werden. Der Laserstrahl bewirkt außerdem eine Anregung der zellgebundenen Fluorochrome und somit die Entstehung von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Wellenlänge. Die messbare Emission ist dabei proportional zur gebundenen Antikörpermenge, so dass eine Quantifizierung der Antigenexpression möglich ist. Der Einsatz von multiplen Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren gestattet die Analyse verschiedener zellulärer Epitope auf einer Zelle zur gleichen Zeit. Dargestellt wird diese Form der Zellcharakterisierung im zweidimensionalen Punktdiagramm (dot plot).

4.4.2 Probenmessungen und Datenauswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Probenmessungen an einem Durchflusszytometer des Gerätetyps LSR II der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Neben FSC und SSC standen weitere Laser zur Messung der emittierten Fluoreszenz zur Verfügung. Ein violetter Laser (Anregungswellenlänge: 405 nm), ein blauer Laser (Anregungswellenlänge: 488 nm) und ein roter Laser (Anregungswellenlänge: 633 nm).

Die verwendeten Fluorochrome mit den zugehörigen Lasern und Emissionsmaxima sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab.1: Liste der verwendeten Fluorochrome mit ihren detektierbaren Lasern und Emissionsmaxima am LSR II der Firma Becton Dickinson

<u>Fluorochrom</u>	<u>Laser mit Anregungswellenlänge</u>	<u>Emissionsmaximum</u>
FITC (Fluoreszein)	Blauer Laser, 488 nm	519 nm
PE (R-Phycoerythrin)	Blauer Laser, 488 nm	578 nm
APC (Allophycocyanin)	Roter Laser, 633 nm	660 nm
DAPI	Violetter Laser, 405 nm	461 nm

Für die Analyse und Auswertung der hier gezeigten Daten wurde die CellQuest™ Research Software (BD, D) verwendet.

Die Darstellung der Daten kann auf verschiedene Weise erfolgen. Während die Signale im Vorwärts- und Seitwärtslicht linear dargestellt wurden, erfolgte die Aufzeichnung der Fluoreszenzen dagegen logarithmisch. Um die Beziehung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzen auf einer Zelle auszuwerten, eignet sich die Darstellung im zweidimensionalen

Punktdiagramm (dot plot). Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle, die durch ihre Lage in der zweidimensionalen Darstellung als unmarkierte, einfach positive oder doppelpositive Zelle erkennbar wird. Mehrere Zellen zusammen ergeben dann so genannte Punktwolken, man spricht auch von Populationen. Im eindimensionalen Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung der Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität dargestellt. Als Maß gilt bei logarithmisch aufgezeichneten Fluoreszenzsignalen die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (Geo Mean Fluorescence, GMF).

Bei Zellproben, zu denen noch kein fluoreszierender Farbstoff zugesetzt ist, wird die Autofluoreszenz der Zellen untersucht. Ein typisches Phänomen der Durchflusszytometrie ist, dass unterschiedliche aufgezeichnete Fluoreszenzsignale nicht nur in dem für die Messung des Fluorochroms vorgesehenen Kanal, sondern in mehreren Kanälen registriert werden. Diese Interferenzen können zu Verfälschungen führen. Aus diesem Grund wird bei Mehrfachfluoreszenzanalysen die Kompensation genutzt. Hierbei wird die Interferenz zweier Detektionskanäle berücksichtigt und die gegenseitige Beeinflussung voneinander subtrahiert, um ein möglichst unverfälschtes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Die Kompensation ist als ein primäres Experiment mit Einzelfärbungen für jedes Fluorochrom durchgeführt worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gleichzeitige Analyse von Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkzellen im FACS durchgeführt und etabliert. Dies erfolgte aufgrund der niedrigen Zahl an Plasmazellen sowie der Gefahr des Zellverlustes durch Auftrennung der Plasmazellen von den Stromazellen nach der Kokultur.

4.4.3 Oberflächenfärbungen

Alle adhärennten Zellen, die in DMEM kultiviert wurden, das heißt, mesenchymale stromale Knochenmarkzellen sowie Plasmazellen in Kokultur mit adhärennten stromalen Knochenmarkzellen, wurden zunächst mit 0,25% Trypsin/1mM EDTA vom Boden der Kulturflasche bzw. der 12-Loch-Platte gelöst. Anschließend wurde die Enzymwirkung mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA beendet und die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die gleiche Trypsin/EDTA-Behandlung erhielten außerdem die Plasmazellvorläufer, die an Tag 0 im FACS untersucht werden sollten, als auch die nicht-adhärennten Plasmazellen in Kokultur. Auf diese Weise wurden gleiche Bedingungen für alle analysierten Zellen zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung hergestellt. Im Anschluss wurden

diese Zellen ebenfalls mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen, und bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert.

Die Zellen wurden dann in 100 µl PBS/BSA aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Für die Färbung wurden die entsprechenden Antikörper in einem vorher ermittelten Verhältnis hinzu gegeben (Punkt 4.1.2). In einer so genannten Titrationsreihe wurde für jeden verwendeten Antikörper die ideale Konzentration ermittelt. Es handelt sich dabei um die geringste Konzentration, die noch eine klare Abgrenzung zu den ungefärbten Zellen erlaubt. Nach dem Aufwirbeln des Antikörper-Zellen-Gemisches wurde dieses für 10 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Färbeprozess mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gestoppt und die Zellen bei 2000 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS/BSA resuspendiert. Um tote Zellen zu detektieren und auszuschließen, wurde unmittelbar vor jeder Analyse 4', 6-diamino-2-phenylindol, dilactate (DAPI) hinzu gegeben. DAPI ist ein Reagenz, das die geschädigte Zellmembran von toten Zellen passieren kann um dann mit der DNA zu interkalieren. Die Zellen wurden bis unmittelbar vor ihrer Messung auf Eis aufbewahrt.

4.5 Isolation von Plasmazellen mittels magnetisch-assoziiertes Zellsortierung (MACS)

Die magnetisch-assoziierte Zellsortierung ist eine Methode zur Trennung von Zellen nach Oberflächenmolekülen. Hierzu werden die Oberflächenmoleküle von Zellen der Ausgangspopulation, die angereichert oder entfernt werden sollen, mit magnetischen Antikörpern markiert und inkubiert. Mit Hilfe eines starken Magnetfeldes können die gewünschten Zellen isoliert werden.

Im Falle der Plasmazellisolierung aus PBMC waren zwei Trennschritte erforderlich, die unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden. Um alle Nicht-Plasmazellen aus den PBMC zu depletieren, wurden diese zunächst mit einem Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD2, CD3, CD14, CD15, CD22, CD34, CD56, CD123 und CD235a markiert und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden Anti-Biotin Antikörper hinzu gegeben, die mit magnetischen Kügelchen (MicroBeads) markiert waren. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten folgten ein Waschschriff mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA und die anschließende Zentrifugation (1200 rpm, 4°C für 10 min.). Die Zellen wurden dann vollautomatisch in einem Hochgradienten-Magnetfeld eines autoMACSTM Separators voneinander getrennt. Die unmarkierte, negative Fraktion wurde aufgefangen und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C für 10 min.),

während die markierte Positivfraktion verworfen wurde. Im nächsten Schritt wurden die verbliebenen Zellen nun mit magnetischen Anti-CD38 MicroBeads markiert, für 15 Minuten inkubiert und erneut mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C für 10 min.). Aufgenommen in das entsprechende Volumen PBS/BSA, wurden die Zellen anschließend über eine im Magnetfeld angebrachte MS-Säule gegeben, die vorher äquilibriert wurde. Diese besitzt eine Matrix aus Stahlwolle, an der die magnetisch markierten CD38⁺ Zellen zurückgehalten wurden, während die unmarkierten Zellen die Säule durchliefen und als negative Fraktion aufgefangen und verworfen wurden. Wenn das Säulenreservoir leer war, wurde die Säule dreimal mit je 500 µl PBS/BSA gespült. Um die verbliebenen, angereicherten Zellen in der Säule zu gewinnen, wurde die MS-Säule aus dem Magnetfeld entnommen. Die Säule wurde dann mit 1 ml PBS/BSA gefüllt und die gewünschte Fraktion mit einem entsprechenden Stempel in ein 15 ml Röhrchen herausgedrückt. Um eine optimale Reinheit zu erreichen, wurde der Anreicherungsschritt über die MS-Säule zweimal hintereinander durchgeführt. Beim zweiten Durchgang wurden die markierten Zellen jedoch mit DMEM herausgedrückt, so dass sie sofort kultivierbar waren.

Nachfolgend wurde die angereicherte CD38⁺ Zellfraktion gezählt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Mit dieser Methode konnten durchschnittlich 2×10^4 CD38⁺⁺ Zellen aus 1×10^8 PBMC isoliert werden.

4.6 Generierung von mesenchymalen Knochenmarkzellen in Zellkultur

Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet resuspendiert, in 10 ml DMEM Medium mit 20% FCS/ME, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen und in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Die Zellkultur wurde anschließend bei 37°C mit 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurde der Kulturüberstand mit allen nicht-adhären Zellen vorsichtig abgesaugt, so dass nur noch die adhären Knochenmarkzellen anhafteten. Dieses frühe Entfernen der nicht-adhären Zellen hat gezeigt, dass so die intrinsische Hämatopoese in Langzeitkulturen von stromalen Knochenmarkzellen vermieden wird (125). Der Zellboden wurde dann zweimal mit Medium gespült, frisches Medium hinzugefügt und die adhären Zellen weiter im Brutschrank kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde das Medium erneuert bis nach ca. 4 Wochen eine konfluente adhäre Zellschicht gewachsen war. Um die adhären Knochenmarkzellen zu ernten, wurden sie nach Abnahme des Mediums zweimal mit warmen PBS gewaschen und mit 0,25% Trypsin/1mM EDTA bedeckt. Während

der 5 bis 10minütigen Inkubationszeit bei 37°C mit 5 % CO₂ lösten sich die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche, was lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Mit dem 10-fachen Volumen DMEM/20 % FCS wurde die Enzymaktivität beendet und die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Knochenmarkzellen auf zwei neue Kulturen mit DMEM aufgeteilt und im Brutschrank inkubiert. Zur Steigerung der Vervielfältigungsrate erfolgte bei den nachfolgenden Passagen die Umsetzung der stromalen Knochenmarkzellen in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4.

4.7 Kokultur von mesenchymalen Knochenmarkzellen und Plasmazellen

Für die Kokulturrexperimente wurden ca. 2×10^5 mesenchymale stromale Knochenmarkzellen pro Loch mit 2 ml DMEM Plus in 12-Lochplatten ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium abgenommen und frisches hinzu gegeben. Nach erneuten 1-2 Tagen erfolgte die Isolation der Plasmazellvorläufer aus dem peripheren Blut, die in einem Verhältnis zwischen 1:10 und 1:20 zu den stromalen Zellen in Kokultur gegeben wurden. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 definiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Zellanlyse im FACS wurde zunächst der Überstand mit den nicht-adhärenen kokultivierten Plasmazellen abgenommen. Für die durchflusszytometrische Analyse war eine Vermischung mit parallel angesetzten Stromazellkulturen gleicher Zellzahl erforderlich, die vorher mit Trypsin/1mM EDTA vom Boden der 12-Loch-Platte gelöst wurden. Dieses Zellgemisch wurde dann bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dagegen erfolgte die Ablösung der stromalen Knochenmarkzellen mit den adhärenen Plasmazellen vom Plastikboden gemeinsam. Um gleiche Bedingungen für alle zu analysierenden Plasmazellen sicherzustellen, wurden auch die nicht-adhärenen Plasmazellen (im Gemisch mit Stromazellen) für 5-10 Minuten trypsiniert. Anschließend wurde die Enzymwirkung mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA beendet und die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Ab Tag 7 der Kokultur zwischen beiden Zellarten wurde zum verbrauchten Medium regelmäßig (alle 2-3 Tage) frisches Medium hinzu gegeben und zuvor zusätzlich zum Teil altes Medium vorsichtig entfernt. Auf diese Weise sollten die Kulturbedingungen auch über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden.

4.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) erstellt. Die statistische Auswertung sowie die Wahl der Darstellung wurden von Frau Dörte Huscher (DRFZ) unterstützt. Um Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen einer Kokultur zu verschiedenen Zeitpunkten treffen zu können, wurde der „Wilcoxon matched pairs test“ mit dem Software-Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt. Bei weniger als 5 Experimenten wurde der gepaarte t-Test zur statistischen Auswertung herangezogen, wobei mindestens 3 zueinander gehörige Paare verglichen wurden. Als signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ angesehen.

Aufgrund des Pilotcharakters meiner Untersuchung, in der es darum geht, Trends aufzuzeigen, die in größeren Studien mit expliziten Fragestellungen genauer überprüft werden müssen, habe ich trotz der Durchführung mehrerer Tests in derselben Stichprobe auf eine Adjustierung des Signifikanzniveaus verzichtet.

5 Ergebnisse

5.1 Aufbau eines Kokultur-Systems zwischen mesenchymalen Knochenmarkszellen und Plasmazellen

5.1.1 Experiment - Übersicht

Nach Antigenkontakt entstehen Plasmazellvorläufer in den sekundären lymphatischen Organen, die dann über das Blut oder die Lymphe in Knochenmark und entzündete Gewebe wandern (43, 64). Hier können sie zu reifen Plasmazellen ausdifferenzieren (41). Im Knochenmark wird die terminale Differenzierung und das Überleben von Plasmazellen unterstützt (126). Dabei spielen mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark eine wesentliche Rolle (81, 96). Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich ein humanes *in vitro* Kokultur-Modell etabliert, welches die Differenzierung und das Überleben von Plasmazellen fördert.

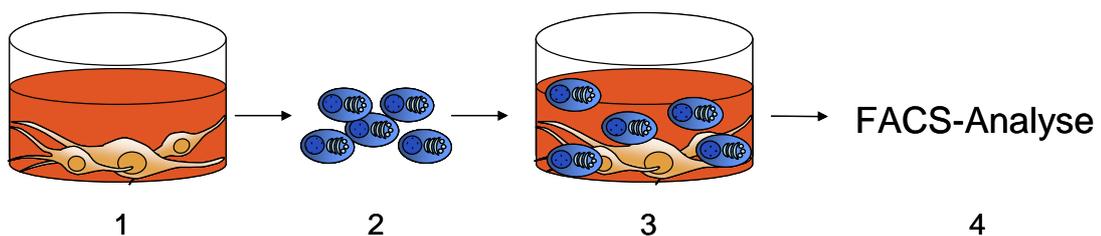


Abb. 3: Versuchsaufbau. (1) Adhärenz Stromazellen aus humanem Knochenmark wurden für ca. 3 Tage kultiviert, bis eine konfluente Zellschicht gewachsen war. (2) $CD38^{++}$ Plasmablasten (Plasmazellvorläufer) wurden aus dem peripheren Blut mittels MACS isoliert und mit FACS analysiert. (3) Die isolierten $CD38^{++}$ Zellen wurden alleine oder zusammen mit den konfluenten Stromazellen kultiviert. (4) Die Zellen wurden zu verschiedenen späteren Zeitpunkten aus der Kultur entnommen und die Anzahl der überlebenden Zellen und ihr Differenzierungsstadium im FACS untersucht.

5.1.2 Charakterisierung von mesenchymalen Knochenmarkstromazellen

In Anlehnung an die Literatur wurden die stromalen Zellen aus humanem Knochenmark von Hüftgelenkknöcheln isoliert und in der Zellkultur vermehrt (97, 117). Sie formen das zelluläre, retikuläre Gerüst im Knochenmark und spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese (81). Um herauszufinden, ob es sich bei diesen Knochenmarkszellen um einen homogenen Zelltyp handelt oder womöglich Subpopulationen existieren, wurden sie mittels Lichtmikroskop und Durchflusszytometrie charakterisiert.

Nach Beobachtung im Lichtmikroskop war ersichtlich, dass es sich bei den isolierten Knochenmarkszellen um Plastik-adhärente Zellen mit typischen fibroblastenartigen Ausläufern handelte. Dies entspricht früheren Arbeiten von Friedenstein et al. (109). In den hier beschriebenen Experimenten wurden über retikuläre Zellausläufer vermittelte Zell-Zell Kontakte zwischen den stromalen Zellen beobachtet. Hierdurch entstand ein homogenes Netzwerk von ineinander geflochtenen Zellen. Ab einer gewissen Zelldichte schienen sich die fibroblastenartigen Zellen im Wachstum selbst zu inhibieren. Der Oberflächen-Phänotyp der mesenchymalen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In der FACS-Analyse zeigte sich, dass diese Zellen wichtige Adhäsionsmoleküle ausprägen wie das Tetraspanin CD9 und das an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Hyaluronsäure bindende CD44. Die Stromazellen exprimierten außerdem das Molekül CD106 (VCAM-1), welches via VLA-4 eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Plasmazellen spielt. Hingegen wurden keine Moleküle an der Oberfläche nachgewiesen, die für Zellen hämatopoetischen Ursprungs typisch sind, wie z.B. CD45, CD11a und CD14. Die Knochenmarkszellen prägten nicht den spezifischen Plasmazell-Marker CD38 aus, so dass eine Kontamination mit Plasmazellen ausgeschlossen werden konnte. In Abb. 4 sind die Oberflächenfärbungen für die mesenchymalen Knochenmarkstromazellen zusammengefasst.

Zusammenfassend schien es sich bei den mesenchymalen Zellen um eine homogene Population zu handeln. Die Ausprägung bedeutender Adhäsionsmoleküle macht eine Interaktion mit Plasmazellen möglich.

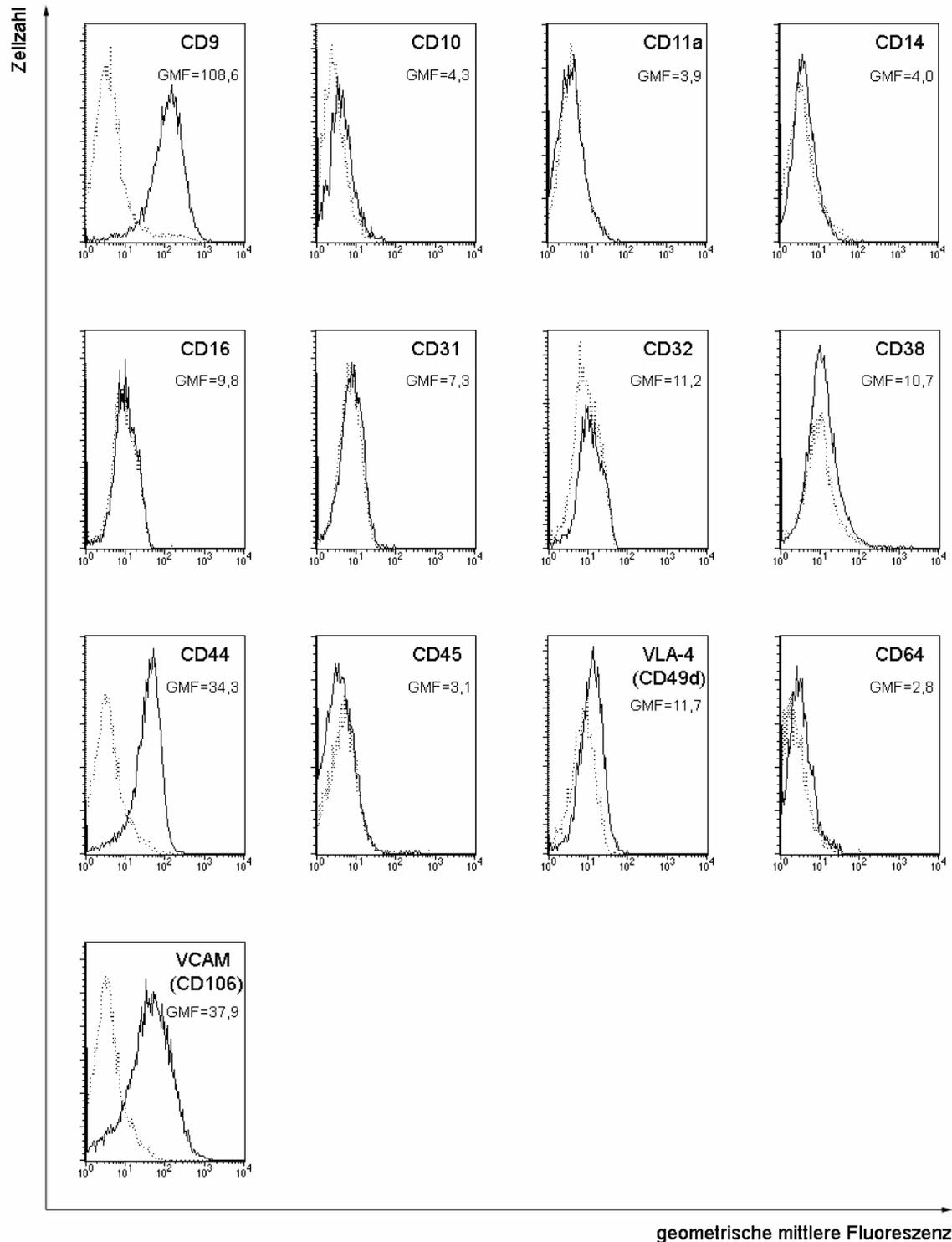


Abb. 4: Charakterisierung von Knochenmarkstromazellen im FACS. Adhärenente Zellen des Knochenmarks wurden für eine Woche kultiviert bis eine konfluente Zellschicht gewachsen war, und anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert. Dargestellt sind die untersuchten Oberflächenmoleküle (durchgehende Linie) mit der entsprechenden Isotypkontrolle (gepunktete Linie). GMF= geometrische mittlere Fluoreszenz.

5.1.3 Isolierung und Charakterisierung von Plasmazellen aus dem peripheren Blut

Plasmazellen und deren Vorläufer sind durch die Produktion von Antikörpern für die erworbene humorale Immunität verantwortlich. Es stellte sich die Frage, aus welchem menschlichen Organ sollen die Plasmazellvorläufer isoliert werden, um sie mit den Knochenmarkzellen zu kultivieren? Zirkulierende Plasmazellen im peripheren Blut befinden sich auf dem Weg zu ihren Zielorganen und stellen potentielle Vorläufer langlebiger Knochenmarkplasmazellen dar (48, 127). Im peripheren Blut des Menschen beträgt der Anteil der Plasmazellen bzw. Plasmazellvorläufer an den gesamten mononukleären Zellen (PBMC) nur zwischen 0,01 und 0,1% (41, 52, 96, 128), was eine Isolation und FACS-Analyse dieser Zellen erschwert. Für die Identifikation von Plasmazellen ist die starke Ausprägung des Moleküls CD38 an der Oberfläche kennzeichnend (39). Aus diesem Grund verwendete ich ein Plasmazell-Isolations-Kit, das auf dem Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht und die Expression von CD38 auf Plasmazellen ausnutzt.

Die Frequenz der Plasmazellen an den gesamten PBMC betrug durchschnittlich 0,02%. Aufgrund dieser geringen Häufigkeit habe ich die isolierte Zellfraktion von mindestens 2 Spendern gepoolt.

Die Reinheit der Plasmazell-Population aus dem Blut nach magnetisch-assoziiertes Zellsortierung wurde in Anlehnung an die Literatur durchflusszytometrisch über die Expression von $CD19^+/CD38^{++}/CD20^-$ ermittelt. (41, 96, 129, 130) Zu diesem Zweck wurde jeweils vor Depletion aller „Nicht-Plasmazellen“ und Anreicherung $CD38^{++}$ Zellen sowie danach die Reinheit kontrolliert (Abb. 5). In den Experimenten konnte unter Ausschluss der Debris/Zelltrümmer und der toten Zellen eine durchschnittliche Reinheit von $88,7\% \pm 5,7\%$ bei der $CD19^+/CD38^{++}$ -Population erzielt werden, in der $CD38^{++}/CD20^-$ -Zellgruppe waren es $84,9\% \pm 8,2\%$.

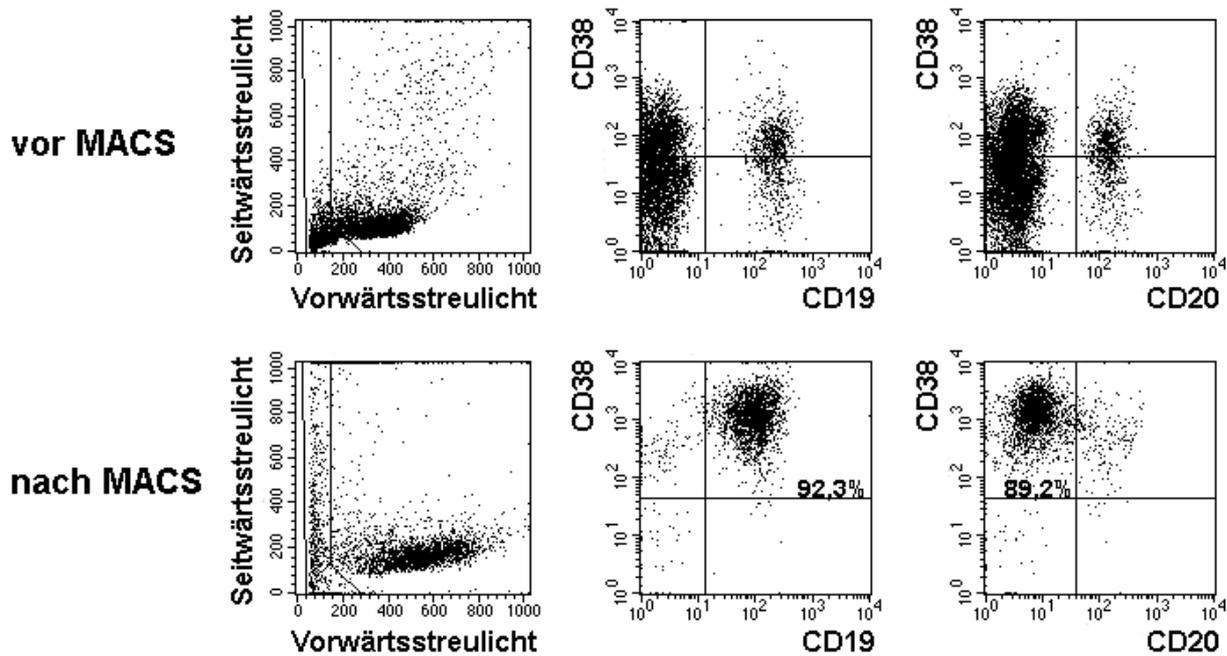


Abb. 5: Überprüfung der Reinheit von Plasmazellpopulationen aus PBMCs vor und nach Depletion von „Nicht-Plasmazellen“ und Anreicherung der CD38⁺⁺ Zellen. Zu sehen ist ein repräsentatives Beispiel für die Reinheit angereicherter CD38⁺⁺ Zellen aus PBMCs nach magnetisch-assoziiertes Zellsortierung. Plasmablasten bzw. Plasmazellen wurden mit Hilfe eines Depletions-Cocktails gegen alle „Nicht-Plasmazellen“ und anschließender Anreicherung aller CD38⁺⁺ Zellen aufgereinigt. Diese Zellen wurden über CD38⁺⁺/CD19⁺ bzw. CD38⁺⁺/CD20⁻ definiert. Zelltrümmer (markierte Fenster der linken Punktdiagramme) und tote Zellen (nicht dargestellt) wurden ausgeschlossen.

5.1.4 Etablierung einer FACS-Einstellung zur Abgrenzung mesenchymaler Knochenmarkzellen und Plasmazellen

Ziel dieser Doktorarbeit war es, Plasmazellen hinsichtlich ihres Überlebens und Reifung in Kokultur mit mesenchymalen stromalen Knochenmarkzellen durchflusszytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Aufgrund der niedrigen Plasmazellzahl sowie der Gefahr des Zellverlustes durch Auftrennung der Plasmazellen von den Stromazellen nach der Kokultur, war eine gleichzeitige Analyse beider Zelltypen im FACS notwendig. Voraussetzung dafür war, eine gemeinsame und technisch mögliche Einstellung im FACS zu finden. Die Schwierigkeit lag in der Unterschiedlichkeit beider Zellarten in Größe und Granularität, weshalb die Auswertung beider Zelltypen ein komplett anderes Setting bedurfte. Zusätzlich bestand die Gefahr der Zellüberlagerung, so dass Stroma- und Plasmazellen nicht eindeutig hätten

differenziert werden können. Die fibroblastenartigen Zellen zeichneten sich im FACS auch im ungefärbten Zustand durch eine hohe Autofluoreszenz aus. Der große Durchmesser von durchschnittlich 21,1 μm und die hohe Granularität spiegeln sich im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wider. Hingegen sind die Plasmazellen als Teil der mononukleären Zellen im peripheren Blut viel kleiner als die Stromazellen. Diese durchflusszytometrischen Unterschiede beider Zelltypen sind in Abb. 6 dargestellt.

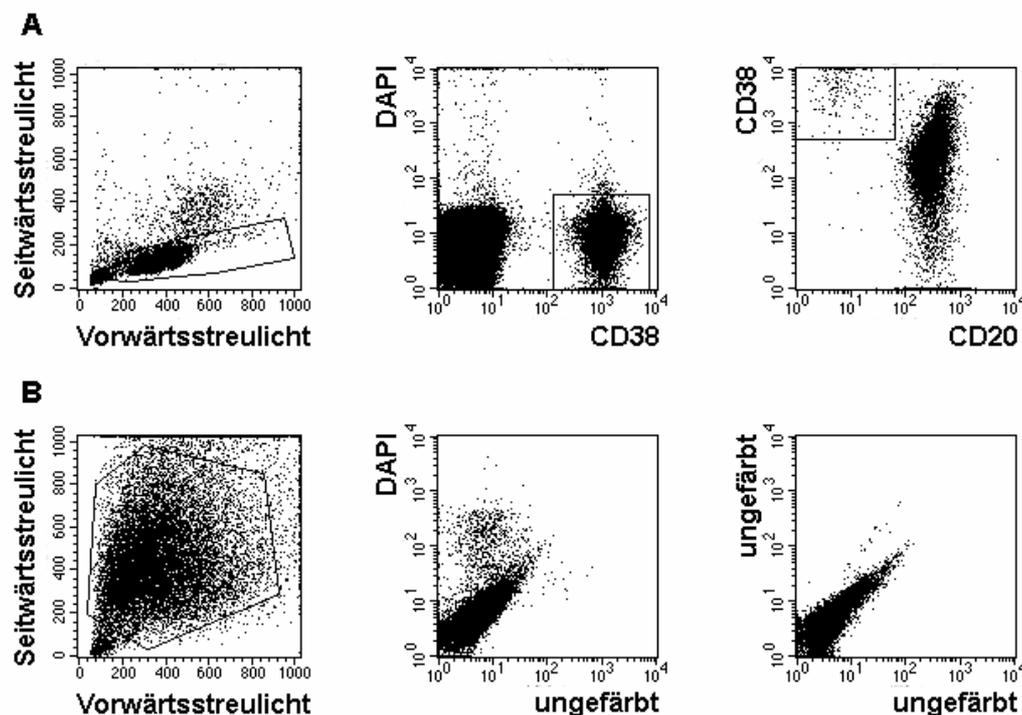


Abb. 6: Darstellung von Plasmazellen aus dem peripheren Blut und mesenchymalen Knochenmarkzellen im FACS. (A) Über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurde die Lymphozytenpopulation definiert (linkes Punktdiagramm). Die Charakterisierung von lebenden Zellen erfolgte durch Analyse der DAPI/CD19⁺ Zellen (mittleres Punktdiagramm). Im markierten Fenster sind CD38⁺⁺/CD20⁻ Plasmablasten dargestellt (rechtes Punktdiagramm). (B) Die stromalen Knochenmarkzellen füllen das Vorwärts- und Seitwärtslicht aufgrund ihrer Größe und starken Autofluoreszenz fast vollständig aus (linkes Punktdiagramm). Über den DAPI-Kanal findet der Lebend-/Totausschluss der Zellen statt (mittleres Punktdiagramm). Im rechten Bild ist gezeigt, dass die stromalen Zellen auch im ungefärbten Zustand eine relativ hohe Fluoreszenz-Intensität (Autofluoreszenz) zeigen.

Das Hauptinteresse in der Kokultur galt jedoch der Plasmazellpopulation, so dass ich mich beim Etablieren der Einstellung im Durchflusszytometer auf diese konzentrierte und dementsprechend die notwendigen Kanäle adjustierte. In diesem Fall machte ich mir die starke Autofluoreszenz der stromalen Knochenmarkzellen und die Möglichkeit der Plasmazellidentifikation über das Oberflächenmolekül CD38 zunutze. Im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht des gemeinsamen Settings waren die Plasmazellen durch deren Größe klar von den Stromazellen zu unterscheiden. Denn aufgrund der veränderten Einstellung zugunsten der Plasmazellen verschob sich die Stromazellpopulation im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht in den oberen Randbereich. Im DAPI-Kanal lagen die stromalen Knochenmarkzellen aufgrund ihrer Autofluoreszenz viel höher, damit konnte im DAPI/CD38 Punktdiagramm eine klare CD38⁺⁺ lebende Plasmazellpopulation abgegrenzt werden (Abb. 7). Die Expression weiterer Oberflächenmarker wurde auf dieser definierten CD38⁺⁺ Population weiter analysiert. Hierzu wurden Farbstoffe genutzt, die in den verbleibenden Fluoreszenzkanälen gemessen werden. Das spezielle Stromazell-Plasmazell-Setting konnte an Tag 0 sowie zu allen weiteren Zeitpunkten gleichermaßen erfolgreich zur Analyse der Plasmazelldifferenzierung angewandt werden.

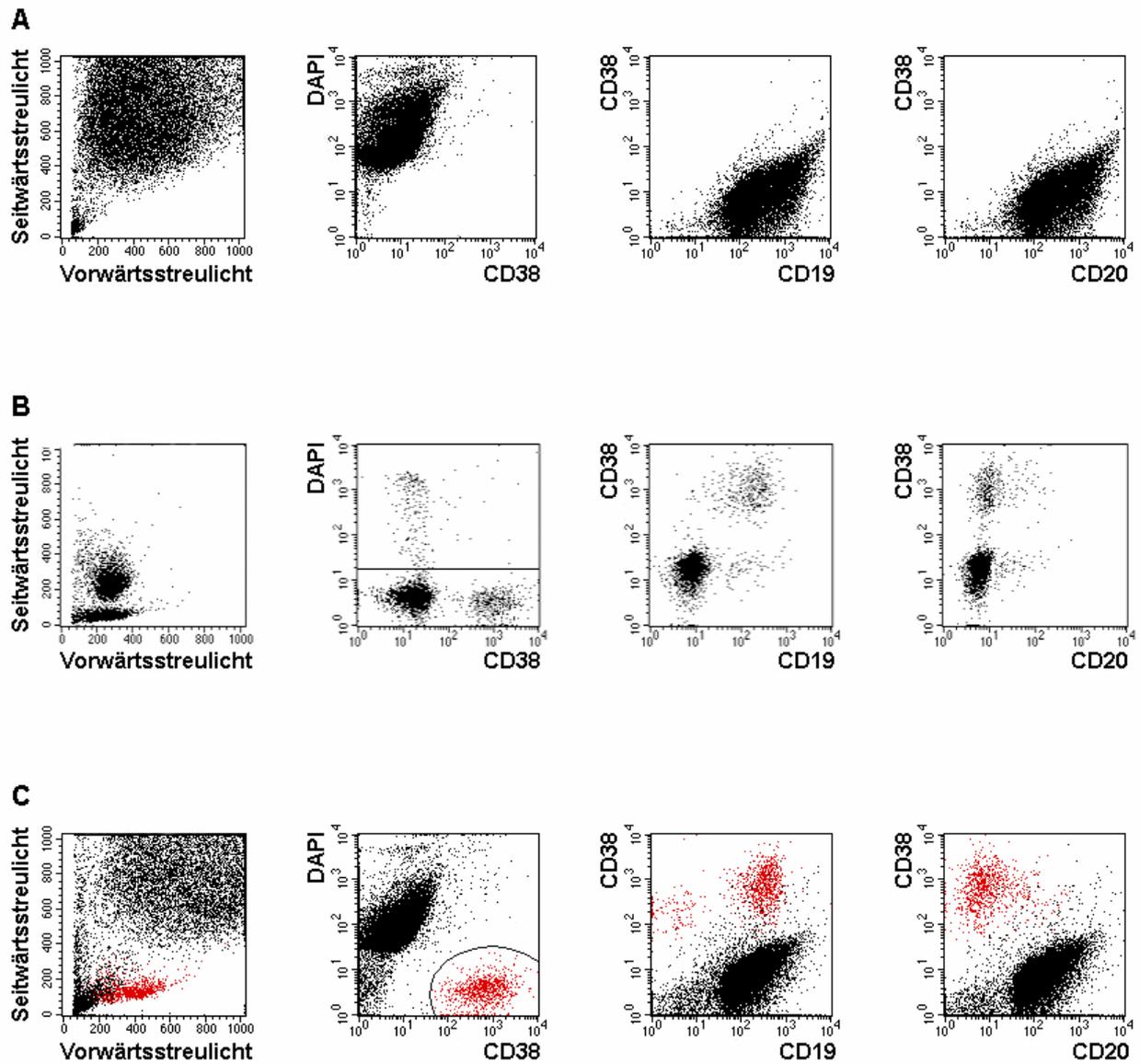


Abb. 7: Etablierung einer gemeinsamen FACS-Einstellung für mesenchymale Zellen aus dem Knochenmark und Plasmazellen. Mesenchymale Knochenmarkstromazellen (A) und PBMCs (nach Depletion aller „Nicht-Plasmazellen“) (B) sind nach Fluoreszenzfärbung mit entsprechenden Antikörpern einzeln im gemeinsamen Setting dargestellt. (C) Plasmazellen (rot) werden zusammen mit den Stromazellen aus dem Knochenmark (schwarz) in einer FACS-Einstellung dargestellt. Die CD38⁺⁺ Zellen im markierten Fenster (2. Punktdiagramm) sind in allen Analysefenstern klar von den Knochenmarkstromazellen abgrenzbar.

5.2 Einfluss der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen auf das Überleben von Plasmazellen

Verschiedene Studien sowohl am Mausmodell (81) als auch im humanen System (95) zeigten in der Vergangenheit, dass Knochenmarkstromazellen einen positiven Einfluss auf das Plasmazellüberleben haben. Hier sollten diese Untersuchungen durch die Charakterisierung der Plasmazelldifferenzierung und das Überleben auf Einzelzellebene im FACS weitergeführt werden.

Die Überlebensrate der Plasmazellen in Gegenwart von Knochenmarkstromazellen wurde mit Hilfe des FACS berechnet. Für die Experimente wurden Knochenmarkstromazellen in 12-Loch-Platten ausgesät. Nach regelmäßiger Kontrolle zeigte sich, dass die mesenchymalen Knochenmarkzellen eine Zellzahl von ca. 2×10^5 nicht überschritten, wenn sich eine dichte konfluente Zellschicht gebildet hatte. Da sich die Zahl der stromalen Knochenmarkzellen im Verlauf der Versuche nahezu nicht veränderte, wurde sie als Bezugsgröße für die Plasmazellen in Kokultur herangezogen. Als Ausgangswert wurde das Verhältnis der Plasmazellen zu den mesenchymalen Knochenmarkzellen an Tag 0 mittels FACS-Analyse definiert. Bei einer konstant bleibenden Zellzahl der ausgesäten Stromazellen in Kultur, konnte im FACS die Frequenz der überlebenden Plasmazellen für die nachfolgenden Zeitpunkte anhand des Verhältnisses bezogen auf Tag 0 berechnet werden. Lebende Plasmazellen wurden einerseits über das Vorwärts- und Seitwärtslicht, andererseits über die DAPI/CD38⁺⁺ Population definiert.

5.2.1 Überleben der Plasmazellen in Kokultur an Tag 3

Zunächst sollte überprüft werden, ob Plasmazellen in Kokultur mit Stromazellen länger überleben als allein kultivierte Plasmazellen in herkömmlichem DMEM Medium. Dazu wurde Tag 3 der Kultur als Messzeitpunkt gewählt.

Plasmazellen, die ohne Beisein von Knochenmarkzellen kultiviert wurden, konnten an Tag 3 nicht mehr als lebende Zellen detektiert werden. Lichtmikroskopisch waren nur noch apoptotische Zellen sichtbar. In der FACS-Analyse zusammen mit den Stromazellen als Bezugsgröße war keine lebende CD38⁺⁺ Population mehr nachweisbar. Ein komplett anderes Bild zeigte sich in der Kokultur zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkzellen. An Tag 3 überlebten im Durchschnitt insgesamt $26,6\% \pm 4,1\%$ (5 unabhängige Versuche) der ursprünglich in die Kokultur hinzugefügten Plasmazellen (Abb. 8).

Das bedeutet, die Knochenmarkstromazellen bieten einem Teil der Plasmazellen aus dem peripheren Blut zumindest kurzfristig einen Überlebensvorteil gegenüber den allein kultivierten Plasmazellen.

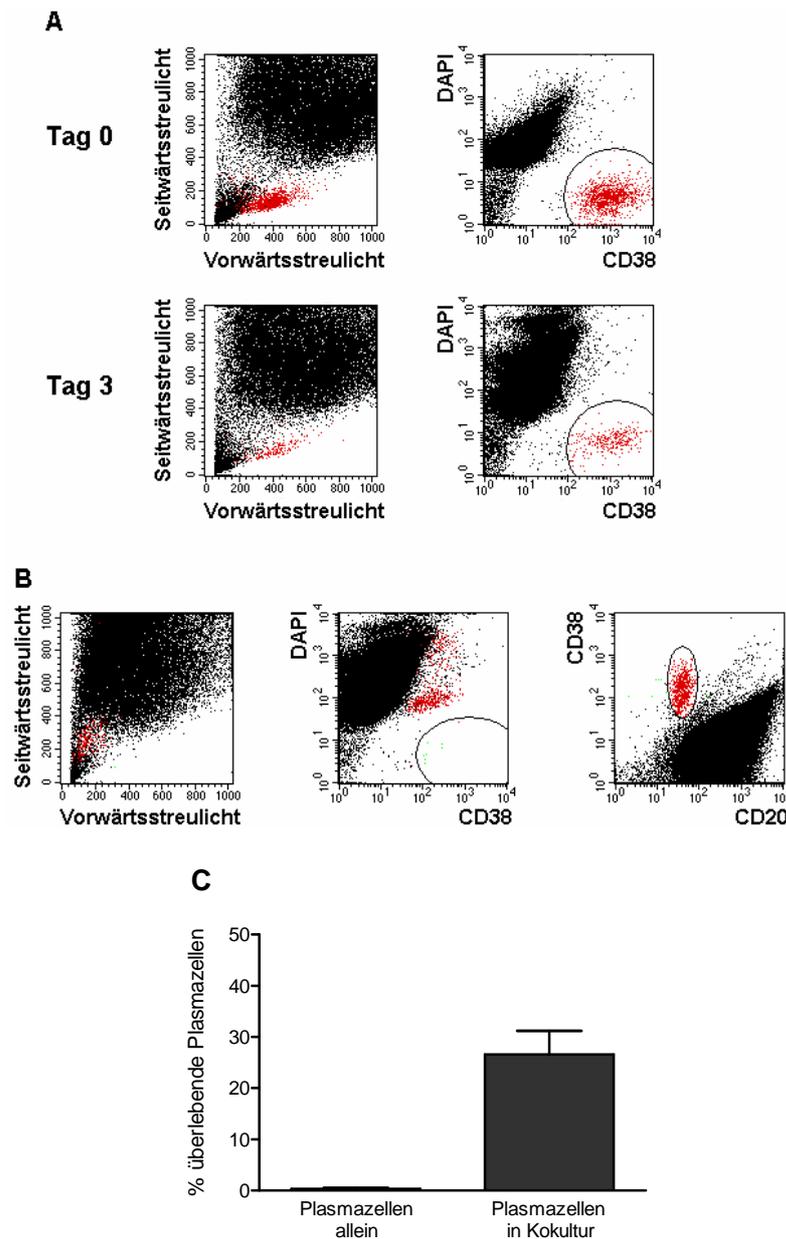


Abb. 8: Vergleich des Überlebens von Plasmazellen alleine und in Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkstromazellen. (A) Plasmazellen wurden mit stromalen Knochenmarkszellen kokultiviert und überlebende Zellen an Tag 0 und Tag 3 durchflusszytometrisch analysiert. $CD38^{++}$ Plasmazellen sind rot dargestellt. (B) In Medium alleine kultivierte Plasmazellen wurden nach Ende der Kulturdauer, unmittelbar vor Analyse, mit der gleichen Anzahl stromaler Zellen (als Bezugsgröße) gemischt und dann im FACS gemessen. Die im rechten Punktdiagramm identifizierte $CD38^{++}/CD20^{-}$ Plasmazellpopulation wird in allen Punktdiagrammen rot dargestellt. Es ist erkennbar, dass diese Zellen mit DAPI markiert sind und ein Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht von toten Zellen aufweisen. Lebende $CD38^{++}/DAPI^{-}$ Plasmazellen sind in den Kulturen ohne Stromazellen nicht detektierbar (mittleres Punktdiagramm). (C) Das Diagramm stellt quantitativ in % die überlebenden Plasmazellen an Tag 3 dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus 3 bzw. 5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

5.2.2 Überleben der Plasmazellen in Kokultur bis Tag 29

Um zu beurteilen, ob die überlebende Zellpopulation vom Tag 3 auch bei längerer Kultivierung konstant bestehen bleibt, das heißt, ob die Stromazellen in der Lage sind, langfristig eine Subpopulation der Blutplasmazellen am Leben zu erhalten, wurde das Überleben zu späteren Zeitpunkten der Kokultur untersucht.

Der nächste zu kontrollierende Zeitpunkt war Tag 7 der Kokultur. Die überlebende Plasmazellpopulation fiel von 26,6% an Tag 3 auf durchschnittlich $12,3 \pm 5,7\%$ an Tag 7 (5 Versuche). Schließt man Tag 10 mit in die Gruppe ein, sind es $11,7 \pm 5,3\%$ (1 Versuch) lebende Zellen. An Tag 14 und 15 reduzierte sich die Frequenz auf $5,6\% \pm 2,4\%$ (5 Versuche) und weiter auf $3,3\% \pm 1,9\%$ an Tag 22 (4 Versuche). Der letzte zu untersuchende Zeitpunkt beinhaltete Tag 29, an dem noch $1,7\% \pm 1,2\%$ (4 Versuche) Plasmazellen am Leben waren, die seit Tag 0 mit den Stromazellen kokultiviert wurden. Von weiteren Analysezeitpunkten wurde bei der niedrigen Frequenz abgesehen, da auch eine aussagekräftige Auswertung im FACS nur noch schwer möglich war. Abb. 9 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass die Frequenz der Plasmazellen ab Tag 3 der Kokultur mit Knochenmarkstromazellen kontinuierlich abnahm. Ein kleiner Prozentsatz an überlebenden Plasmazellen konnte jedoch bis Tag 29 nachgewiesen werden.

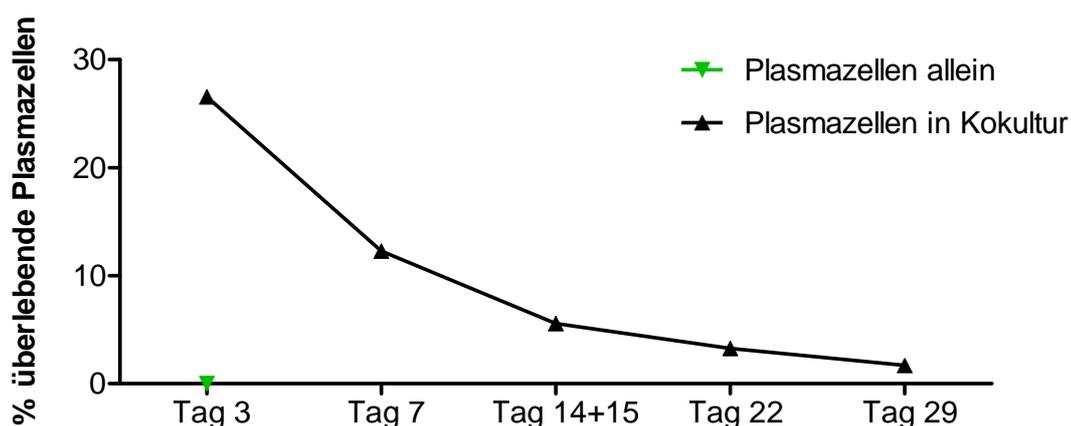


Abb. 9: Überleben der Plasmazellen zwischen Tag 3 und Tag 29. Plasmazellen und mesenchymale Knochenmarkzellen wurden kokultiviert. Die Frequenz überlebender Plasmazellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Bezug gesetzt zur Frequenz der Plasmazellen an Tag 0. Die einzelnen Datenpunkte zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigen die berechneten Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

5.3 Plasmazelladhäsion an mesenchymale Knochenmarkzellen

Bei der Beobachtung der Stromazell-/Plasmazell-Kokultur im Lichtmikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten fiel eine heterogene Verteilung der Plasmazellen auf. Der Großteil der an Tag 0 hinzugefügten Blutplasmazellen war nicht an die adhärenste stromale Zellschicht gebunden, sondern schwamm lose im Medium, was durch leichtes Bewegen der Zellflasche sichtbar wurde. Der andere Teil der Plasmazellen adhärierte fest an die Knochenmarkzellen, so dass sie sich auch bei Bewegung nicht von ihnen ablösten. Diese Beobachtung eröffnete neue Überlegungen hinsichtlich des Bindungsverhaltens der Plasmazellen zu den Stromazellen und dessen Auswirkungen. Es stellte sich die Frage, ob ein zeitlich begrenzter Prozess (= Transienz) vorliegt. Das heißt, sind zunächst alle Plasmazellen adhärenst und im Verlauf der Kokultur verlieren sie den Kontakt zu den Stromazellen? Oder haben vielleicht nicht alle Plasmazellen die gleiche Chance sich fest an die mesenchymalen Zellen zu binden? Möglich ist auch ein wechselnder Prozess, bei dem sich der Anteil der adhärensten zu den nicht-adhärensten Plasmazellen stetig austauscht.

Um diese Fragen zu beantworten, führte ich folgendes Experiment durch (Abb. 10): Wie zuvor, wurden an Tag 0 die isolierten Plasmazellen aus dem Blut zu den Knochenmarkstromazellen gegeben. Nach ca. 20 Stunden, an Tag 1 der Kokultur wurden nun die nicht-adhärensten Plasmazellen dieser Kokultur auf eine sekundäre, parallel angesetzte Stromazellschicht transferiert. Die adhärensten Plasmazellen wurden mit den Stromazellen in Kokultur gelassen. Zur Kontrolle der tatsächlich transferierten Plasmazellen wurden die adhärensten und nicht-adhärensten Plasmazellen einer Vergleichskultur an Tag 1 im FACS analysiert.

Nach erneuten 2 Tagen, das heißt an Tag 3 der Kokultur, war lichtmikroskopisch erkennbar, dass von den transferierten Plasmazellen wieder ein Teil adhärierte. Auch bei den zunächst adhärensten Plasmazellen, die in Kokultur mit den Knochenmarkstromazellen belassen wurden, fiel auf, dass sich ein Teil der Plasmazellen abgelöst hatte. Quantifiziert wurde die Beobachtung im FACS, in dem sowohl die adhärensten als auch die nicht-adhärensten Plasmazellen der transferierten und der belassenen Kokultur analysiert und mit der Kontrollgruppe von Tag 1 verglichen wurden. Als Bezugsgruppe für die nicht-adhärensten Plasmazellen wurden wieder parallel angesetzte Stromazellkulturen gleicher Zellzahl verwendet.

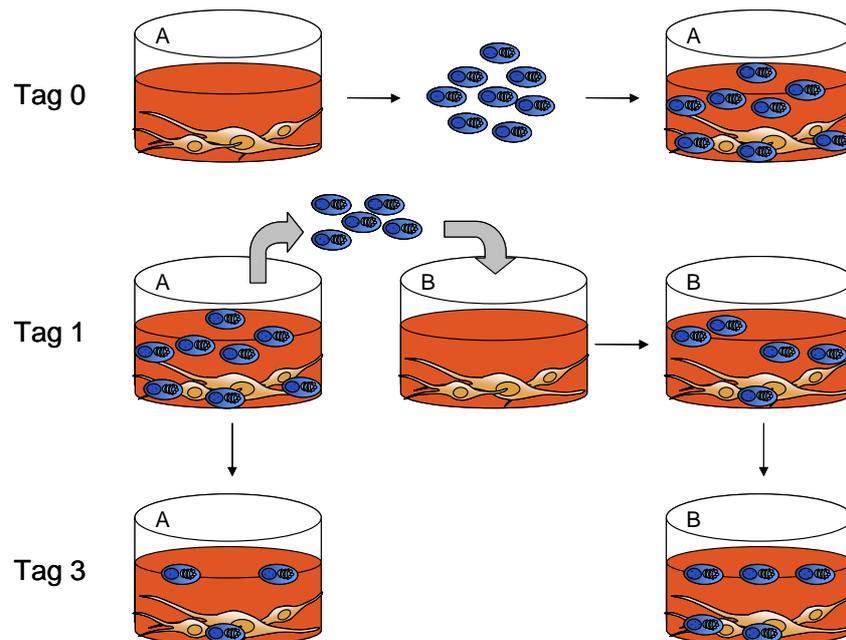


Abb. 10: Versuchsaufbau des Transfers nicht-adhärenter Plasmazellen in Sekundärkulturen. An Tag 0 wurden die CD38⁺⁺ Zellen aus dem Blut isoliert und in Kokultur mit den Knochenmarkstromazellen gegeben (Kulturschale A). An Tag 1 wurden die nicht-adhärenen Plasmazellen auf eine sekundäre, parallel angesetzte Stromazellschicht transferiert (Kulturschale B) und die adhärenen Plasmazellen in der Kokultur belassen (Kulturschale A). An Tag 3 wurden sowohl die adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen der zunächst adhärenen Plasmazellfraktion (Kulturschale A) als auch die adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen der transferierten Plasmazellfraktion (Kulturschale B) durchflusszytometrisch analysiert.

5.3.1 Transfer nicht-adhärenter Plasmazellen in Sekundärkulturen

Zum Verständnis der folgenden Darstellung ist wichtig, dass sich alle Prozentangaben auf die ursprünglich eingesetzte Gesamtplasmazellzahl beziehen. In vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten überlebten an Tag 1 der Vergleichs-Kokulturen im Mittel $40,7 \pm 20,2\%$ Plasmazellen. Es waren $9,5 \pm 3,8\%$ adhären und $31,2 \pm 16,9\%$ nicht-adhären. Die an Tag 1 nicht adhärenen Plasmazellen wurden auf eine neue Stromazellkultur transferiert (also $31,2 \pm 16,9\%$).

An Tag 3 der Kokultur zeigte sich, dass nach dem Transfer erneut eine Fraktion der Plasmazellen adhärenierte, die Frequenz betrug im Durchschnitt $7,7 \pm 3,6\%$. Die restlichen $26,8 \pm 15,8\%$ waren nicht-adhären. Werden die adhärenente und nicht-adhärenente Zellfraktion addiert, erhält man insgesamt $34,5 \pm 19,1\%$ überlebende Plasmazellen. Im Rahmen der Messgenauigkeit

bedeutet dies, dass von den an Tag 1 nicht-adhärennten transferierten Plasmazellen in der sekundären Kokultur mindestens die Hälfte bis alle Zellen überlebt haben.

Betrachtet man nun die Plasmazellen, die an Tag 1 der Kokultur zunächst adhärennt waren und somit nicht transferiert wurden, ist eine zeitlich begrenzte Bindung der Zellen innerhalb von 2 Tagen quantifizierbar. Waren an Tag 1 noch durchschnittlich 9,5% Plasmazellen adhärennt, so waren es an Tag 3 nur noch $1,8 \pm 1,5\%$. Die mittlere Frequenz der gelösten, nicht-adhärennten Plasmazellen betrug $2,1 \pm 1,1\%$, die restlichen Plasmazellen waren in der Kultur gestorben. Insgesamt überlebten in der verbleibenden Kultur nur $4,0 \pm 2,4\%$ Plasmazellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt

Somit bestätigte sich im FACS die lichtmikroskopische Beobachtung einer zeitlich begrenzten Bindung kultivierter Plasmazellen an mesenchymale Knochenmarkzellen. Das Ergebnis machte deutlich, dass zunächst einmal nicht-adhärennte Plasmazellen nicht zwingend in diesem Zustand bleiben müssen und umgekehrt. Der Versuch zeigte außerdem, dass mit 59,3% der Großteil der isolierten CD38⁺⁺ Zellen schon innerhalb des ersten Tages der Kokultur starb. Zwischen Tag 1 und Tag 3 der Kokultur blieb die Zahl der detektierten Plasmazellen jedoch konstant. Es zeigte sich, dass die zum frühen Zeitpunkt adhärennte Plasmazellpopulation (Tag 1) innerhalb der folgenden 2 Tage größtenteils starb, während die an Tag 1 nicht-adhärennten Plasmazellen sich später anhefteten und überwiegend überlebten.

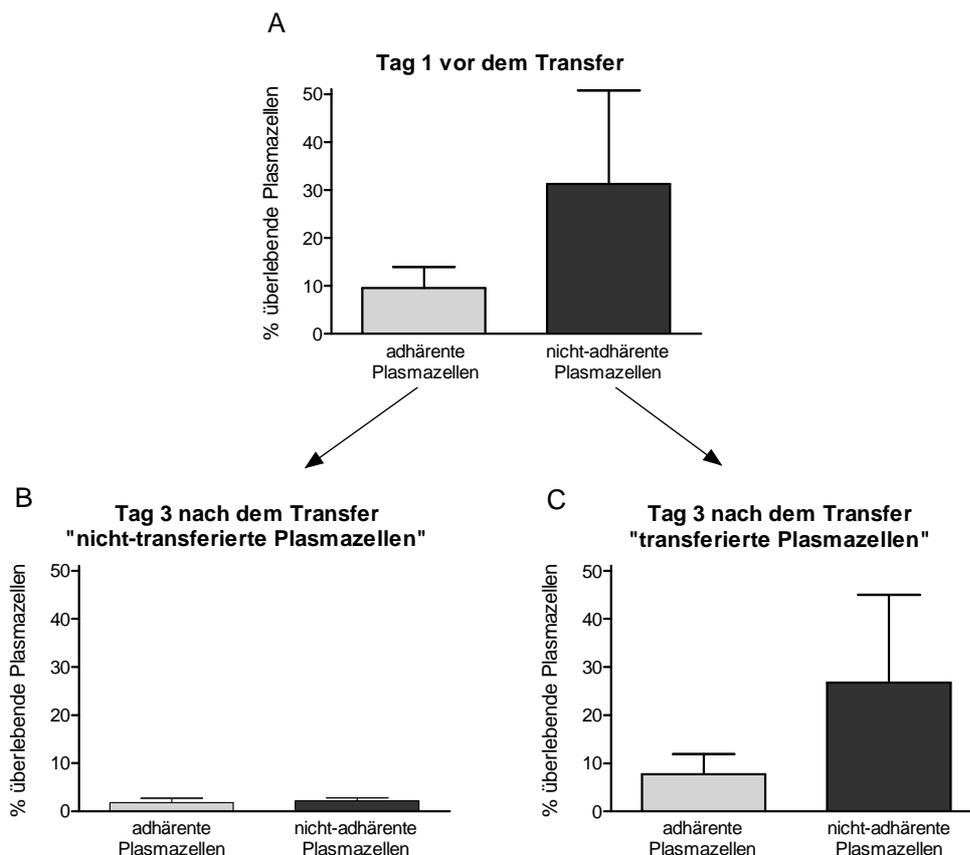


Abb. 11: Bindungsverhalten der Plasmazellen an Tag 3 nach Transfer der nicht-adhärenenten Plasmazellen an Tag 1. (A) spiegelt das Verhältnis von adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen der Kontroll-Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen an Tag 1 wider, bevor der Transfer der nicht-adhärenenten Plasmazellen durchgeführt wurde. (B) stellt die Aufteilung der adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen an Tag 3 dar, die an Tag 0 noch adhärenent waren. (C) zeigt den zeitlich begrenzten Bindungsprozess der transferierten Plasmazellen an Tag 3, die an Tag 1 nicht-adhärenent waren. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus 4 durchgeführten Versuchen.

5.3.2 Einfluss des Bindungsverhaltens auf das Plasmazellüberleben

Aus dem oben beschriebenen Test zur Überprüfung des Bindungsverhaltens wird ersichtlich, dass nicht alle Plasmazellen gleichzeitig an die Stromazellen adhärenierten. In der Langzeit-Kokultur zeigte sich, dass nur ein minimaler Prozentsatz bis zum Tag 29 überlebt. Es ergab sich entsprechend die Frage, ob es einen selektiven Überlebensvorteil entweder für die adhärenente oder die nicht-adhärenente Plasmazellpopulation gibt. Um diese Frage zu beantworten wurde das Überleben beider Fraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten getrennt voneinander durchflusszytometrisch untersucht.

Ausgehend von insgesamt 100% isolierten CD38⁺⁺ Zellen an Tag 0, wurden an Tag 1 der Kokultur im Mittel $9,9 \pm 3,5\%$ adhärierende Plasmazellen gezählt. Bis Tag 3 der Kokultur reduzierte sich deren Häufigkeit auf $4,3 \pm 1,8\%$ und blieb bis zum Tag 7 der Kokultur unverändert bei $4,3 \pm 2,4\%$. Der nächste zu messende Zeitpunkt war wieder Tag 14-15, an dem die Frequenz der überlebenden adhärenen Plasmazellen auf $1,8 \pm 0,9\%$ fiel. Im weiteren Verlauf der Kokultur an Tag 22 und 29 blieb diese Frequenz ungefähr stabil bei $1,7 \pm 1,1\%$ bzw. $1,1 \pm 0,74\%$ (Abb. 12).

Die Häufigkeit der nicht-adhärenen Plasmazellen an Tag 1 betrug durchschnittlich $33,1 \pm 15,6\%$. Dieser Wert verringerte sich bis zum Tag 3 auf $22,2 \pm 3,1\%$ und fiel weiter auf $7,9 \pm 3,4\%$ an Tag 7 der Kokultur. An Tag 14-15 der Kokultur wurden nur noch $3,8 \pm 1,8\%$ lebende nicht-adhärenente Plasmazellen detektiert. Auch an den weiteren Zeitpunkten Tag 22 und 29 der Kokultur sank die Zahl der lebenden Plasmazellen auf $1,6 \pm 0,9\%$ bzw. $0,6 \pm 0,5\%$ weiter (Abb. 12).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse sowohl in der adhärenen als auch in der nicht-adhärenen Fraktion im Verlauf der Kokultur eine Abnahme lebender Plasmazellen. Die Frequenz überlebender Plasmazellen der adhärenen Population war zwischen Tag 3 und Tag 7 sowie von Tag 14 bis Tag 29 weitestgehend konstant. Diesen Befund konnte man bei der nicht-adhärenen Plasmazellpopulation dagegen nicht beobachten, die Detektion lebender Zellen reduzierte sich kontinuierlich.

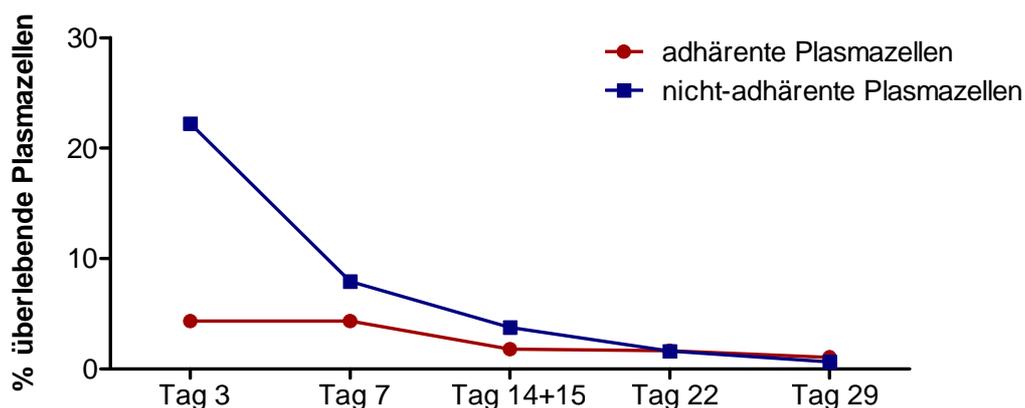


Abb. 12: Frequenz lebender adhärenter und nicht-adhärenter Plasmazellen zwischen Tag 3 und Tag 29. Die Frequenz adhärenter und nicht-adhärenter Plasmazellen in Kokultur-Experimenten mit mesenchymalen Knochenmarkzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die einzelnen Datenpunkte zu den verschiedenen Zeitpunkten spiegeln die berechneten Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wider.

5.4 Einfluss der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen auf die Plasmazellreifung

In einer Studie von Medina et al. (41) wurden Plasmazellen aus verschiedenen Organen hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert und verglichen. Dabei stellten sie eine Heterogenität zwischen Plasmazellen aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark fest, die durch eine zunehmende Reife der Plasmazellen gekennzeichnet ist. In meiner Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die mesenchymalen Stromazellen als Teil des Knochenmarkmilieus in der Lage sind, die Reifung von Plasmablasten aus dem Blut zu unterstützen. Hierzu wurden die isolierten Plasmazellvorläufer an Tag 0 und zu verschiedenen Zeitpunkten in Kokultur auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle mit Hilfe des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensitäten (Geo Mean Fluorescence) durchflusszytometrisch analysiert und verglichen. Zur Beurteilung möglicher Vorteile bzw. Unterschiede zwischen den adhären und nicht-adhären Plasmazellen, in der Fähigkeit zu differenzieren, wurden außerdem beide Fraktionen getrennt voneinander untersucht. Anlehnend an die Literatur wurden für die phänotypische Analyse Moleküle gewählt, von denen eine unterschiedliche Ausprägung auf Blut- und Knochenmarkplasmazellen bekannt ist.

5.4.1 Analyse der CD38 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

Das Glykoprotein CD38, ursprünglich als T10 Antigen von Reinherz et al. 1980 entdeckt (131), wird in hohem Maße auf der Oberfläche von Plasmazellen exprimiert (38, 39). Jedoch scheinen Plasmazellen bzw. Plasmazellvorläufer aus dem Blut oder dem Knochenmark CD38 unterschiedlich stark auszuprägen (42, 130). Plasmazellvorläufer aus dem peripheren Blut, die mit einer Stromazelllinie *in vitro* kokultiviert wurden, regulierten die Expression von CD38 hoch als Zeichen der zunehmenden Reife (96). Aus diesem Grund wurde auch in meiner Kokultur die Expression von CD38 auf Plasmazellen zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen.

Ausgangswert war wie in den vorhergehenden Experimenten Tag 0, an dem die Plasmazellen über die Marker $CD38^{++}/CD19^{+}/CD20^{-}$ identifiziert wurden. In der Abbildung 13 sind zunächst die geometrischen Mittelwerte der CD38 Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Versuche adhärenter Plasmazellen zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. An Tag 0 belief sich der Median der CD38 Expression auf 379,5. Nach 3 Tagen in Kokultur exprimierten die Plasmazellen in einem deutlich höheren Maße CD38: der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen betrug 1070,2. Bei Auswertung der zueinander gehörigen Paare an Tag 0 und 3 mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ergab das einen signifikanten Unterschied (* $p=0,027$). Während

der Kokultur von Tag 3 bis Tag 10 veränderten sich die geometrischen Mittelwerte der CD38 Fluoreszenzen nur minimal (Median: 1090,1), der Anstieg von Tag 0 auf Tag 10 war ebenfalls signifikant (* $p=0,033$). Auch im weiteren Verlauf der Kokultur stieg der Medianwert der CD38 Expression der Plasmazellen auf 1643,3 an Tag 15 und 2242,8 an Tag 29. Aufgrund der geringen Fallzahlen zu diesen Zeitpunkten der Kokultur wurde der gepaarte t-Test zur statistischen Auswertung herangezogen, aber auch hier konnte eine Signifikanz gezeigt werden (* $p=0,013$ bzw. ** $p=0,002$).

Abbildung 13 spiegelt außerdem die geometrischen Mittelwerte der CD38 Fluoreszenzintensitäten nicht-adhärenter Plasmazellen im Zeitraum von Tag 0 bis Tag 29 wider. Im Vergleich zu Tag 0 exprimierten auch die nicht-adhärenenten Plasmazellen an Tag 3 bis 29 der Kokultur CD38 stärker. Der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen stieg von 379,5 an Tag 0 auf 869,7, 537,9, 794,5 auf 622,8, respektive. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p>0,05$).

Diese Daten machen deutlich, dass die CD38 Expression auf der Oberfläche der adhärenenten Plasmazellen im Verlauf der Kokultur signifikant anstieg, bei den nicht-adhärenenten Plasmazellen war das nicht der Fall.

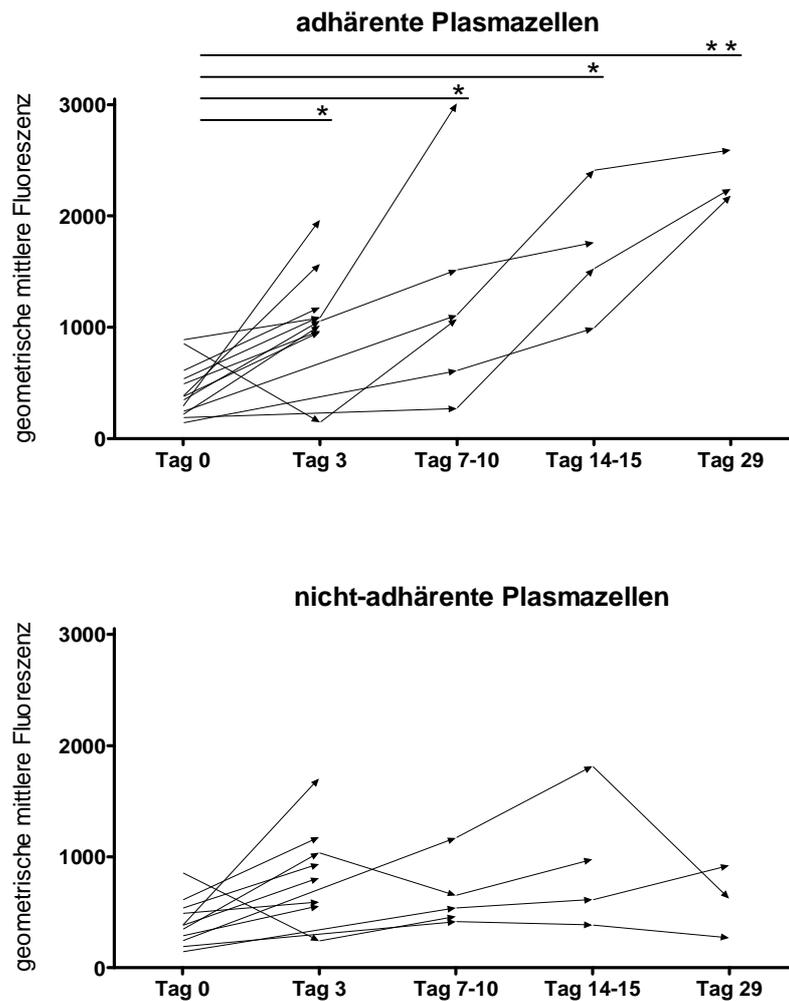


Abb. 13: Vergleich der CD38 Expression auf adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der CD38 Fluoreszenzen von adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5.4.2 Analyse der CD20 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

CD20 ist ein typischer B-Zell Marker, der zwar auf Plasmazellen der Tonsille noch ausgebildet wird, aber auf Plasmazellen im Blut und im Knochenmark nicht mehr anzutreffen ist (41). Somit eignet sich dieses Molekül sehr gut als Isotypkontrolle.

Der Median der geometrischen Mittelwerte der CD20 Fluoreszenzen betrug an Tag 0 5,6 in der FITC-Färbung bzw. 10,4 in der PE-Färbung. In Abhängigkeit von der Reinheit der isolierten CD38⁺⁺ Plasmazellen, war an Tag 0 eine CD20⁺ Population im FACS sichtbar oder nicht. Die

PE-Färbung zeigte während des gesamten Zeitraumes ungefähr konstante Messwerte. Jedoch stieg die CD20 Expression in der FITC-Färbung zu den verschiedenen Zeitpunkten leicht, aber nicht signifikant an. Innerhalb der adhärenen und nicht-adhärenen Fraktion wurden keine Unterschiede in der CD20 Expression gemessen. Abb. 14 spiegelt die Ergebnisse graphisch wider.

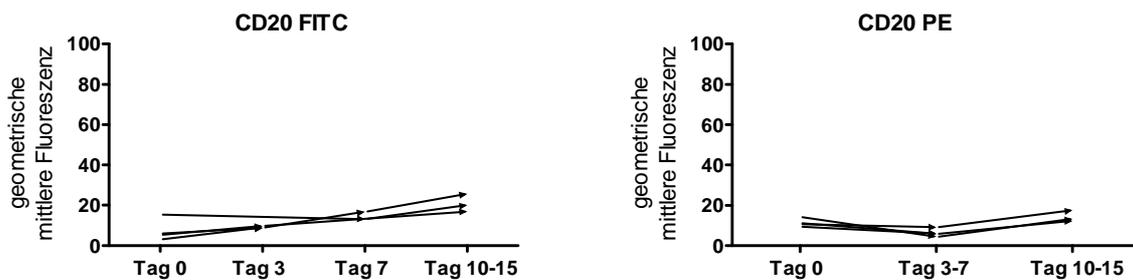


Abb. 14: Vergleich der CD20 Expression in der FITC- und PE- Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten. Abgebildet sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen mittleren Fluoreszenzen der Isotypkontrolle CD20 von adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte.

5.4.3 Analyse der CD138 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

CD138 gilt als Differenzierungsmarker für reife Plasmazellen. Eine viel stärkere Ausprägung von CD138 auf Knochenmarkplasmazellen gegenüber des heterogenen Verteilungsmusters auf Vorläuferzellen aus dem Blut wurde beschrieben (41).

Die Untersuchungen zu CD138 auf CD38⁺⁺ isolierten Zellen an Tag 0 zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. In lediglich 2 von 5 Experimenten konnte eine CD138 positive Population bestimmt werden, die durchschnittlich 17,2% Zellen umfasste. In den anderen 3 Versuchen exprimierte die CD38⁺⁺ Fraktion kein CD138. Auch der weitere Verlauf der Kokultur zeigte kein eindeutiges Bild. Während bei den adhärenen Plasmazellen an allen untersuchten Zeitpunkten zwischen Tag 1 und Tag 7 kein CD138 an der Oberfläche zu färben war, exprimierten die nicht-adhärenen Plasmazellen an den gleichen Zeitpunkten zumindest teilweise das Molekül: an Tag 1 waren durchschnittlich 33,5% der nicht-adhärenen Plasmazellen positiv für CD138, an Tag 2 und 3 war die gesamte Population negativ und an Tag 4 wurden wieder 86,5% positiv gefärbt (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse machen es schwierig, die CD138 Expression in Kokultur zu beurteilen. Der Grund dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist womöglich methodischen Ursprungs und soll später diskutiert werden.

5.4.4 Analyse der CD95 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

Während der Apoptose vermittelnde Rezeptor CD95 (132) in geringem Maße auf CD38⁺⁺ Plasmazellvorläufern der Tonsille und im Blut zu finden ist, fehlt er fast vollständig auf reifen Plasmazellen im Knochenmark (41).

Die CD38⁺⁺ Zellen aus dem peripheren Blut waren für den Marker CD95 an Tag 0 schwach positiv. Der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen betrug 38,0. Nach 3 Tagen in Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen war ein Anstieg der CD95 Expression auf 77,0 zu beobachten (Abb. 15), jedoch war dieser nicht signifikant ($p=0,054$). Eine Aussage über die Fraktionen der adhärennten und nicht-adhärennten Plasmazellen war aufgrund zu geringer Fallzahlen (1 Versuch) nicht möglich.

Zusammenfassend konnte die Analyse der CD95 Expression keine Veränderung der Blutplasmazellen in Richtung Knochenmarkplasmazellen zeigen.

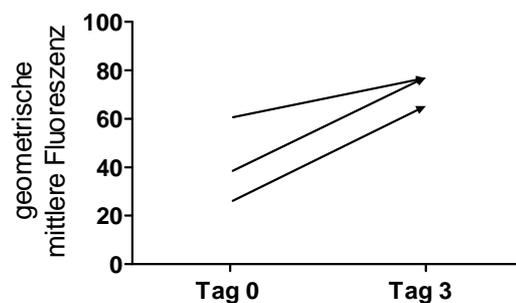


Abb. 15: Vergleich der CD95 Expression auf Plasmazellen an Tag 0 und Tag 3. Dargestellt sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der CD95 Fluoreszenzen von Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 3 unterschiedlichen Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte.

5.4.5 Analyse der CD19 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

Das Molekül CD19 wird auf allen Plasmazellvorläufern in der Tonsille und im Blut ausgeprägt, aber nur die Hälfte der Knochenmarkplasmazellen exprimiert diesen Marker auf ihrer Oberfläche (41).

An Tag 0 waren 100% der CD38⁺⁺ Zellen auch CD19⁺ und der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen betrug 164,9. Betrachtet man die CD19 Expression der adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen nach 3 Tagen in Kokultur, so war jeweils ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensitäten auf 213,5 bzw. 235,2 zu verzeichnen (*p=0,045 bzw. *p=0,047 bei 5 Versuchen). Die Ergebnisse sind Abb. 16 graphisch dargestellt. In Bezug auf das Molekül CD19 spiegelt der Phänotyp der Plasmazellen in Kokultur nicht den von Knochenmarkplasmazellen wider.

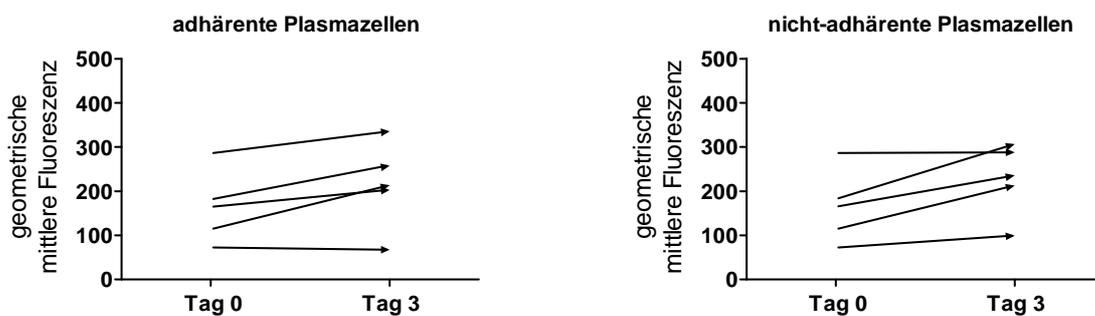


Abb. 16: Vergleich der CD19 Expression auf adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen an Tag 0 und Tag 3. Abgebildet sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der CD19 Fluoreszenzen von adhärenen und nicht-adhärenen Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 5 unterschiedlichen Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte.

5.4.6 Analyse der HLA-DR Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

Die Herunterregulierung des antigen-präsentierenden Rezeptors HLA-DR (MHC II) auf der Oberfläche ist charakteristisch für reife Plasmazellen (37, 64). Einige Arbeiten zeigten zudem eine unterschiedliche HLA-DR Ausprägung auf der Oberfläche von Plasmazellen und ihren Vorläufern in der Tonsille, im peripheren Blut oder im Knochenmark (41, 43, 63).

Die an Tag 0 isolierten CD38⁺⁺ Plasmazellen zeigten ein heterogenes Bild bezüglich HLA-DR. Durchschnittlich $17,2 \pm 5,5\%$ der CD38⁺⁺ Zellen exprimierten kein HLA-DR an ihrer Oberfläche.

Die $82,8 \pm 5,5\%$ positiv gefärbten Plasmazellen wiesen einen Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen von 145,0 auf, wobei es schwierig war, distinkte Populationen von einander abzugrenzen. Nach drei Tagen in Kokultur war im FACS kaum noch eine HLA-DR negative Population zu sehen, sie reduzierte sich signifikant auf durchschnittlich $8,0 \pm 3,8\%$. Der Median der geometrischen mittleren HLA-DR Fluoreszenzintensitäten der positiven Fraktion änderte sich von Tag 0 zu Tag 3 und Tag 7 nicht signifikant (145,0 an Tag 0 zu 115,8 in der Zeit von Tag 3 bis Tag 7 ($p=0,139$)). Aufgrund der geringen Probenzahlen wurden bei der Auswertung Tag 3 und Tag 7 zu einem Zeitpunkt zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.

Eine Unterscheidung zwischen adhärennten und nicht-adhärennten Plasmazellen wurde für den Rezeptor HLA-DR nur in 2 Versuchen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hier verhielten sich beide Fraktionen ähnlich, jedoch ist aufgrund der geringen Versuchszahl ein aussagekräftigeres Ergebnis nicht möglich.

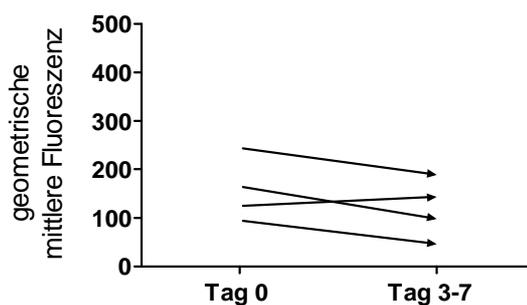


Abb. 17: Vergleich der HLA-DR Expression auf Plasmazellen an Tag 0 und Tag 3-7. Dargestellt sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der HLA-DR Fluoreszenzen von Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 4 voneinander unabhängigen Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte.

5.4.7 Analyse der CCR2 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

Im Rahmen der Plasmazellentwicklung wird PAX5, ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die B-Zellfunktion, von BLIMP1 unterdrückt (27). Die PAX5-Unterdrückung hat die Reaktivierung verschiedener Gene in Plasmazellen zur Folge. Dazu gehört der Chemokinrezeptor CCR2, welcher für eine normale Plasmazellfunktion von Bedeutung ist (30).

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 auf den isolierten Plasmablasten an Tag 0 war heterogen. Während im Mittel $16,4 \pm 8,3\%$ der $CD38^{++}$ Zellen CCR2 auf der Oberfläche exprimierten, waren $83,6 \pm 8,3\%$ negativ. Dieses Verhältnis blieb an den Tagen 3 und 7 der Kokultur mit jeweils durchschnittlich $21,7 \pm 6,5\%$ $CCR2^{+}$ Plasmazellen ungefähr gleich. Die geometrische mittlere Fluoreszenz verhielt sich im Verlauf der Kokultur ebenfalls konstant. Ein Unterschied zwischen den adhärennten und nicht-adhärennten Zellen wurde nicht festgestellt.

Auffällig war die Beobachtung, dass die $CCR2^{+}$ Population das Molekül CD38 stärker an ihrer Oberfläche exprimierte als die $CCR2^{-}$ Fraktion. Der Median der geometrischen mittleren CD38 Fluoreszenzen der $CCR2^{+}$ Plasmazellen betrug an Tag 0 1215,6 gegenüber 744,8 bei der $CCR2^{-}$ Population ($p=0,078$). Die Differenz beider Populationen hinsichtlich der CD38 Expression vergrößerte sich an Tag 3 bis Tag 7 sowohl bei den adhärennten als auch bei nicht-adhärennten Plasmazellen in Kokultur signifikant (Abb. 18). Der Unterschied zwischen der $CCR2^{+}$ - und $CCR2^{-}$ Population belief sich bei den adhärennten Plasmazellen auf 1717,9 bzw. 762,1 ($*p=0,045$) sowie bei den nicht-adhärennten Plasmablasten auf 1995,8 bzw. 762,1 ($*p=0,047$).

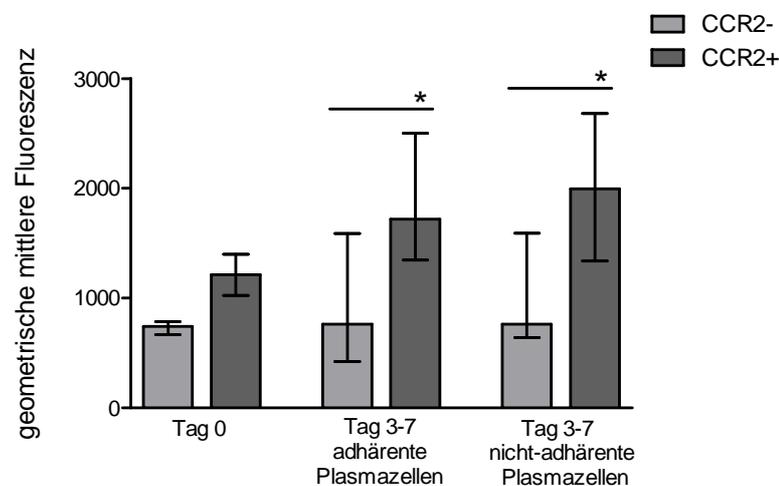


Abb. 18: Vergleich der CD38 Expression der $CCR2^{+}$ - und $CCR2^{-}$ Plasmazellpopulation. Dargestellt sind die Mediane der durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen mittleren CD38 Fluoreszenzen von $CCR2^{+}$ Plasmazellen (dunkelgrau) und $CCR2^{-}$ Plasmazellen (hellgrau) während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Balken repräsentieren die Mediane mit den dazugehörigen Spannweiten aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. $*p<0,05$

5.4.8 Analyse der CD31 Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

CD31 (PECAM-1) ist ein Adhäsionsmolekül, das auf Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten anzutreffen ist (133). Es wurde beobachtet, dass Plasmazellen aus dem Knochenmark CD31 stärker exprimieren als Blutplasmazellen (41).

Die CD38⁺⁺ Zellen aus dem peripheren Blut zeigten an Tag 0 eine heterogene Expression für CD31. Durchschnittlich $62,5 \pm 8,8\%$ der Blutplasmazellen exprimierten CD31 auf ihrer Oberfläche, $37,5 \pm 8,8\%$ waren negativ für diesen Marker. Der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen der positiven Population betrug 144,8. Während der Kokultur mit den Stromazellen wurde bereits nach 3 Tagen sowohl in der adhärennten als auch in der nicht-adhärennten CD38⁺⁺ Fraktion keine negative CD31 Population mehr im FACS detektiert, sondern 98,0% bzw. 99,0% der Plasmazellen waren positiv für den Marker. Bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt Tag 29 veränderte sich dieses Bild nicht (Daten nicht gezeigt, 2 Versuche). Beide Plasmazell-Fraktionen, die adhärennten sowie die nicht-adhärennten, regulierten die CD31 Expression im Verlauf der Kokultur hoch. An Tag 7 stieg der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen bei den adhärennten Plasmazellen auf 697,4 ($p=0,090$) und an Tag 15 signifikant auf 874,7 (** $p=0,006$). Bei den nicht-adhärennten zeigte sich jeweils ein signifikanter Anstieg auf 895,0 an Tag 7 (* $p=0,026$) und 1093,0 an Tag 15 (* $p=0,016$). Aufgrund der geringen Probenzahlen wurden bei der Auswertung mit Hilfe des gepaarten t-Tests Tag 3 und Tag 7 sowie Tag 14 bis 15 zu einem Zeitpunkt zusammengefasst.

In diesem Vergleich verhielten sich die adhärennten und nicht-adhärennten Plasmazellen in Kokultur ähnlich, beide Fraktionen regulierten CD31 auf ihrer Oberfläche hoch (Abb. 19).

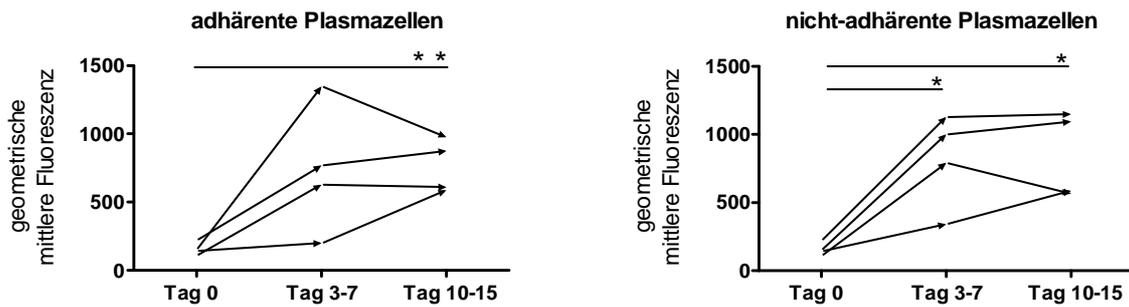


Abb. 19: Vergleich der CD31 Expression auf adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der CD31 Fluoreszenzen von adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

5.4.9 Analyse der CD62L Expression auf Plasmazellen im Verlauf der Kokultur

CD62L (L-Selektin) ist ein Adhäsionsmolekül, das für die Migration von Leukozyten in das sekundäre lymphatische Gewebe verantwortlich ist (134). Medina et al. beobachteten, dass einzig Plasmazellen aus dem peripheren Blut nach Tetanus-Immunisierung CD62L auf ihrer Oberfläche ausprägten, hingegen fehlte das Molekül auf Knochenmarkplasmazellen (41).

Die FACS-Analyse der $CD38^{++}$ Zellen aus dem peripheren Blut an Tag 0 ergab, dass die Mehrheit kein CD62L exprimierte, sondern nur durchschnittlich $6,6 \pm 3,2\%$ der Zellen für das Adhäsionsmolekül positiv waren. Dabei belief sich der Median aller geometrischen mittleren Fluoreszenzintensitäten der gesamten Population auf 16,8 an Tag 0. Bezug nehmend auf die adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen in Kokultur mit den stromalen Knochenmarkzellen konnte eine signifikant unterschiedliche CD62L Expression im Verlauf beobachtet werden. Während die adhärenente Zellfraktion auch zu späteren Zeitpunkten den Marker nicht exprimierte (der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensitäten betrug zwischen dem 3. und 7. Kokulturtag 21,3), regulierten die nicht-adhärenenten Plasmazellen CD62L signifikant hoch. Der Median der geometrischen mittleren Fluoreszenzen erhöhte sich auf 89,9 an Tag 3 bis Tag 7 (* $p = 0,039$).

Aufgrund der geringen Probenzahlen wurden bei der Auswertung Tag 3 und Tag 7 zu einem Zeitpunkt zusammengefasst. Abb. 20 spiegelt die Ergebnisse graphisch wider.

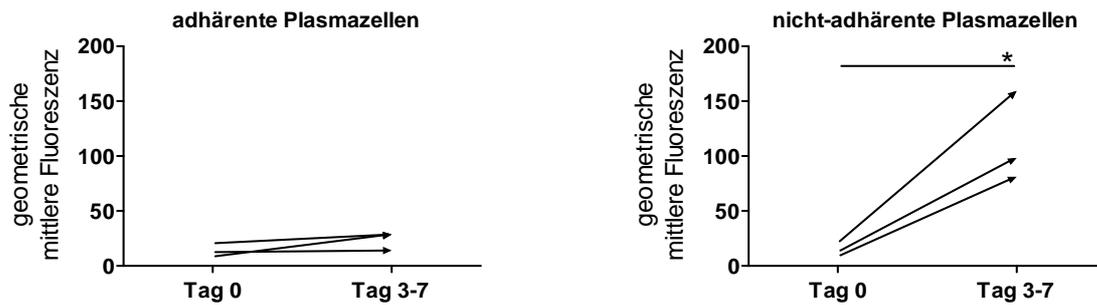


Abb. 20: Vergleich der CD62L Expression der adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen an Tag 0 und Tag 3-7. Dargestellt sind die durchflusszytometrisch bestimmten geometrischen Mittelwerte der CD62L Fluoreszenzen von adhärenenten und nicht-adhärenenten Plasmazellen während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen in 3 voneinander unabhängigen Versuchen. Jeder Pfeil zeigt die Veränderung in einem Experiment über mehrere Zeitpunkte. * $p < 0,05$

6 Diskussion

6.1 Einleitung

In Rahmen dieser Arbeit ist es mir gelungen, ein *in vitro* Modell zur Kokultur von humanen Plasmazellen und humanen mesenchymalen stromalen Knochenmarkzellen zu etablieren. Die Bezeichnung mesenchymale stromale Knochenmarkzelle wurde in Anlehnung an die „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) gewählt (119). Bisherige Untersuchungen zwischen diesen beiden Zelltypen wurden hier auf Einzelzellebene weitergeführt. Die Ergebnisse meiner Studie bestätigen, dass Knochenmarkstromazellen in der Lage sind, Plasmazellen über einen längeren Zeitraum am Leben zu erhalten. Die Arbeit zeigte außerdem den Einfluss mesenchymaler Knochenmarkzellen auf die Differenzierung von Plasmazellvorläufern zur terminalen Plasmazelle im Durchflusszytometer.

Die Hälfte der Antikörper-sezernierenden Zellen aus dem peripheren Blut sind vermutlich Plasmablasten, d.h. unmittelbare Plasmazellvorläufer (41, 43, 52, 130). Mit Hilfe entsprechender Chemokinrezeptoren migrieren sie zu ihren Zielorganen, wie z.B. dem Knochenmark (48). Das Knochenmark stellt mit seiner spezifischen Umgebung Nischen bereit, welche die terminale Differenzierung und das Überleben von Plasmazellen unterstützen (63, 66, 126). Hier ansässige Plasmazellen sind für den protektiven und lang anhaltenden spezifischen Antikörpertiter verantwortlich (64) und unterscheiden sich von Blutplasmazellen hinsichtlich ihrer Teilungsfähigkeit und Ausprägung bestimmter Oberflächenmoleküle (41, 43). Mesenchymale Stromazellen sind durch die Bildung und Bereitstellung verschiedener Wachstumsfaktoren sowie Zellkontakt-abhängigen Signalen ein entscheidendes Element des Knochenmarkmilieus (81, 96) und somit potentieller Bestandteil der Plasmazellnische.

6.2 Diskussion der Methodik

6.2.1 Auswahl der Zellen

In der Vergangenheit sind bereits einige Studien zur Homöostase muriner Plasmazellen sowohl in Kultur als auch *in vivo* durchgeführt worden (55, 62, 64, 76, 82, 126). Aufbauend auf diesen Daten war mein Ziel hingegen, die Biologie der normalen Plasmazelle in einem Kultursystem

mit humanen Zellen zu untersuchen. Der Grund dieser Wahl lag in der Möglichkeit ein Testsystem zu etablieren, welches potentiell für Patientenmaterial einsetzbar ist. Ein Nachteil dieser Methode war allerdings die Tatsache, dass man aus ethischen Gründen bei der Generierung humaner Zellen an Grenzen stößt.

Während der Einfluss von Knochenmarkstromazellen auf die Hämatopoese, insbesondere der B-Lymphopoese, ausführlich untersucht wurde, gibt es nur wenige Studien über Plasmazellen oder ihren unmittelbaren Vorläufern in Kokultur mit mesenchymalen Stromazellen (81, 95, 96).

Zunächst stellte sich die Frage, aus welchem menschlichen Organ die Plasmazellen isoliert werden sollen, um sie mit den mesenchymalen Knochenmarkszellen zu kultivieren. Die Mehrheit der in den sekundären lymphatischen Organen gebildeten Plasmablasten entwickelt sich lokal zur Plasmazelle und stirbt dort innerhalb weniger Tage den programmierten Zelltod (18). Im Blut zirkulierende Plasmazellen sind potentielle Vorläufer langlebiger Knochenmarkplasmazellen (48, 127). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit CD38⁺⁺ Zellen aus dem Blut entnommen, um deren Interaktion mit mesenchymalen Knochenmarkstromazellen zu untersuchen. Die Schwierigkeit in der Isolation und Analyse von Plasmablasten bzw. Plasmazellen aus dem peripheren Blut liegt darin, dass deren Anteil an den gesamten mononukleären Zellen nur zwischen 0,01 und 0,1% liegt (41, 52, 96, 128). Das spiegelt sich in der geringen Zahl bisheriger Untersuchungen dieses Zelltyps wider. Verschiedene *in vitro* Modelle zur Generierung und Differenzierung von Plasmazellen wurden in der Vergangenheit entwickelt, um diese Problematik zu umgehen (129, 135, 136). Jedoch haben diese den Nachteil, dass keine einheitliche Zellpopulation entsteht (44) und dass die *in vitro* Systeme nicht den physiologischen Bedingungen im Organismus entsprechen. Andere Studien wichen bisher oft auf Material von Patienten mit Multiplem Myelom aus, in deren Blut eine viel höhere Zahl an malignen Plasmazellen zu finden ist. Jeco et al. (44) nutzten ein alternatives Modell, in dem sie den Phänotyp von Plasmablasten und Plasmazellen in Patienten mit reaktiver Plasmozytose charakterisierten. Diese Anhäufung von polyklonalen Plasmazellen entsteht bei verschiedenen Infektionen oder Neoplasien (44). Somit kann man auch hier nicht unbedingt von physiologischen Voraussetzungen ausgehen. Um dennoch mit ausreichenden Mengen gesunden Materials *ex vivo* arbeiten zu können, wurden für diese Arbeit Plasmazellen aus Blutproben mit Hilfe eines „Plasmazell-Isolations-Kit“ präpariert, das auf dem Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht und die Expression von CD38 auf Plasmazellen und deren Vorläufern ausnutzt. Diese Trennmethode bringt eine reine Population CD38⁺⁺ Zellen hervor und erleichtert die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung. Der Vorteil gegenüber einer FACS-

Sortierung ist die geringere Beanspruchung bzw. Schädigung der empfindlichen Plasmazellen, bevor sie in Kokultur gegeben werden.

Eine weitere von mir in Betracht gezogene Möglichkeit war, Antigen-spezifische Plasmablasten zu isolieren, die nach einer sekundären Immunisierung (z.B. Tetanus) gebildet werden und dann ein paar Tage später im Blut detektierbar sind (41, 52, 137). Der Vorteil dieser Methode ist der direkte Nachweis Antikörper-sezernierender Zellen einer Spezifität, deren Frequenz im Blut 6-7 Tage nach der Auffrischimpfung im Vergleich zu davor stark ansteigt (41, 52). Auch diese Zellen stellen potentielle Vorläufer solcher Plasmazellen dar, die im Knochenmark für eine lange Zeit residieren können. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine vergleichenden Immunisierungsversuche durchgeführt werden, jedoch sollte dieses Modell bei fortführenden Kokultur-Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden.

Um möglichst nahe an der physiologischen *in vivo* Situation im menschlichen Knochenmark zu arbeiten, wurden primäre mesenchymale Knochenmarkzellen generiert anstatt eine Stromazelllinie (96) für die Kokultur zu verwenden. Dies ist insbesondere auch notwendig, da Stromazelllinien einen verminderten Kontakt-induzierten Zellzyklusarrest aufweisen.

6.2.2 Isolierung und Identifizierung von Plasmablasten und Plasmazellen im Durchflusszytometer

Isolierung

Für die Isolierung von Plasmazellen ist die starke Ausprägung des Moleküls CD38 an der Oberfläche kennzeichnend (39). Da aber auch andere Zellen CD38 exprimieren, wurden zunächst alle „Nicht-Plasmazellen“ aus dem Blut mittels MACS depletiert und danach die CD38⁺⁺ Population angereichert.

Identifizierung

Die FACS-Analyse bestimmter Zellpopulationen ist eine sehr sensitive Methode, da Zellen auf Einzelzellebene charakterisiert werden können. In Anlehnung an die Literatur konnten Plasmazellen und ihre Vorläufer nach ihrer Isolierung durchflusszytometrisch über die Expression von CD19⁺/CD38⁺⁺/CD20⁻ identifiziert werden (41, 96, 129, 130). In bisherigen Kokultur-Experimenten zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkstromazellen wurde diese Methode nur ansatzweise genutzt (96), weshalb in dieser Arbeit erstmalig das Überleben und die Differenzierung von Plasmazellen innerhalb einer Kokultur auf

Einzelzellebene im FACS untersucht wurde. Die Analyse am Durchflusszytometer, Typ LSR II, erlaubte den Ausschluss von toten Zellen, die Einordnung der Zellgröße und -granularität über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie die Messung von weiteren vier Parametern gleichzeitig. Wie im oberen Punkt schon erläutert, ist die Zahl der Plasmablasten und Plasmazellen im Blut begrenzt. Eine gute qualitative Aussage über phänotypische Eigenschaften von Zellen ist jedoch nur dann möglich, wenn eine gewisse Mindestzellzahl im FACS analysiert wird. Um dieser Voraussetzung gerecht zu werden, konnte nur eine Auswahl verschiedener Moleküle untersucht werden, die anlehnend an die Literatur als relevant angesehen wurden. Zu Beginn der Kokultur wurden je Ansatz durchschnittlich 4000 analysierte Plasmazellen eingesetzt bzw. durchflusszytometrisch analysiert. Da im weiteren Verlauf der Kokultur nur ein geringer Teil an Plasmazellen überlebte, verringerte sich die Zahl der aufgenommenen Events, so dass an Tag 29 teilweise nur 30 bis 240 Plasmazellen in jeder Probe ausgewertet werden konnten. Diese geringe Anzahl an Events erschwerte natürlich eine wissenschaftlich korrekte Beurteilung der Ergebnisse und war somit als kritisch zu bewerten. Mit dieser geringen Zellzahl wurde eine Grenze erreicht, die statistisch relevante Ergebnisse gerade noch zulässt. Aber auch bei dieser niedrigen Zellzahl war eine Population zu verzeichnen, weshalb die Ergebnisse mit in die Arbeit eingebracht wurden. Bei der Planung von Folgeexperimenten sollte darauf geachtet werden, dass die Ausgangspopulation nicht geringer ausfällt, insbesondere wenn mit Patientenmaterial gearbeitet wird.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Mesenchymale stromale Knochenmarkzellen sind eine homogene nicht-hämatopoetische Zellpopulation

In der Literatur gibt es keine einheitliche Meinung darüber, ob die isolierten mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark eine homogene (97, 114) oder heterogene (108, 115) Population darstellen.

Zur Klärung dieser Frage wurden die in dieser Arbeit verwendeten Knochenmarkstromazellen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die untersuchten stromalen Zellen hatten lichtmikroskopisch einen einheitlichen spindelförmigen (fibroblastenartigen) Phänotyp. Auch die FACS-Analyse spiegelte einen homogenen Zelltyp wider. Für die Oberflächenmoleküle CD9, CD29, CD44 und CD106 (VCAM-1) konnte eine gleichmäßig positive Expression gezeigt werden. Sowohl die hämatopoetischen Moleküle CD11a, CD14 und

CD45 als auch der Plasmazellmarker CD38 wurden nicht nachgewiesen, so dass Verunreinigungen durch hämatopoetische Zellen ausgeschlossen werden konnten. Die zusätzlich untersuchten Oberflächenmoleküle CD10, CD31, VLA-4 sowie die Fc γ -Moleküle CD16, CD32 und CD64 wurden von den Knochenmarkstromazellen einheitlich nicht ausgeprägt.

Bezüglich der untersuchten Kriterien handelte es sich bei den an Plastik haftenden mesenchymalen Zellen um eine homogene Population, was mit bisherigen FACS-Charakterisierungen dieser *in vitro* Langzeitkulturen einhergeht (84, 97, 138). Allerdings schließen meine Analysen nicht aus, dass eine Heterogenität bezüglich anderer Oberflächenmoleküle oder weiterer Parameter wie z.B. Zytokinproduktion besteht, die hier nicht getestet wurden.

Während der Kokultur mit Plasmazellen und ihren Vorläufern aus dem peripheren Blut wäre es natürlich denkbar, dass durch Interaktionen zwischen beiden Zellarten nicht nur eine Reifung der Plasmazellen, sondern auch eine Differenzierung der mesenchymalen Zellpopulation in einen veränderten Phänotyp stattfindet (139). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben allerdings keinen Hinweis darauf, dass sich die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle veränderte und sich Subpopulationen entwickelten (Daten nicht gezeigt). Da das Hauptinteresse dieser Arbeit in den Plasmazellen lag, erschwerte die dementsprechend gewählte FACS-Einstellung eine Beurteilung der mesenchymalen Stromazellen in Kokultur.

6.3.2 Mesenchymale Knochenmarkzellen unterstützen das Plasmazellüberleben

In dieser Arbeit wurde meines Wissens erstmalig in einem humanen *in vitro* System auf Einzelzellebene gezeigt, dass ein Teil der Plasmazellen und ihren Vorläufern aus dem peripheren Blut in Kokultur mit primären mesenchymalen Knochenmarkstromazellen länger als drei Tage überleben kann.

Der Einfluss von stromalen Knochenmarkzellen auf Überleben und Differenzierung von humanen Plasmazellvorläufern aus dem peripheren Blut wurde bereits 1995 von Kawano et al. (96) grob untersucht. Jedoch verwendeten sie eine vom Knochenmark abstammende Stromazelllinie und keine primären mesenchymalen Zellen. Nach 2 Tagen in Kokultur mit der Stromazelllinie war zwar im Gegensatz zu den allein ausgesäten Zellen eine überlebende CD38⁺⁺/CD19⁺ Zellpopulation im FACS nachweisbar, allerdings wurde diese von den Autoren nicht quantifiziert.

Auch Merville und seine Mitarbeiter (95) führten humane Kokultorexperimente durch, um die Regulierung der Plasmazell-Lebensdauer zu erforschen. Sie isolierten $CD38^{++}/CD20^{-}$ Zellen aus der Tonsille und kultivierten sie unter anderem in normalem Medium, mit stromalen Knochenmarkzellen und rheumatoiden Synoviozyten. Bereits nach 12 Stunden waren nur noch 16,3% der in Medium allein kultivierten Plasmazellen mittels Trypan Blau-Färbung nachweisbar. Die Knochenmarkstromazellen und rheumatoiden Synoviozyten konnten dagegen 82,7% bzw. 63,4% der ursprünglich hinzu gegebenen $CD38^{++}/CD20^{-}$ Zellen für 12 Stunden am Leben erhalten.

Diese Versuche gaben erste Hinweise darauf, dass mesenchymale Knochenmarkzellen einen positiven Einfluss auf das Plasmazellüberleben haben. Die oben beschriebenen Messzeitpunkte sind jedoch sehr früh, um eine wirkliche Aussage treffen zu können, ob Knochenmarkstromazellen die Langlebigkeit von Plasmazellen unterstützen.

Einen ersten Schritt in diese Richtung unternahmen Minges Wols (81), indem sie in einem Mausmodell das Überleben von Plasmazellen nach 14 Tagen in Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen überprüften. Hierzu wurden murine Antikörper-sezernierende Zellen aus Lymphknoten und Knochenmark entnommen. Lebende kokultivierte Plasmazellen wurden mikroskopisch anhand der immunhistologischen Anfärbung der leichten Kette der produzierten Antikörper identifiziert, zusätzlich wurden IgG1 sezernierende Plasmazellen im ELISpot quantifiziert. Die Ergebnisse der murinen Studie sind vergleichbar mit denen der vorliegenden Arbeit: im Beisein der stromalen Knochenmarkzellen überlebten an Tag 3 des Maussystems noch 35,8% der isolierten Plasmazellen, in dieser Arbeit waren es im Mittel $29,6 \pm 4,1\%$. Allein kultivierte Plasmazellen waren in beiden Studien unabhängig von deren Herkunft an Tag 3 kaum noch nachweisbar. Übereinstimmende Werte zeigten sich ebenfalls an Tag 7 der Kokultur, an dem im murinen System 13,1% bzw. im humanen System $12,3 \pm 5,7\%$ der Plasmazellen detektierbar waren. Auch an Tag 14 waren ähnliche Ergebnisse zu beobachten. Bei Minges Wols reduzierte sich die Zahl der lebenden Zellen auf 2,4%, in der vorliegenden Untersuchung waren es $5,6\% \pm 2,4\%$. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun der nächste Schritt zur Überprüfung der Langlebigkeit von Plasmazellen vollzogen, indem die Kokultur auf 29 Tage ($1,7\% \pm 1,2\%$ lebende Plasmazellen) verlängert wurde, was bisher noch nicht demonstriert wurde.

Meine Ergebnisse zeigen, dass mesenchymale stromale Knochenmarkzellen einen kleinen Teil der $CD38^{++}$ Plasmazellen aus dem peripheren Blut am Leben halten konnten. Im Gegensatz dazu starben die in Medium allein kultivierten Blutplasmazellen sehr schnell, was für eine extrinsische

Beeinflussung der Lebensspanne von Plasmazellen spricht (47). Betrachtet man den Verlauf der Überlebensfrequenzen von CD38⁺⁺ Zellen, die mit mesenchymalen Knochenmarkstromazellen kokultiviert wurden, so wird deutlich, dass diese kontinuierlich abnahmen. Allerdings konnte ein kleiner Prozentsatz (1,7%) an überlebenden Plasmazellen bis Tag 29 nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um etwaige langlebige Plasmazellen handelt, die *in vivo* im Knochenmark residieren oder möglicherweise um eine kleine Population proliferierender Plasmablasten. Andererseits könnten die kontinuierlich sinkenden Überlebensfrequenzen auch einen stochastischen Prozess widerspiegeln. Da die Teilungsfähigkeit der Zellen in dieser Arbeit nicht gemessen wurde, ist der Aspekt der Proliferation von Plasmablasten nicht eindeutig auszuschließen. Für langlebige Plasmazellen spricht jedoch die physiologische Tatsache, dass die Kapazität des Knochenmarks für langlebige Plasmazellen bei einer Frequenz von 0,1-1% aller mononukleären Zellen limitiert scheint (42, 45). Gestützt wird diese Theorie von den Resultaten unserer Arbeitsgruppe an der Maus, bei denen im Verlauf einer Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin nur etwa 10% der gebildeten Plasmazellen im Knochenmark langlebig wurde, wobei die Gesamtfrequenz aller Plasmazellen mit etwa 1% unverändert blieb (54). Vereinbar mit der Vermutung, dass mesenchymale Stromazellen einer Subpopulation von Plasmazellen einen Überlebensraum verschaffen, ist die Tatsache, dass die hier generierten Knochenmarkstromazellen wichtige, aus bisherigen Studien mit ähnlichen Protokollen zur Stromazellgenerierung bekannte, lösliche Plasmazell-Überlebensfaktoren produzieren (55, 81, 86). Dazu gehören IL-6, IL-5, TNF- α , und CXCL12. Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass diese Zytokine aus meinen Kulturüberständen von einer anderen Arbeitsgruppe gemessen wurden, die sich intensiv mit dem Mikromilieu von humanen Knochenmarkstromazellen beschäftigt (140).

Um zu überprüfen, ob einzig lösliche Faktoren mesenchymaler Zellen für das Überleben von Plasmazellen verantwortlich sind, wiederholten Kawano et al. den Kokulturversuch nur mit dem Überstand der adhärensten Stromazelllinie. In diesen Kulturen zeigte sich ein annähernd gleicher Effekt, wobei in dieser Studie keine quantitative Analyse erfolgte (96). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Punkt aufgegriffen und die Blutplasmazellen für drei Tage mit dem Überstand der primären Knochenmarkstromazellen kultiviert. Wie schon bei Kawano zeigte sich, dass auch der Überstand allein einen Teil der isolierten Plasmazellen am Leben erhalten konnte. Im Vergleich zu der adhärensten Stromazellkultur waren es quantitativ aber nur $17,0\% \pm 3,1\%$ (Daten nicht gezeigt), also 12,6% weniger, so dass neben den löslichen Produkten zusätzlich Zellkontakt-vermittelte Interaktionen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Da die Versuche

bezüglich der Kokultur mit dem Stromazellüberstand für eine statistische Analyse leider nicht ausreichend oft wiederholt wurden (2 Versuche), sollte dies in Folgeuntersuchungen weitergeführt werden.

Wie im Punkt 6.3.1 aufgeführt, exprimieren die hier verwendeten mesenchymalen Stromazellen zudem essentielle Adhäsionsmoleküle wie z.B. VCAM-1 und Fibronectin, über welche überlebensfördernde Interaktionen via VLA-4 auf Plasmazellen beschrieben wurden (81).

Die Existenz mehrerer Nischen im Knochenmark, welche die Homöostase verschiedener Zelltypen u.a. hämatopoetischer Zellen und Stammzellen regulieren, ist allgemein anerkannt (9, 141). Der zelluläre und molekulare Aufbau von Plasmazellnischen ist bislang nicht genau bekannt (5, 82, 83, 126). Zu den bekannten überlebensfördernden Bestandteilen zählen mesenchymale Stromazellen und lösliche Faktoren wie IL-6 und IL-5, TNF- α , CD44 Liganden, CXCL12 und APRIL (55, 81, 98).

Insgesamt betrachtet starb im Rahmen meiner Studie die Mehrheit der Plasmazellen trotz nachweislich vorhandener löslicher Überlebensfaktoren und Zellkontakt-vermittelter Signale seitens der mesenchymalen Stromazellkultur. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe:

1. In der Annahme, dass alle isolierten CD38⁺⁺ Plasmazellen von Beginn an identische Bedingungen und somit gleiche Überlebenschancen in der Kokultur vorfanden, die Mehrzahl dieser Zellen aber starb, ist zusätzlich eine intrinsische Kompetenz für das Überleben von Plasmazellen denkbar (5). Dies könnte bedeuten, dass die Mehrheit der in der vorliegenden Studie verwendeten CD38⁺⁺ Plasmazellen von vornherein nicht das Potential besessen hat, in der Kokultur zu überleben. Daraufhin stellt sich die nächste Frage: Plasmazellen welcher Abstammung besitzen die Fähigkeit, sich zu langlebigen Plasmazellen zu entwickeln? Bisherige Untersuchungen konnten die Frage nicht eindeutig beantworten, obwohl insbesondere Gedächtnis-B-Zellen als Vorläufer langlebiger Plasmazellen vermutet werden (5, 142, 143).
2. Möglich ist auch, dass in einem *in vitro* Modell, die Fähigkeit stromaler Knochenmarkzellen, Plasmazellen über einen längeren Zeitraum am Leben zu halten, grundlegend eingeschränkt ist (81).
3. Eine weitere Erklärung besteht darin, dass die mesenchymalen Knochenmarkzellen doch eine heterogene Population repräsentieren und nur spezifische Nischenzellen einem Teil der hinzu gegebenen Plasmazellen einen Überlebensraum in der Kultur bieten können.
4. Eventuell sind die hier generierten Knochenmarkstromazellen allein aber nicht ausreichend um eine Plasmazellnische zu bilden. Folglich scheinen zusätzliche Zelltypen zur Vollendung dieser Nische notwendig, wobei z.B. Osteoblasten und Osteoklasten als Regulatoren des Knochenstoffwechsels potentielle Kandidaten wären (82), zumal Osteoblasten bereits als

Nischenzellen für hämatopoetische Stammzellen identifiziert wurden (144). Auch Megakaryozyten scheinen eine entscheidende Rolle im Aufbau der Plasmazellnische zu spielen. Im Knochenmark der Maus konnte gezeigt werden, dass Plasmazellen eng mit Megakaryozyten kolokalisiert sind und beide Zelltypen interagieren. Außerdem produzieren Megakaryozyten mit IL-6 und APRIL zwei der entscheidenden Überlebensfaktoren für Plasmazellen (Winter et al., Manuskript eingereicht).

6.3.3 Mesenchymale Knochenmarkzellen unterstützen die Plasmazellreifung

Bei der in dieser Arbeit etablierten Kokultur wurde auf Einzelzellebene demonstriert, dass stromale Knochenmarkzellen - zumindest teilweise - die Reifung von Plasmazellen und ihren Vorläufern aus dem peripheren Blut zur terminal differenzierten Plasmazelle unterstützen.

Plasmazellen repräsentieren das Endstadium der B-Zellentwicklung. Sie durchlaufen einen Differenzierungsprozess von der B-Zelle über Plasmablasten bis hin zur terminalen Plasmazelle und stellen eine komplexe, heterogene Zellpopulation dar (41, 43). Während die meisten in den sekundären lymphatischen Organen gebildeten Plasmazellen kurzlebig sind (18), haben die zum Knochenmark migrierten Plasmazellen die Kapazität, langlebig zu werden (62, 63). In bisherigen vergleichenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörper-sezernierende Zellen aus der Tonsille einen anderen Phänotyp besitzen als jene im peripheren Blut und jene im Knochenmark oder entzündeten Gewebe (41-43, 130, 145). Somit wird vermutet, dass in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation Plasmazellen und ihre unmittelbaren Vorläufer unterschiedliche Oberflächenmoleküle als Zeichen ihres Reifestadiums exprimieren. Aufgrund der Schwierigkeit, Plasmablasten und Plasmazellen anhand ihres Expressionsprofils klar voneinander zu unterscheiden, wird auch der gemeinsame Begriff Antikörper-sezernierende Zelle verwendet (5, 32). In der vorliegenden Arbeit wurde in den Fällen, in denen nicht aufgrund von Oberflächenmolekülen zwischen Plasmablast und Plasmazelle unterschieden werden konnte, zur Vereinfachung die Bezeichnung „Plasmazelle“ verwendet.

In den oben aufgeführten Studien wurden Plasmablasten bzw. Plasmazellen stets direkt nach Isolierung aus den jeweiligen Geweben durchflusszytometrisch charakterisiert. Lediglich Kawano et al. beobachteten in einem Kokultur-System zwischen Plasmazellvorläufern aus dem Blut und einer Knochenmarkstromazelllinie mögliche Differenzierungen im FACS (96). Jedoch beschränkten sie sich bei der Analyse auf die Marker CD38, CD19 und VLA-5 und erneut trafen sie keine quantitativen Aussagen. Somit ist relativ wenig über den eigentlichen

Entwicklungsverlauf vom Plasmablast zur terminalen Plasmazelle bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob isolierte Blutplasmazellen bzw. ihre Vorläufer im Beisein von mesenchymalen Stromazellen zu reifen Plasmazellen, wie sie im Knochenmark zu finden sind, differenzieren können. Hierzu wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Phänotyp kultivierter Zellen mit dem bisher bekannten Expressionsmuster von Knochenmarkplasmazellen verglichen. Die Expression der folgenden Moleküle wurde vor und zu verschiedenen Zeitpunkten in der Kokultur auf den Plasmazellen untersucht: CD19, CD20, CD31 CD38 CD62L, CD95, CD138, HLA-DR, CCR2 sowie CD44 und VLA-4.

CD38 / HLA-DR (MHC II)

Im Verlauf der Kokultur wurde besonders das Molekül CD38 auf der Oberfläche von Plasmazellen hoch reguliert. Diese Beobachtung korrelierte sowohl mit bisherigen Ergebnissen hinsichtlich der stärksten CD38 Expression auf Knochenmarkplasmazellen (42, 45, 130) als auch mit der CD38 Intensitätszunahme kokultivierter Plasmazellvorläufer bei Kawano (96). Folglich schienen die hier mit mesenchymalen Knochenmarkzellen kokultivierten Plasmazellen zunehmend an Reife zu gewinnen. Interessanterweise war die Zunahme der CD38 Expression signifikant stärker auf den adhärennten Plasmazellen zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen eine unterschiedliche Interaktionsweise zwischen den Stroma- und adhärennten bzw. nicht-adhärennten Plasmazellen vermuten und sprächen dafür, dass sich eher die adhärennten Plasmazellen zu den reiferen Zellen entwickelten.

Da HLA-DR von reifen Knochenmarkplasmazellen herunter reguliert wird (64, 142, 146), wäre es denkbar, dass die Plasmazellen in meiner Kokultur ebenfalls die Expression dieses Moleküls verlieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Analyse des peripheren Blutes zeigte hier die Existenz von zwei Plasmablast-/Plasmazellpopulationen, eine überwiegend HLA-DR⁺ und eine HLA-DR⁻ Population. HLA-DR⁻ Plasmazellen waren im späteren Verlauf der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen nicht mehr nachweisbar. Eine Erklärung hierfür liegt in der Möglichkeit, dass die HLA-DR⁻ Plasmazellen im Verlauf der Kokultur starben. Mei et al. (146). zeigten, dass HLA-DR⁺ Blutplasmablasten in Richtung CXCL12 wandern, nicht jedoch HLA-DR⁻ Plasmazellen. Da das Chemokin CXCL12 an der Wanderung von Plasmablasten zur Stromazelle und vermutlich an der Adhäsion beider Zelltypen beteiligt ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass auch die HLA-DR⁻ Plasmazellen in meiner Arbeit nicht die Fähigkeit besaßen zu migrieren und/oder an die Knochenmarkstromazellen zu adhären. Die verwendeten Stromazellen reichen zwar offensichtlich nicht aus, um die Differenzierung zur vollständig reifen HLA-DR⁻ Plasmazelle zu erreichen. Die durch den Stromakontakt vermittelte

Erhöhung der CD38 Expression zeigt jedoch, dass die Stromazellen zumindest teilweise die terminale Plasmazelldifferenzierung unterstützen. Außerdem haben diese Zellen die Fähigkeit, selektiv HLA-DR⁺ Blutplasmablasten adhären zu lassen, welche normalerweise in ihre Nischen im Knochenmark wandern um hier zur Plasmazelle weiter zu differenzieren. Daher könnte man vermuten, dass die verwendeten Stromazellen eine Teilfunktion der Plasmazellnische übernehmen. Es wurde inzwischen gezeigt, dass eine Plasmazellnische von mesenchymalen Stromazellen gemeinsam mit anderen Zelltypen gebildet wird. Wie bereits oben diskutiert, tragen z.B. auch Megakaryozyten zur Bildung von Plasmazellnischen bei (Winter et al., Manuskript eingereicht).

CD20

Die Abwesenheit von CD20 zu den verschiedenen Zeitpunkten in Kokultur, machte diesen Marker zu einer hervorragenden Isotypkontrolle. Die Ergebnisse sind zudem vereinbar mit bisherigen Studien reifer Knochenmarkplasmazellen, die weiterhin kein CD20 auf ihrer Oberfläche exprimierten (41).

CD138

Die Ergebnisse bezüglich des Proteoglykans CD138 sind nicht eindeutig. Als Differenzierungsmarker für reife Plasmazellen angesehen, wird CD138 auf Knochenmarkplasmazellen viel stärker ausgebildet als auf Vorläuferzellen im Blut, wo die Verteilung heterogen ausfällt (41, 43, 44). In der vorliegenden Studie konnte nicht gezeigt werden, dass Plasmablasten dieses Molekül während der Kokultur hoch regulieren. Vielmehr waren schon an Tag 0 der Isolierung die Resultate in den verschiedenen Einzelexperimenten bezüglich der CD138⁺ Expression sehr abweichend und stimmten nicht mit denen früherer Untersuchungen überein. Dieser uneinheitliche Befund war über die gesamten Messzeitpunkte bei den nicht-adhären Plasmazellen zu beobachten. Lediglich die adhären Plasmazellen prägten zu keinem Zeitpunkt CD138 auf ihrer Oberfläche aus. Es hat den Anschein, dass Knochenmarkstromazellen den Reifungsprozess von Plasmablasten in Bezug auf CD138 nicht induzierten. Ein anderer Erklärungsversuch liegt jedoch in der Methodik: zur Ablösung der mesenchymalen Zellen und adhären Plasmazellen vom Plastikboden wurden diese für wenige Minuten mit Trypsin/1mM EDTA behandelt. Um jederzeit gleiche Bedingungen für alle im FACS zu analysierenden Zellen sicherzustellen, wurden auch die an Tag 0 isolierten CD38⁺⁺ Zellen aus dem Blut und die nicht-adhären kokultivierten Zellen nachträglich trypsinisiert. CD138 ist in unserer Arbeitsgruppe als ein sehr sensibles Adhäsionsmolekül bekannt, so dass

die Enzymbehandlung die Struktur des Moleküls womöglich zerstörte und es folglich nicht angefärbt werden konnte. Diese Erklärung wird von den einheitlichen Ergebnissen gestützt, in denen die adhärennten Plasmazellen kein CD138 ausprägten. Zu den wenigen Zeitpunkten der CD138 Expression könnten möglicherweise Reste von Trypsin-inhibierendem Medium im Röhrchen vorhanden gewesen sein, so dass das Enzym diese Zellen nicht schädigen konnte. Bestätigt wird diese Vermutung von Versuchen, bei denen zum Vergleich nicht-adhärenente kokultivierte Plasmazellen keine Trypsin/EDTA Behandlung erhielten und später CD138 an der Oberfläche exprimierten (Daten nicht gezeigt). Die anderen verwendeten Marker waren von diesem Problem nicht betroffen. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse ist es schwierig, eine definitive Aussage hinsichtlich des Reifegrades der Zellen zu treffen.

CD19 und CD95

Im Hinblick auf CD19 und CD95 war keine Differenzierung in Richtung reifer Knochenmarkplasmazellen zu beobachten. Die Expression beider Marker nahm während der Kokultur an Intensität zu, beschrieben wurde auf isolierten Knochenmarkplasmazellen aber eine abnehmende Expression (41). Die abweichenden Werte bezüglich des Apoptosemarkers CD95 sind vereinbar mit den sinkenden Überlebensfrequenzen der Mehrheit der Plasmazellen während der Kokultur. Ob die wenigen überlebenden Plasmazellen (1% der Ausgangspopulation) am Ende der Kokultur CD95 doch noch herunter regulierten, wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht überprüft. Weshalb die kokultivierten Plasmazellen nicht den heterogenen CD19 Phänotyp entwickelten, wie er auf Knochenmarkplasmazellen anzutreffen ist (41-43), lässt sich nicht eindeutig beantworten. Vermutlich sind die generierten mesenchymalen Stromazellen allein nicht ausreichend für eine vollständige Plasmazelldifferenzierung und es fehlen weitere Überlebenssignale von z.B. anderen Zellarten in der Kultur, wie bereits im Punkt 6.3.2 beschrieben. Andererseits ist die genaue Ursache und Funktion für die im Knochenmark existierenden CD19 Subpopulationen noch nicht geklärt, wobei die CD19⁺ Population als die reiferen Plasmazellen angesehen werden (43).

CCR2

Die Arbeitsgruppe um Busslinger konnte am Mausmodell zeigen, dass durch die Unterdrückung von PAX5 im Rahmen der Plasmazellentwicklung verschiedene Gene in Plasmazellen, u.a. der Chemokinrezeptor CCR2, reexprimiert werden (30). Weiterhin beobachteten sie, dass die CCR2-Reaktivierung für eine normale Plasmazellfunktion bzw. -differenzierung von Bedeutung ist (30). Denn Mäuse, deren B-Zellen CCR2 defizient sind, produzierten 10fach geringere Mengen

spezifischer Antikörper als solche mit CCR2 kompetenten B-Zellen (30). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch das Differenzierungsverhalten von Plasmazellen in Beisein von Knochenmarkstromazellen bezüglich CCR2 untersucht. Das heterogene CCR2-Expressionsmuster der CD38⁺⁺ Plasmazellen aus dem Blut (16,4% CCR2⁺ an Tag 0) veränderte sich im Verlauf der Kokultur kaum (21% CCR2⁺ an Tag 3-7). Interessanterweise regulierte jedoch nur die CCR2⁺ Population der adhären und nicht-adhären Plasmazellen die CD38 Expression im Verlauf der Kokultur signifikant hoch. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CCR2⁺ Subpopulation die reiferen Plasmazellen darstellt. Eine Interaktion zwischen Plasmazellen und Stromazellen in der Kokultur erfolgte womöglich über MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1, auch CCL2), einer von drei bekannten Liganden für CCR2 (147), welcher u.a. von Knochenmarkstromazellen produziert wird (148). Die hier verwendeten mesenchymalen Knochenmarkzellen sezernierten ebenfalls MCP-1 (140). Blockierende Antikörper gegen CCR2 führten in einem *in vitro* Versuch zu einer verminderten Migration von Myelomzellen in Richtung Knochenmarkstromazellen (148). CCR2 wird als ein Chemokinrezeptor beschrieben, das die Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen vermittelt (149, 150). Die Bedeutung von Chemokinen und ihren korrespondierenden Rezeptoren im Hinblick auf das Migrationsverhalten von normalen und malignen Plasmazellen in verschiedene Zielorgane ist Gegenstand vieler Studien. Neben anderen Chemokinrezeptoren wurde unter anderem die Rolle von CCR2 im Multiplen Myelom untersucht. Unterschiedliche Ergebnisse liegen vor beim durchflusszytometrischen Vergleich der CCR2 Expression humaner maligner Knochenmarkplasmazellen mit normalen Proben. In einer Studie exprimierten nur 26% der getesteten Myelom-Patienten CCR2 an der Oberfläche gegenüber 40% (2 von 5) der Kontrollgruppe (151). In einer anderen Arbeit waren 80% der Erkrankten CCR2 positiv sowie 100% der gesunden Personen (148). Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe des geometrischen Mittels wurde auf malignen Plasmazellen eine 3,3-fach verminderte CCR2 Expression gegenüber normalen Plasmazellen beobachtet (152). Diese Daten unterstützen Busslinger's Fund bezüglich der Bedeutung von CCR2 für eine normale Plasmazellfunktion in der Maus. Um die vorliegenden Beobachtungen weiterzuführen, sollten CCR2⁺ Knochenmarkplasmazellen hinsichtlich möglicher Ko-Expressionen mit anderen Markern auf Einzelzellebene überprüft werden. Interessant ist die Fragestellung, ob CCR2⁺ Plasmazellen gleichzeitig den Phänotyp von reifen Knochenmarkplasmazellen zeigen, d.h. CD138⁺, HLA-DR⁻, CD19⁻ sind.

CD62L

Von den isolierten CD38⁺⁺Plasmazellen aus dem peripheren Blut wiesen nur 6,6% der Zellen CD62L auf ihrer Oberfläche auf. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denen von Medina et al. überein, die bei einer Mehrheit der Blutplasmazellen eine CD62L Expression beschrieben hatten (41). Diese Differenz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Medina et al. Plasmazellen kurz nach Immunisierung untersuchten, während in dieser Arbeit Blut nicht immunisierter Donoren verwendet wurde. Auch Medina und Kollegen fanden keine plausible Erklärung dafür, weshalb zirkulierende Blutplasmazellen dieses Molekül ausbildeten. Das Adhäsionsmolekül CD62L vermittelt die Migration von Leukozyten in das sekundäre lymphatische Gewebe über „high endothelial venules“ (HEV, hochendotheliale Venole) (134). Es ist bekannt, dass Antigen-induzierte Plasmazellen in das Knochenmark oder entzündete Gewebe migrieren (43, 64). Ob sie auch in lymphatische Organe einwandern, wie durch die Expression von CD62L zu vermuten, ist unbekannt. Im Verlauf der Kokultur mit den mesenchymalen Knochenmarkzellen regulierten interessanterweise nur die nicht-adhärenenten Plasmazellen CD62L signifikant hoch. Die Frage nach der Bedeutung dieses Differenzierungsschrittes der nicht-adhärenenten Plasmazellen ist schwer zu beantworten. Die verstärkte Expression von CD62L deutet jedenfalls nicht auf eine Differenzierung zur reiferen Knochenmarkplasmazelle hin, auf denen CD62L nicht nachgewiesen wurde (41). Denkbar wäre natürlich, dass vor dem Verlust dieses Moleküls bei der Plasmazellreifung eine Plasmazelldifferenzierungsstufe existiert, die verstärkt CD62L ausprägt. Möglicherweise erhielten die Plasmazellen von den stromalen Knochenmarkzellen ein Signal zur Lösung ihrer Adhäsion, um wieder zu zirkulieren und in lymphatische Gewebe zu migrieren, welches sie aber aufgrund der unphysiologischen Kulturbedingungen nicht ausführen konnten. Daraufhin starben sie wahrscheinlich in der Kokultur.

CD31

Die CD38⁺⁺ Plasmazellen aus dem peripheren Blut zeigten einen heterogenen Phänotyp bezüglich CD31: ein Teil der Zellen exprimierte kein CD31, der Großteil (62,5%) prägte dieses Molekül jedoch auf der Oberfläche aus. Nach Kokultur mit mesenchymalen Stromazellen war zum einen die CD31⁻ Population der Plasmazellen nicht mehr detektierbar. Zum anderen stieg die Intensität der Expression innerhalb der CD31⁺ Population signifikant an. Diese Beobachtungen gehen einher mit bisherigen Untersuchungen, bei denen Knochenmarkplasmazellen deutlich stärker CD31 exprimierten als Plasmazellen aus dem peripheren Blut (41). Entsprechend haben die hier kokultivierten Plasmazellen bezüglich CD31 vermutlich an Reife gewonnen. Die Frage, ob die CD31⁻ Zellen vom Tag 0 im weiteren Verlauf

das Molekül hoch regulierten oder vielmehr die CD31⁻ Ausgangspopulation starb, konnte jedoch nicht geklärt werden. Die heterogene CD31 Expression der Blutplasmazellen stand erneut im Widerspruch zu Medinas Daten, wo alle CD38⁺⁺ Plasmazellen aus dem Blut CD31 ausbildeten (41). Womöglich spielt auch hier der Unterschied des verwendeten Zellmaterials eine Rolle (immunisierte/nicht immunisierte Donoren).

Es wird vermutet, dass CD31 auf Knochenmarkplasmazellen eine wichtige Funktion erfüllt (41). Die Interaktion mit stromalen Knochenmarkzellen findet wahrscheinlich durch Adhäsion von Plasmazellen an Glykosaminoglykane statt, einen von vielen heterophilen Liganden des Moleküls CD31 (153). Wie im Punkt 6.3.2 erläutert, werden Megakaryozyten als ein weiterer potentieller Kandidat der Plasmazellnische angesehen. Da Megakaryozyten auch CD31 auf ihrer Oberfläche ausbilden (154), wäre eine Interaktion mit Plasmazellen somit über eine homophile Zell-Zelladhäsion von CD31 möglich (133). Allerdings müssen diese Wechselspiele noch genauer untersucht werden.

6.3.4 Adhärenz und Nichtadhärenz von Plasmazellen an mesenchymale Knochenmarkzellen ist ein zeitlich begrenzter Prozess

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein kleiner Teil der Plasmazellen innerhalb eines Tages fest an die Knochenmarkstromazellen adhärirt, der andere erst später. In allen Fällen adhärirten die Zellen dann nur zeitlich begrenzt an die mesenchymalen Stromazellen. Die Resultate sind in Übereinstimmung mit einer publizierten Arbeit, in der beobachtet wurde, dass einige maligne Myelomzellen stärker an die Stromazelllinie adhärirten als andere (155). Dass es sich bei den früh bzw. spät adhärirenden Zellen in der vorliegenden Studie um verschiedene Plasmazelltypen oder Differenzierungsstadien handelt, kann vermutet werden, weil die früh und spät adhären Plasmazellen eine deutlich unterschiedliche Überlebensspanne besitzen.

Interessant wäre herauszufinden, welche Bedeutung diese Transienz für das Plasmazellüberleben und -differenzierung hat.

6.4 Klinische Bedeutung der Arbeit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kokultur-Modell zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkstromazellen etabliert. Mit Hilfe dieses Modells ist es möglich, den Einfluss von stromalen Knochenmarkzellen auf das Überleben, die Funktion und Differenzierung von Plasmazellen jeglichen Ursprungs zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten auf Einzelzellebene, dass die isolierten Plasmazellen aus dem peripheren Blut in Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen länger überlebten, als solche, die nicht in Gegenwart mesenchymaler Knochenmarkzellen kultiviert wurden. Außerdem bietet dieses Kokultur-System Plasmablasten die Möglichkeit, in Richtung reifer Plasmazellen zu differenzieren. Nichtsdestotrotz wurde in der vorliegenden Studie auch deutlich, dass dieses *in vitro* Modell limitiert zu sein scheint. Der Großteil an Plasmazellen starb trotz mesenchymaler Knochenmarkstromazellen im Verlauf der Kokultur. Im Bezug auf die Zelldifferenzierung entwickelten die mit Stromazellen kultivierten Plasmazellen nicht in allen Punkten den Phänotyp von Knochenmarkplasmazellen. Dennoch fand ein teilweiser Differenzierungsprozess zur reifen Plasmazelle statt, was durch die Expression bestimmter Moleküle gekennzeichnet ist.

Dieses Kokultur-Modell ist ein hervorragender Ansatzpunkt für die weitere Optimierung: Zur Verbesserung der Kulturbedingungen ist es erforderlich, dass menschliche Knochenmark und sein Mikromilieu so gut wie möglich zu imitieren. Hierzu ist die Identifizierung weiterer potentieller Kandidaten der Plasmazellenische notwendig, wie z.B. Osteoblasten, Osteoklasten oder auch Megakaryozyten, um sie dann in das bestehende System hinzuzufügen. Die detaillierte Analyse der partizipierenden löslichen Moleküle und der entsprechenden Rezeptoren auf den Plasmazellen soll helfen, das komplexe Wechselspiel zwischen den interagierenden Zelltypen aufzudecken. Ein weit gefasstes Ziel ist die Optimierung des entwickelten Modells in Richtung eines dreidimensionalen Knochenmarkmodells, welches mittels 2-Photonenmikroskopie analysiert werden kann.

Mit Hilfe dieses Modells ist es aber jetzt schon möglich, klinische Fragestellungen zu beantworten. So können vergleichende Untersuchungen mit malignen Myelomzellen durchgeführt werden, um entscheidende Unterschiede zur normalen Plasmazelle aufzuzeigen und bisherige Studien hierzu weiterzuführen. Außerdem kann Patientenmaterial verschiedenster Antikörper-vermittelter Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen (z.B. SLE) eingesetzt werden, um zu untersuchen, inwieweit intrinsische Faktoren der Plasmazelle bzw. Stromazelle zu den Krankheiten beitragen.

7 Zusammenfassung

Plasmazellen sind verantwortlich für die Produktion und Sekretion spezifischer Antikörper und tragen so maßgeblich zur humoralen Immunität bei. Sie durchlaufen einen Entwicklungsprozess von der B-Zelle über Plasmablasten (Plasmazellvorläufer) bis hin zur terminalen Plasmazelle. Plasmablasten aus dem peripheren Blut wandern unter anderem in das Knochenmark, wo sie zur reifen Plasmazelle ausdifferenzieren können. Eine wichtige Rolle spielen hierbei mesenchymale Knochenmarkstromazellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein humanes Kokultur-System zwischen mesenchymalen Knochenmarkzellen und Plasmazellen etabliert. Zunächst wurden mesenchymale Stromazellen aus Knochenmarkproben gewonnen und expandiert. Es handelte sich um eine homogene nicht-hämatopoetische Population. Diese exprimieren Adhäsionsmoleküle, die für den Kontakt mit Plasmazellen wichtig sind, unter anderem CD106 (VCAM-1), CD9 und CD44. CD38⁺⁺ Plasmazellvorläufer wurden mittels magnetisch-assoziiertes Zellsortierung aus mononukleären Blutzellen isoliert und zur Stromazellkultur gegeben. Überleben und Differenzierung der Plasmazellen wurde im zeitlichen Verlauf in diesem Kultursystem untersucht. Zur Unterscheidung und Analyse beider Zellarten im Durchflusszytometer war es hierzu zunächst erforderlich ein spezielles FACS Setting zu etablieren. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Knochenmarkstromazellen in der Lage sind, Plasmazellen für mindestens drei Tage am Leben zu erhalten. Dagegen waren ohne Beisein von stromalen Knochenmarkzellen nach diesem Zeitraum keine lebenden Plasmazellen mehr nachweisbar. Außerdem konnte auf Einzelzellebene demonstriert werden, dass in diesen Kokulturen die terminale Plasmazelldifferenzierung durch die mesenchymalen Knochenmarkstromazellen unterstützt wird. Hierzu wurde der Phänotyp von Plasmazellen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle vor und während der Kokultur mit mesenchymalen Knochenmarkzellen verglichen. Ein Anstieg der Expression der Moleküle CD38 und CD31 deuteten auf eine zunehmende Reife der Plasmazellen hin. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Plasmazellen an mesenchymale Knochenmarkstromazellen ein zeitlich begrenzter Prozess ist, beim dem sich zunächst adhärente Plasmazellen im Verlauf der Kokultur wieder lösen. Andererseits konnten sich diese losgelösten Plasmazellen später wieder an die Stromazellen binden. Dies lässt auf eine transiente Interaktion zwischen beiden Zelltypen schließen.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Kokultur-Modell bietet die Möglichkeit zur Klärung klinischer relevanter Fragestellungen, z.B. inwieweit die Interaktion zwischen mesenchymalen

Knochenmarkzellen und autoreaktiven Plasmazellen oder malignen Myelomzellen Resistenz dieser pathologischen Zellpopulationen gegenüber immunsuppressiver Therapie vermittelt, wie dies in der Literatur angenommen wird.

8 *Literaturverzeichnis*

1. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
2. Tan, E. M. 1991. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
3. 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* 14:517-521.
4. 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* 194:61-76.
5. 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* 6:741-750.
6. Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751-758.
7. Ghia, P., E. ten Boekel, E. Sanz, A. de la Hera, A. Rolink, and F. Melchers. 1996. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 184:2217-2229.
8. Meffre, E., R. Casellas, and M. C. Nussenzweig. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* 1:379-385.
9. Nagasawa, T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6:107-116.
10. Carsetti, R., M. M. Rosado, and H. Wardmann. 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197:179-191.
11. Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2005. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23:161-196.
12. Loder, F., B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M. C. Lamers, and R. Carsetti. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190:75-89.
13. Liu, Y. J., and J. Banchereau. 1997. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 9:235-240.

14. Grewal, I. S., and R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153:85-106.
15. Armitage, R. J., B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and W. C. Fanslow. 1993. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 150:3671-3680.
16. Ozaki, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh, D. C. Roopenian, H. C. Morse, 3rd, P. E. Lipsky, and W. J. Leonard. 2004. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173:5361-5371.
17. Ettinger, R., G. P. Sims, A. M. Fairhurst, R. Robbins, Y. S. da Silva, R. Spolski, W. J. Leonard, and P. E. Lipsky. 2005. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* 175:7867-7879.
18. 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* 26:444-448.
19. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12:881-922.
20. MacLennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12:117-139.
21. McHeyzer-Williams, L. J., D. J. Driver, and M. G. McHeyzer-Williams. 2001. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 8:52-59.
22. Schitteck, B., and K. Rajewsky. 1990. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346:749-751.
23. Turner, C. A., Jr., D. H. Mack, and M. M. Davis. 1994. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77:297-306.
24. Angelin-Duclos, C., G. Cattoretti, K. I. Lin, and K. Calame. 2000. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* 165:5462-5471.
25. Kallies, A., J. Hasbold, D. M. Tarlinton, W. Dietrich, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt. 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* 200:967-977.
26. Shapiro-Shelef, M., K. I. Lin, L. J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M. G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of

- immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19:607-620.
27. Lin, K. I., C. Angelin-Duclos, T. C. Kuo, and K. Calame. 2002. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 22:4771-4780.
28. Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravallese, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt, and L. H. Glimcher. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412:300-307.
29. Shaffer, A. L., M. Shapiro-Shelef, N. N. Iwakoshi, A. H. Lee, S. B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B. K. Tan, A. Rosenwald, E. M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J. W. Yewdell, K. Calame, L. H. Glimcher, and L. M. Staudt. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21:81-93.
30. 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* 24:269-281.
31. Lin, Y., K. Wong, and K. Calame. 1997. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276:596-599.
32. Shapiro-Shelef, M., and K. Calame. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5:230-242.
33. Helmreich, E., M. Kern, and H. N. Eisen. 1961. The secretion of antibody by isolated lymph node cells. *J Biol Chem* 236:464-473.
34. Hibi, T., and H. M. Dosch. 1986. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. *Eur J Immunol* 16:139-145.
35. Abney, E. R., M. D. Cooper, J. F. Kearney, A. R. Lawton, and R. M. Parkhouse. 1978. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J Immunol* 120:2041-2049.
36. Calame, K. L. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2:1103-1108.
37. Halper, J., S. M. Fu, C. Y. Wang, R. Winchester, and H. G. Kunkel. 1978. Patterns of expression of human "Ia-like" antigens during the terminal stages of B cell development. *J Immunol* 120:1480-1484.

38. Anderson, K. C., E. K. Park, M. P. Bates, R. C. Leonard, R. Hardy, S. F. Schlossman, and L. M. Nadler. 1983. Antigens on human plasma cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol* 130:1132-1138.
39. Bhan, A. K., L. M. Nadler, P. Stashenko, R. T. McCluskey, and S. F. Schlossman. 1981. Stages of B cell differentiation in human lymphoid tissue. *J Exp Med* 154:737-749.
40. Chen-Kiang, S. 2005. Biology of plasma cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:493-507.
41. Medina, F., C. Segundo, A. Campos-Caro, I. Gonzalez-Garcia, and J. A. Brieva. 2002. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99:2154-2161.
42. 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* 72:580-583.
43. Arce, S., E. Luger, G. Muehlinghaus, G. Cassese, A. Hauser, A. Horst, K. Lehnert, M. Odendahl, D. Honemann, K. D. Heller, H. Kleinschmidt, C. Berek, T. Dorner, V. Krenn, F. Hiepe, R. Bargou, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2004. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leukoc Biol*.
44. Jego, G., N. Robillard, D. Puthier, M. Amiot, F. Accard, D. Pineau, J. L. Harousseau, R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck. 1999. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94:701-712.
45. 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* 76:1739-1747.
46. Van Camp, B., C. Thielemans, M. F. Dehou, J. De Mey, and M. De Waele. 1982. Two monoclonal antibodies (OKIa1 and OKT10) for the study of the final B cell maturation. *J Clin Immunol* 2:67S-74S.
47. 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* 192:813-821.
48. Kunkel, E. J., and E. C. Butcher. 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3:822-829.
49. Cyster, J. G. 2003. Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol Rev* 195:5-14.

50. 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* 194:45-56.
51. Wehrli, N., D. F. Legler, D. Finke, K. M. Toellner, P. Loetscher, M. Baggiolini, I. C. MacLennan, and H. Acha-Orbea. 2001. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur J Immunol* 31:609-616.
52. 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. 2004. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilisation of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*.
53. 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* 200:1145-1156.
54. 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* 169:1277-1282.
55. 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* 171:1684-1690.
56. 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* 105:3965-3971.
57. Bowman, E. P., N. A. Kuklin, K. R. Youngman, N. H. Lazarus, E. J. Kunkel, J. Pan, H. B. Greenberg, and E. C. Butcher. 2002. The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J Exp Med* 195:269-275.
58. Lazarus, N. H., E. J. Kunkel, B. Johnston, E. Wilson, K. R. Youngman, and E. C. Butcher. 2003. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol* 170:3799-3805.
59. Cooper, E. H. 1961. Production of lymphocytes and plasma cells in the rat following immunization with human serum albumin. *Immunology* 4:219-231.

60. Levy, M., P. Vieira, A. Coutinho, and A. Freitas. 1987. The majority of "natural" immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes. *Eur J Immunol* 17:849-854.
61. Schooley, J. C. 1961. Autoradiographic observations of plasma cell formation. *J Immunol* 86:331-337.
62. Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133-134.
63. Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8:363-372.
64. 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* 10:1703-1711.
65. Ho, F., J. E. Lortan, I. C. MacLennan, and M. Khan. 1986. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol* 16:1297-1301.
66. Benner, R., W. Hijmans, and J. J. Haaijman. 1981. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol* 46:1-8.
67. Vieira, P., and K. Rajewsky. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18:313-316.
68. Ochsenbein, A. F., D. D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13263-13268.
69. Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, T. M. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet, and H. Hengartner. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14:333-367.
70. Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199-2202.
71. Amanna, I. J., N. E. Carlson, and M. K. Slifka. 2007. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 357:1903-1915.
72. Cambridge, G., M. J. Leandro, J. C. Edwards, M. R. Ehrenstein, M. Salden, M. Bodman-Smith, and A. D. Webster. 2003. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2146-2154.
73. Edwards, J. C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572-2581.

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* 38:292-298.
75. Ellyard, J. I., D. T. Avery, T. G. Phan, N. J. Hare, P. D. Hodgkin, and S. G. Tangye. 2004. Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood* 103:3805-3812.
76. 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* 31:2726-2732.
77. Hutloff, A., K. Buchner, K. Reiter, H. J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Dorner, and R. A. Kroccek. 2004. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3211-3220.
78. Schroder, A. E., A. Greiner, C. Seyfert, and C. Berek. 1996. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:221-225.
79. Tsubaki, T., S. Takegawa, H. Hanamoto, N. Arita, J. Kamogawa, H. Yamamoto, N. Takubo, S. Nakata, K. Yamada, S. Yamamoto, O. Yoshie, and M. Nose. 2005. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 141:363-371.
80. Hiepe, F., and A. Radbruch. 2006. Is long-term humoral immunity in the mucosa provided by long-lived plasma cells? A question still open. *Eur J Immunol* 36:1068-1069.
81. 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* 169:4213-4221.
82. Moser, K., K. Tokoyoda, A. Radbruch, I. MacLennan, and R. A. Manz. 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 18:265-270.
83. Manz, R. A., A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2004. Maintenance of Serum Antibody Levels. *Annu Rev Immunol*.
84. Roldan, E., and J. A. Brieva. 1991. Terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion: role of bone marrow stromal cells and interleukin 6. *Eur J Immunol* 21:2671-2677.

85. Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-342.
86. Jego, G., R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck. 2001. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 97:1817-1822.
87. Hilbert, D. M., M. Kopf, B. A. Mock, G. Kohler, and S. Rudikoff. 1995. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* 182:243-248.
88. Zhang, X. G., J. P. Gaillard, N. Robillard, Z. Y. Lu, Z. J. Gu, M. Jourdan, J. M. Boiron, R. Bataille, and B. Klein. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83:3654-3663.
89. Zhang, X. G., B. Klein, and R. Bataille. 1989. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 74:11-13.
90. Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka, and et al. 1988. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83-85.
91. Chatterjee, M., D. Honemann, S. Lentzsch, K. Bommert, C. Sers, P. Herrmann, S. Mathas, B. Dorken, and R. C. Bargou. 2002. In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway. *Blood* 100:3311-3318.
92. Witte, P. L., M. Robinson, A. Henley, M. G. Low, D. L. Stiers, S. Perkins, R. A. Fleischman, and P. W. Kincade. 1987. Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur J Immunol* 17:1473-1484.
93. LeBien, T. W. 1998. B-cell lymphopoiesis in mouse and man. *Curr Opin Immunol* 10:188-195.
94. 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* 20:707-718.
95. Merville, P., J. Dechanet, A. Desmouliere, I. Durand, O. de Bouteiller, P. Garrone, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1996. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med* 183:227-236.
96. Kawano, M. M., K. Mihara, N. Huang, T. Tsujimoto, and A. Kuramoto. 1995. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* 85:487-494.

97. Moreau, I., V. Duvert, C. Caux, M. C. Galmiche, P. Charbord, J. Banchereau, and S. Saeland. 1993. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood* 82:2396-2405.
98. 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* 199:91-98.
99. Cortes, M., and K. Georgopoulos. 2004. Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *J Exp Med* 199:209-219.
100. Trepel, F. 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klin Wochenschr* 52:511-515.
101. 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* 211:295-302.
102. Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S.A., BianCo, P., and Gehron Robey, P. 1999. Bone Marrow Stromal Cells: Characterization and Clinical Application. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:165-181.
103. Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch 2002. *Walter de Gruyter Verlag Berlin - New York* 259. Auflage.
104. Allen, T. D., and T. M. Dexter. 1982. Ultrastructural aspects of erythropoietic differentiation in long-term bone marrow culture. *Differentiation* 21:86-94.
105. Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:63-76.
106. Dorshkind, K. 1990. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8:111-137.
107. Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230-247.
108. Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-274.
109. Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, and I. V. Keiliss-Borok. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17:331-340.

110. Castro-Malaspina, H., R. E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H. E. Broxmeyer, and M. A. Moore. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56:289-301.
111. Bruder, S. P., N. Jaiswal, and S. E. Haynesworth. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294.
112. Spees, J. L., C. A. Gregory, H. Singh, H. A. Tucker, A. Peister, P. J. Lynch, S. C. Hsu, J. Smith, and D. J. Prockop. 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 9:747-756.
113. Gregory, C. A., D. J. Prockop, and J. L. Spees. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306:330-335.
114. Jones, E., and D. McGonagle. 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 47:126-131.
115. Dexter, T. M., T. D. Allen, and L. G. Lajtha. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91:335-344.
116. Whitlock, C. A., and O. N. Witte. 1982. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3608-3612.
117. Gartner, S., and H. S. Kaplan. 1980. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4756-4759.
118. Phinney, D. G. 2002. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 38:7-12.
119. Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, and A. Keating. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.
120. Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77-89.
121. Roldan, E., A. Garcia-Pardo, and J. A. Brieva. 1992. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med* 175:1739-1747.

122. Schaumann, D. H., J. Tuischer, W. Ebell, R. A. Manz, and R. Lauster. 2007. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. *Mol Immunol* 44:1606-1612.
123. Uchiyama, H., B. A. Barut, A. F. Mohrbacher, D. Chauhan, and K. C. Anderson. 1993. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82:3712-3720.
124. Wallace, S. R., M. M. Oken, K. L. Lunetta, A. Panoskaltis-Mortari, and A. M. Masellis. 2001. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer* 91:1219-1230.
125. Moreau, I., C. Andreoni, C. Caux, S. Saeland, and D. Rigal. 1992. Modification of human long-term bone marrow cultures: establishment of a functional stromal microenvironment devoid of myeloid progenitors. *Eur J Haematol* 49:29-35.
126. Manz, R. A., and A. Radbruch. 2002. Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 32:923-927.
127. Dilosa, R. M., K. Maeda, A. Masuda, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1991. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol* 146:4071-4077.
128. Horst, A., N. Hunzelmann, S. Arce, M. Herber, R. A. Manz, A. Radbruch, R. Nischt, J. Schmitz, and M. Assenmacher. 2002. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clin Exp Immunol* 130:370-378.
129. Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268:720-722.
130. Harada, Y., M. M. Kawano, N. Huang, M. S. Mahmoud, I. A. Lisukov, K. Mihara, T. Tsujimoto, and A. Kuramoto. 1996. Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance. *Br J Haematol* 92:184-191.
131. Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, R. H. Levey, and S. F. Schlossman. 1980. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1588-1592.
132. Lynch, D. H., F. Ramsdell, and M. R. Alderson. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 16:569-574.
133. Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck, and P. J. Newman. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114:1059-1068.

134. Kraal, G., and R. E. Mebius. 1997. High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv Immunol* 65:347-395.
135. Jelinek, D. F., and P. E. Lipsky. 1983. The role of B cell proliferation in the generation of immunoglobulin- secreting cells in man. *J Immunol* 130:2597-2604.
136. Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo, K. Shinozaki, S. Yamada, and A. Komiyama. 1999. Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction. *Leuk Lymphoma* 35:219-225.
137. Stevens, R. H., E. Macy, C. Morrow, and A. Saxon. 1979. Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus toxoid antibody producing B cells following in vivo booster immunization. *J Immunol* 122:2498-2504.
138. Andreoni, C., I. Moreau, and D. Rigal. 1990. Long-term culture of human bone marrow. I. characterization of adherent cells in flow cytometry. *Exp Hematol* 18:431-437.
139. Prockop, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
140. Rosowski, M. 2008. Mesenchymal condensation and subsequent chondrogenic differentiation in scaffold free 3D culture. *Dissertation, Technische Universität Berlin (TU), Fakultät III: Prozesswissenschaften.*
141. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-841.
142. Tarlinton, D., A. Radbruch, F. Hiepe, and T. Dorner. 2008. Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol.*
143. Smith, K. G., A. Light, L. A. O'Reilly, S. M. Ang, A. Strasser, and D. Tarlinton. 2000. bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J Exp Med* 191:475-484.
144. Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841-846.
145. 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* 81:2658-2663.

146. Mei, H. E., T. Yoshida, W. Sime, F. Hiepe, K. Thiele, R. A. Manz, A. Radbruch, and T. Dorner. 2008. Blood-borne human plasma cells in steady-state are derived from mucosal immune responses. *Blood*.
147. Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A. M. Martin, A. J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr., and A. C. Martinez. 1998. The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161:805-813.
148. Vande Broek, I., K. Asosingh, K. Vanderkerken, N. Straetmans, B. Van Camp, and I. Van Riet. 2003. Chemokine receptor CCR2 is expressed by human multiple myeloma cells and mediates migration to bone marrow stromal cell-produced monocyte chemoattractant proteins MCP-1, -2 and -3. *Br J Cancer* 88:855-862.
149. Rollins, B. J. 2006. Release the hounds! A chemokine elicits monocytes from bone marrow. *Nat Immunol* 7:230-232.
150. Kuziel, W. A., S. J. Morgan, T. C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, and N. Maeda. 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12053-12058.
151. Trentin, L., M. Miorin, M. Facco, I. Baesso, S. Carraro, A. Cabrelle, N. Maschio, M. Bortoli, G. Binotto, F. Piazza, F. Adami, R. Zambello, C. Agostini, and G. Semenzato. 2007. Multiple myeloma plasma cells show different chemokine receptor profiles at sites of disease activity. *Br J Haematol* 138:594-602.
152. Al Rayes, M. H., A. C. Rawstron, G. J. Morgan, and F. E. Davies. 2005. The bone marrow microenvironment influences the differential chemokine receptor expression of normal and neoplastic plasma cells. *Blood* 105:4895-4896.
153. Gandhi, N. S., D. R. Coombe, and R. L. Mancera. 2008. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 1. Molecular modeling studies. *Biochemistry* 47:4851-4862.
154. Hagiwara, T., T. Nagasawa, H. Nagahisa, M. Takizawa, M. Osada, and T. Abe. 1996. Expression of adhesion molecules on cytoplasmic processes of human megakaryocytes. *Exp Hematol* 24:690-695.
155. Huang, N., M. M. Kawano, H. Harada, Y. Harada, A. Sakai, A. Kuramoto, and O. Niwa. 1993. Heterogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells: possible involvement of MPC-1 antigen in the adhesion of mature myeloma cells to bone marrow stromal cells. *Blood* 82:3721-3729.

9 *Abkürzungsverzeichnis*

-	negativ für einen Merkmal
+	positiv für einen Merkmal
++	stark positiv für ein Merkmal
Abb.	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ASC	Antikörper-sezernierende Zelle
BAFF	B lymphocyte activation factor
BCL-6	B-cell lymphoma 6
BCMA	B cell maturation antigen
BLIMP1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CC	C-Chemokin
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
CXCL	CX-Chemokin
DAPI	4', 6-diamino-2-phenylindole, dilactate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
HLA	human leukozyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
L	Ligand
m	milli bzw. meter

M	Molar
MACS	magnetic cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MIP	macrophage inflammatory protein
μ	mikro
NZB	New Zealand Black
NZW	New Zealand White
PAX5	paired box protein 5
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
R	Rezeptor
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
PRDM1	positive-regulatory-domain containing 1
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSC	Seitwärtsstreulicht
TACI	transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen
XBP1	X-box-binding protein 1
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Rudolf Manz für die Überlassung des Themas sowie für die wunderbare Betreuung der Arbeit über den gesamten Zeitraum. Vielen Dank für die großartige Unterstützung!

Ich möchte mich auch bei Prof. A. Radbruch dafür bedanken, dass ich die Arbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum anfertigen durfte.

Bei Gwendolin Mühlinghaus, Anette Peddinghaus und Katrin Moser bedanke ich mich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die stete Unterstützung bei technischen Fragestellungen. Auch meinen anderen Kollegen der Arbeitsgruppe „Humorale Immunologie“ mit Oliver Winter, Martin Szyska und Nicole Haupt danke ich für die freundliche und lustige Atmosphäre, in der es immer Spaß gemacht hat zu arbeiten. Die wöchentlichen Gruppendiskussionen waren immer sehr anregend und bereichernd.

Dörte Huscher möchte ich danken für die fachliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Besonderer Dank geht außerdem an Katrin, Martin und meinen Vati, die meine Doktorarbeit so sorgfältig und kritisch gegengelesen haben.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie und Daniel, die mich während der Anfertigung der Promotion begleitet und stets motiviert haben.

11 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

12 Erklärung

„Ich, Juliane Hiepe, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Etablierung eines humanen Kokultur-Systems zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkstromazellen* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 28.01.2009