

5 Ergebnisse

5.1 Anzahl IgG-sezernierender Plasmazellen in Milz und Knochenmark im zeitlichen Verlauf

Um den Zeitraum zu ermitteln, innerhalb dessen sich nach einer Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Ovalbumin (OVA) die Migration der spezifischen, IgG-sezernierenden Zellen aus der Milz ins Knochenmark vollzieht, wurde zunächst mittels ELISPOT die absolute Anzahl dieser Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung in beiden Organen festgestellt. Bei der intraperitonealen OVA-Primärimmunisierung wurde Aluminium-Magnesium-Hydroxid als Adjuvans verwendet, um eine stärkere Immunantwort hervorzurufen. Die Sekundärimmunisierung erfolgte intravenös, die Dosis betrug zu beiden Zeitpunkten 100 µg OVA pro Maus.

5.1.1 Kinetik der Anzahl OVA-spezifischer IgG-sezernierender Zellen in Milz und Knochenmark nach Primärimmunisierung

Die Anzahl der Zellen, die OVA-spezifische IgGs sezernieren, wurde an Tag 0 (nicht immunisierte Tiere), Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 10 und Tag 14 nach intraperitonealer Immunisierung mit diesem Protein bestimmt, und zwar sowohl in der Milz als auch im Knochenmark. Aus Abb. 6 ist ersichtlich, dass erwartungsgemäß am Tag 0 noch keine OVA-spezifischen IgG-ASC vorhanden waren, was gleichzeitig eine Kontrolle für die Spezifität des Tests darstellte. An Tag 3 lag ihre Zahl in der Milz knapp über der Nachweisgrenze. An Tag 5 waren im Mittel 150 IgG-sezernierende Zellen nachweisbar, an Tag 7 erreichte ihre Zahl das Maximum von durchschnittlich etwa 200. An Tag 10 und 14 sanken sie wieder auf ähnliche Werte wie an Tag 3, und zwar im Bereich zwischen 10 und 20 Zellen. Im Knochenmark ließ sich über den gesamten Zeitraum hinweg nur eine sehr geringe Zahl von Zellen nachweisen, die OVA-spezifische IgGs sezernieren. In einem anderen Experiment wurden im Knochenmark von Mäusen zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich 2 Monate nach der Primärimmunisierung, keine derartigen Zellen mehr nachgewiesen.

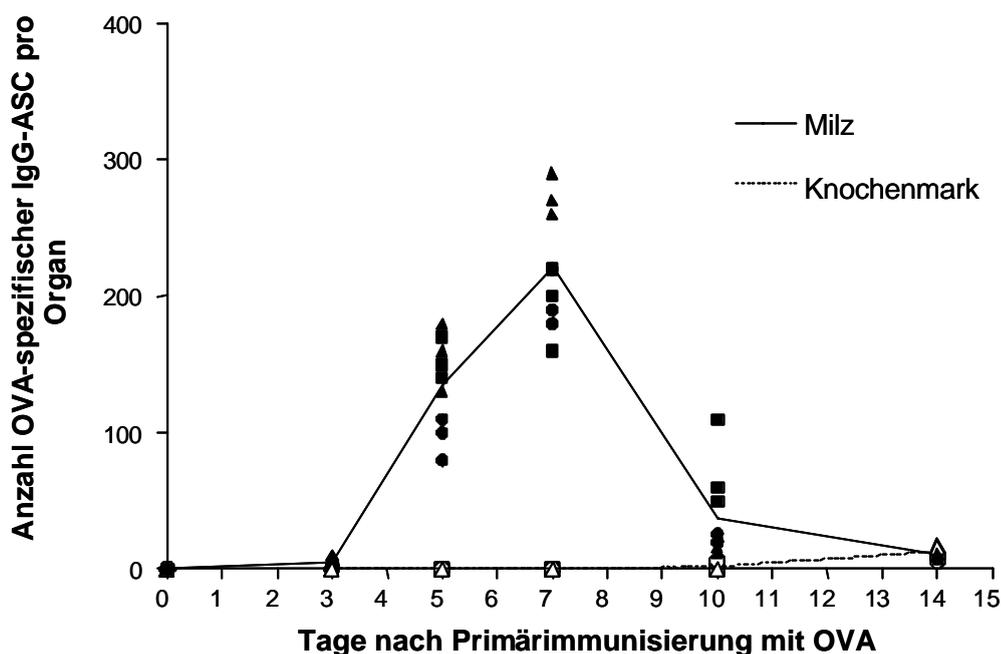


Abbildung 6: Kinetik von OVA-spezifischen IgG-ASC nach Primärimmunisierung.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Immunisierung wurde mittels ELISPOT die Gesamtzahl an OVA-spezifischen IgG-ASC pro Organ ermittelt. Tag 0 bezeichnet den Tag der Immunisierung. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb eines Experiments ermittelt wurden, sind mit den gleichen Symbolen gekennzeichnet. Die schwarzen Symbole stehen für Messwerte aus der Milz, die weißen für Messwerte aus dem Knochenmark. Die Linien verbinden die Mittelwerte der Messungen an den verschiedenen Zeitpunkten.

5.1.2 Kinematik der Anzahl OVA-spezifischer IgG-sezernierender Zellen in Milz und Knochenmark in der Sekundärantwort

Im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 6 der Sekundärantwort wurde in täglichen Intervallen die Gesamtzahl der Zellen pro Organ, die OVA-spezifische IgGs sezernieren, bestimmt. (Abb. 7). In der Milz, wo unter anderem die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmablasten erfolgt, stieg die Anzahl von OVA-spezifischen ASC von im Mittel etwa 25 am Tag 2 ausgehend zunächst über 3 Tage an. Nach dem Erreichen eines Maximums von ungefähr 2×10^4 Zellen am Tag 5 nahm die Zellzahl innerhalb der nächsten 3 Tage um mehr als das 20-fache ab. Am Tag 12 waren im Mittel noch $4,5 \times 10^2$ OVA-spezifische IgG-ASC detektierbar. Im Knochenmark verlief die Entwicklung der Zahl IgG-sezernierender OVA-spezifischer Zellen anders. Am Tag 3 waren hier nur im Mittel 2×10^2 Zellen nachweisbar. Ihre Zahl nahm innerhalb der nächsten 3 Tage stark zu, erreichte ein Maximum von 2×10^4 an Tag 6 und fiel

dann bis auf etwa 10^4 Zellen an Tag 8 ab. An Tag 12 waren im Mittel noch $2,5 \times 10^3$ dieser Zellen im Knochenmark feststellbar. Es ergab sich somit parallel zum Abfall der Zahl an OVA-spezifischen IgG-ASC in der Milz ein Anstieg derselben im Knochenmark mit einem Maximum an Tag 6. Danach reduzierte sich die Anzahl dieser Zellen dort bis zum Ende des untersuchten Zeitraumes wieder, allerdings auf eine etwa 10-fach höhere Zahl als in der Milz. Neben den quantitativen Unterschieden ließ sich regelmäßig ein relativer Größenunterschied zwischen den ELISPOTs aus den unterschiedlichen Organen feststellen: die von ASC aus der Milz stammenden Spots waren im Durchmesser etwa um die Hälfte kleiner als die Spots von ASC aus dem Knochenmark.

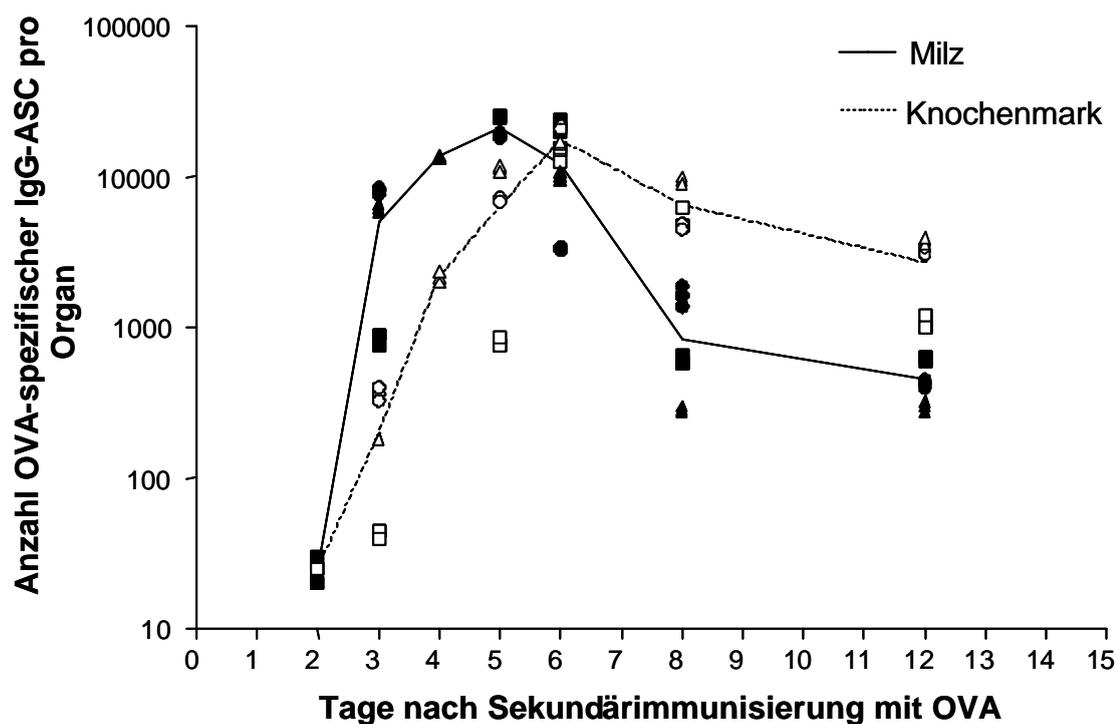


Abbildung 7: Kinetik von OVA-spezifischen IgG-ASC nach Sekundärimmunisierung.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Immunisierung mit OVA wurde in Milz und Knochenmark mittels ELISPOT die Gesamtzahl an OVA-spezifischen IgG-ASC pro Organ ermittelt. Tag 0 bezeichnet den Tag der Immunisierung. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die schwarzen Symbole stehen für Messwerte aus der Milz, die weißen für Messwerte aus dem Knochenmark. Die Linien verbinden die Mittelwerte der Messungen an den verschiedenen Zeitpunkten.

Das Verschwinden des größten Teils der Population von OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz sowie das Auftauchen dieser Zellen im Knochenmark vollzogen sich demnach zwischen Tag 4 und Tag 6 nach der Sekundärimmunisierung. Dies befand sich im Einklang mit der Beobachtung, dass sich zwischen Tag 4 und Tag 6 ein Anstieg und nachfolgender Abfall der Zahl OVA-spezifischer IgG-ASC im Blut feststellen ließ. Mit maximal etwa 500 dieser Zellen pro ml Vollblut war die Zahl hier jedoch zu gering, um eine aussagekräftige vergleichende Quantifizierung vornehmen zu können, da aus technischen Gründen nur etwa 300 µl Blut pro Tier gewonnen werden konnten.

5.2 Chemotaxis von Antikörper sezernierenden Zellen aus der Milz

Im nächsten Schritt sollten Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die bei der Migration der Antikörper sezernierenden Zellen eine Rolle spielen. Basierend auf den in Abb. 7 dargestellten Resultaten wurde ein experimenteller Ansatz zur Analyse der Chemotaxis von OVA-spezifischen ASC aus der Milz erarbeitet. Als Zeitpunkt für diese Analyse wurde Tag 4 nach der Sekundärimmunisierung gewählt. Aus der Kinetik (Abb. 7) ist ersichtlich, dass die Zellen dann gerade im Knochenmark auftauchen. Sollte es sich hierbei um eine durch Chemokine vermittelte Migration handeln, so würde man erwarten, dass die ASC aus der Milz zu diesem Zeitpunkt empfänglich für solche chemotaktischen Signale sind. Der experimentelle Ansatz zur Analyse der Chemotaxis von OVA-spezifischen IgG-ASC ist in Abb. 8 dargestellt:

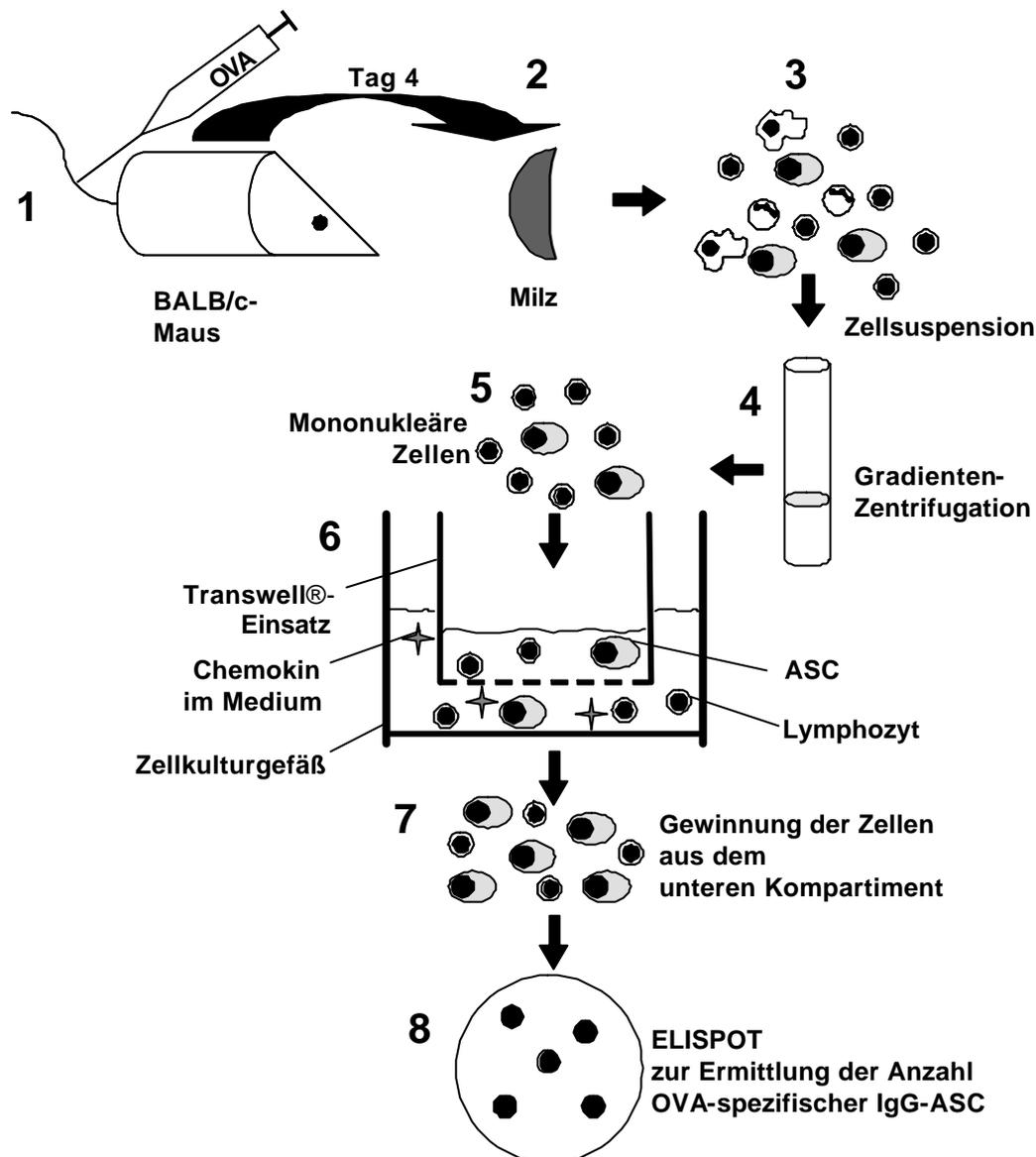


Abbildung 8: Versuchsansatz zur Ermittlung der Chemotaxis OVA-spezifischer IgG-ASC aus der Milz.

BALB/c-Mäuse wurden mit OVA sekundärimmunisiert (1), am Tag 4 wurde die Milz entnommen (2), eine Einzelzellsuspension hergestellt (3) und die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (4). Mit diesen Zellen wurden Transwell®-Einsätze beladen (5). Die Migrationszeit betrug 90 min. (6), danach wurden die migrierten Zellen aus dem unteren Kompartiment auf ELISPOT-Platten überführt (7) und so die OVA-spezifischen IgG-ASC quantifiziert (8). Zur Ermittlung des prozentualen Anteils migrierter OVA-spezifischer IgG-ASC wurde die Zellsuspension im gleichen Volumen und gleicher Konzentration direkt in das untere Kompartiment gegeben und die darin enthaltene Anzahl OVA-spezifischer IgG-ASC gleich 100% gesetzt. Die Basalmigration wurde ermittelt, indem in das untere Kompartiment Medium ohne Chemokinzusatz gegeben wurde.

Da die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren auf Zellen häufig nicht mit der Fähigkeit zur Migration korreliert, wurde mit den Chemotaxisversuchen ein funktioneller Ansatz gewählt. Für jeden in der Maus bekannten Chemokinrezeptor (Tabelle 1) wurde ein Ligand im Chemotaxisversuch daraufhin getestet, ob er eine Migration der OVA-spezifischen IgG-ASC auslöste. Da die Chemokine häufig in eng begrenzten Konzentrationsbereichen wirksam sind, wurden die Liganden jeweils in einer Spanne zwischen 300 und 0,1 nM geprüft. Dieser Testbereich orientierte sich an veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen.

5.2.1 Chemotaxis zu CXCL12 (SDF-1a) an Tag 4 nach Sekundärimmunisierung

In Abb. 9 ist der prozentuale Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach der Sekundärimmunisierung dargestellt, der in den Transwell®-Versuchen zu CXCL12, dem Liganden von CXCR4, migrierte. Der Anteil betrug maximal 80 %. Aus dem Verlauf der Kurve ergab sich, dass der Anteil migrierter Zellen abhängig von der Konzentration an CXCL12 war, wobei das Optimum zwischen 10 nM und 100 nM lag. Bei einer geringeren Konzentration von 1 nM migrierten noch etwa 10 %, bei 0,1 nM war keine Migration der OVA-spezifischen IgG-ASC über dem Basalniveau mehr nachweisbar. Wenn die Konzentration an CXCL12 mit 300 nM den Optimalbereich überstieg, ging der Anteil an migrierten Zellen auf etwa 20 % zurück. Die Basalmigration der ASC (gegen Medium ohne Zusatz von CXCL12) betrug in allen Versuchen weniger als 1,5 %.

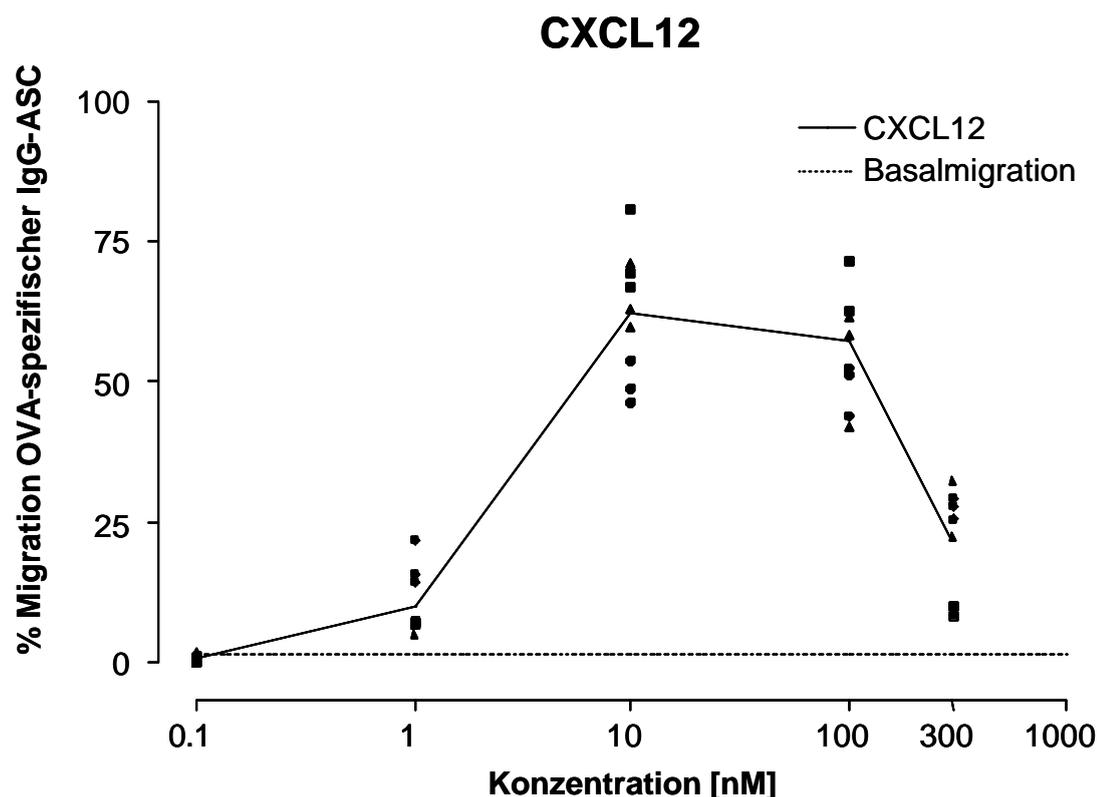


Abbildung 9: Migration von Antigen-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach Sekundärimmunisierung mit OVA zu verschiedenen Konzentrationen von CXCL12.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die durchgezogene Linie verbindet die Mittelwerte der Messungen an den verschiedenen Zeitpunkten. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert der Basalmigration aus den Experimenten dar.

Der Nachweis, dass es sich bei dem gezeigten Migrationsverhalten tatsächlich um Chemotaxis und nicht um Chemokinese, d.h. ungerichtete Bewegung der Zellen aufgrund von Aktivierung handelte, wurde durch einen so genannten Checkerboard-Versuch erbracht, bei dem CXCL12 in der optimalen Konzentration von 10 nM sowohl in die untere Kammer der Transwells® als auch zu der Zellsuspension in die obere Kammer gegeben wurde. In diesem Fall war keine Migration in das untere Kompartiment nachzuweisen (Abb. 10). Es handelte sich damit bei dem in Abb. 9 gezeigten Experiment um eine gerichtete Bewegung der Zellen gegen einen Gradienten von CXCL12.

Aufgrund seiner Fähigkeit, effizient Chemotaxis der ASC zu induzieren, wurde CXCL12 in allen nachfolgenden Migrationsversuchen als Positivkontrolle mitgetestet.

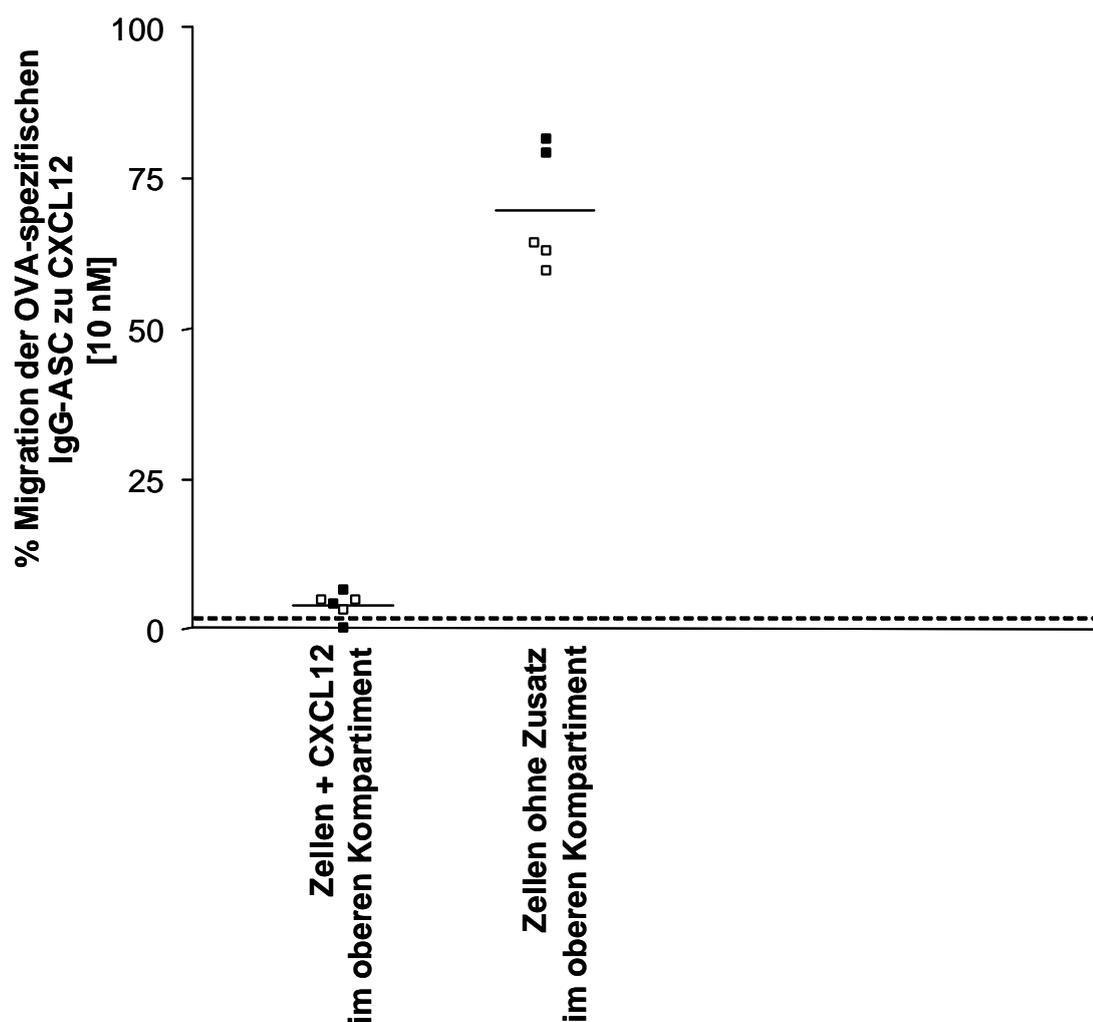


Abbildung 10: Chemotaxis und Chemokinese OVA-spezifischer IgG-ASC zu CXCL12.

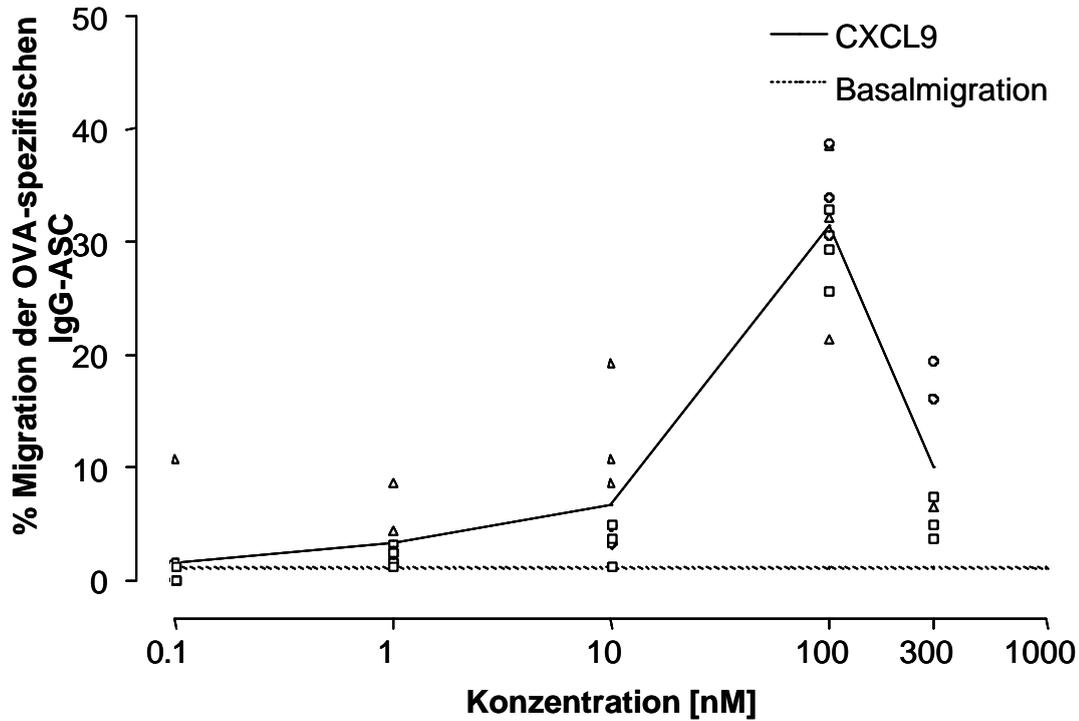
Die Migration wurde an Zellen aus der Milz am Tag 4 nach der Sekundärimmunisierung in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. CXCL12 wurde in der zuvor ermittelten Optimalkonzentration von 10 nM in beide Kompartimente bzw. nur in das untere Kompartiment gegeben. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert der Basalmigration der OVA-spezifischen IgG-ASC in den beiden Experimenten.

5.2.2 Chemotaxis zu den CXCR3-Liganden CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) an Tag 4 nach Sekundärimmunisierung mit OVA

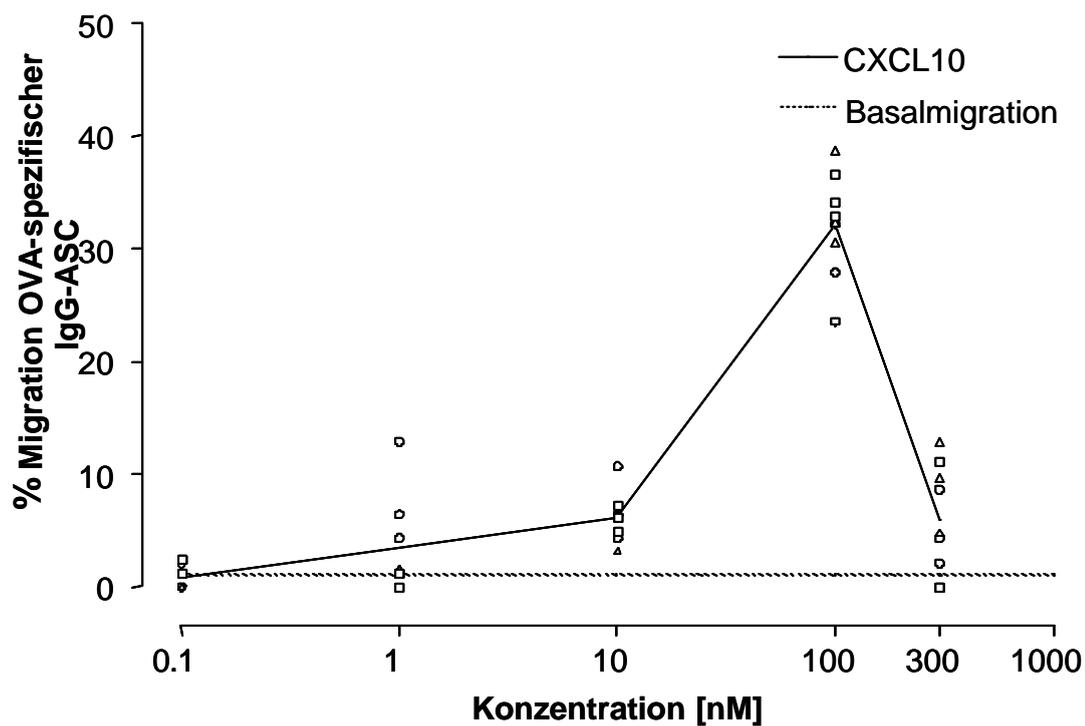
In Abb. 11 ist der Prozentsatz der OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz dargestellt, der im Migrationsversuch zu den CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 migrierte. Die optimale Konzentration für alle diese Chemokine lag bei etwa 100 nM, es migrierten im Falle von CXCL9 und CXCL10 im Mittel 30 % der Zellen, bei CXCL11 waren es etwa 10 %. Im Vergleich mit CXCL12 war der Konzentrationsbereich, in dem die Zellen migrieren, enger eingegrenzt, bereits bei einer Konzentration von 10 nM ließ sich bei CXCL9 und 10

durchschnittlich etwa 5 % Migration nachweisen, bei CXCL11 maximal 5 %. Oberhalb des Optimalbereiches migrierten bei einer Konzentration von 300 nM noch maximal 20 % (CXCL9), 15 % (CXCL10) bzw. 5 % (CXCL11). Die Basalmigration gegen Medium lag in diesen Experimenten im Mittel bei 1,1 %.

CXCL9



CXCL10



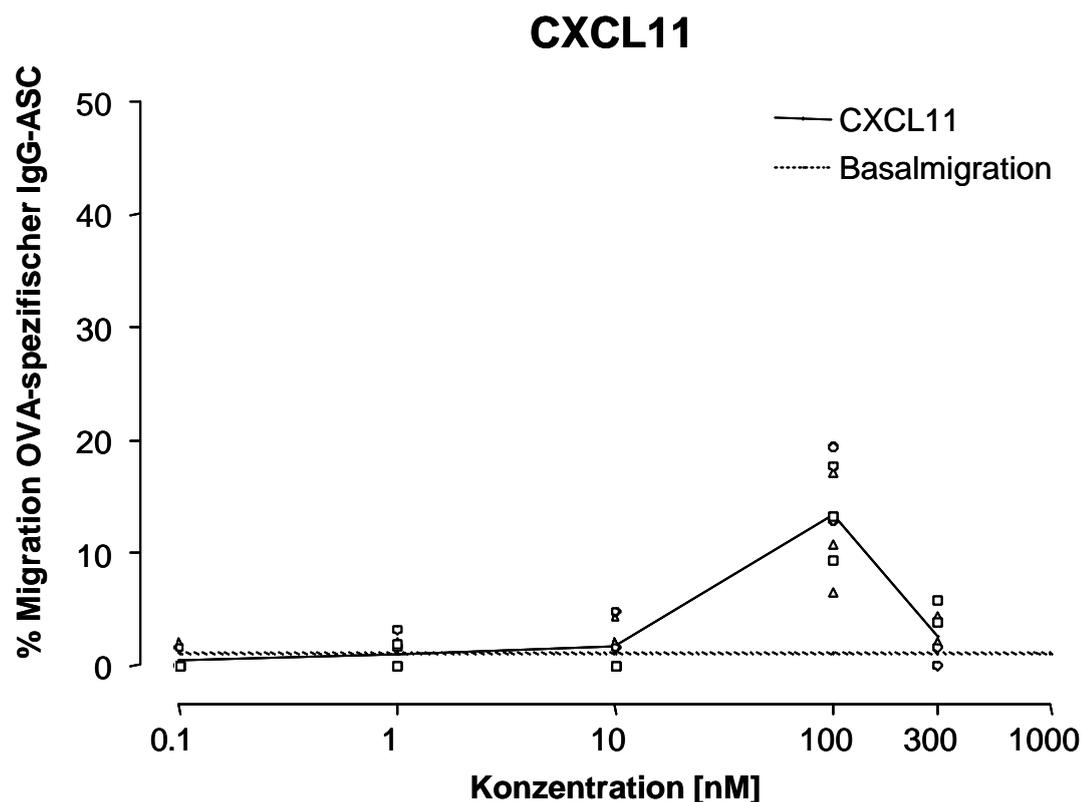


Abbildung 11: Migration von OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach Sekundärimmunisierung mit OVA zu verschiedenen Konzentrationen von CXCL9, CXCL10 und CXCL11.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die durchgezogene Linie verbindet die Mittelwerte der Messungen an den verschiedenen Zeitpunkten. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert der Basalmigration aus den Experimenten dar.

Im Checkerboard-Versuch war gegen keinen der drei CXCR3-Liganden eine Migration der ASC ins untere Transwell®-Kompartiment nachweisbar, es konnte somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Migration gegen diese Chemokine um Chemotaxis handelte (Abb. 12).

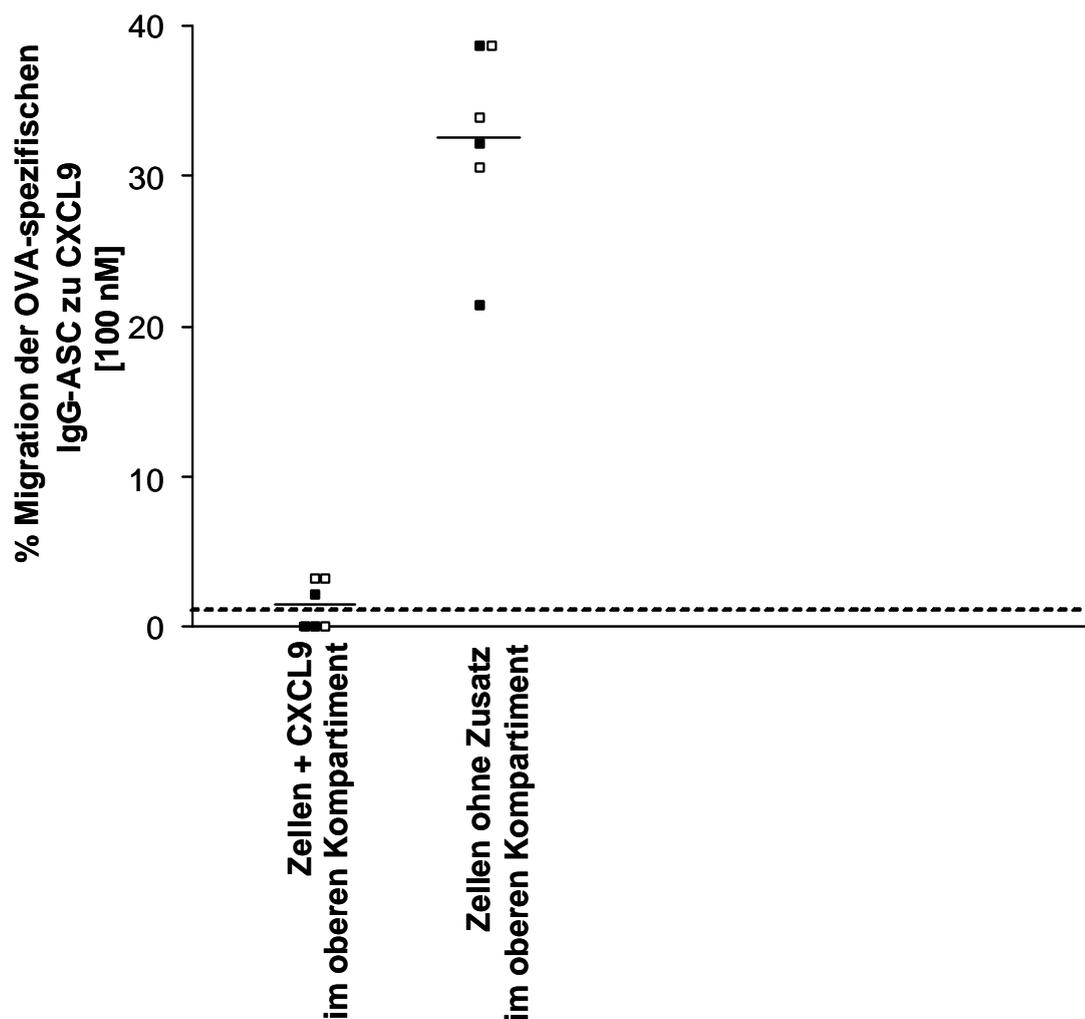


Abbildung 12: Chemotaxis und Chemokinese OVA-spezifischer IgG-ASC zu CXCL9.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. CXCL9 wurde in der zuvor ermittelten Optimalkonzentration von 100 nM in beide Kompartimente bzw. nur in das untere Kompartiment gegeben. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert der Basalmigration der OVA-spezifischen IgG-ASC in den beiden Experimenten. Ähnliche Resultate wurden mit den anderen CXCR3-Liganden CXCL10 und CXCL11 erzielt.

5.2.3 Chemotaxis gegen Liganden von CXCR3 und CXCR4 an Tag 6

Wurden die Chemotaxis von OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 6 getestet, so unterschied sich der Anteil der migrierten Zellen nicht von dem an Tag 4, ihre Gesamtzahl in der Ausgangszellsuspension im oberen Kompartiment der Transwells® war jedoch erwartungsgemäß geringer (im Mittel von drei durchgeführten Experimenten 548 OVA-spezifische IgG-ASC pro 5×10^5 mononukleäre Zellen an Tag 4 und 166 OVA-spezifische IgG-ASC pro 5×10^5 mononukleäre Zellen an Tag 6).

5.2.4 Handelt es sich bei den IgG-ASC, die zu CXCR3-Liganden migrieren, um andere als die, auf die der CXCR4-Ligand CXCL12 chemotaktisch wirkt?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Chemotaxis der ASC ermittelt, wenn im unteren Kompartiment der Transwells® sowohl ein CXCR3-Ligand (hier dargestellt: CXCL9) als auch CXCL12 vorhanden war. Dies wurde mit der Migration zu den beiden einzelnen Chemokinen im selben Experiment verglichen. In Abb. 13 ist der Anteil von OVA-spezifischen IgG-ASC dargestellt, die unter den verschiedenen Bedingungen migrierten.

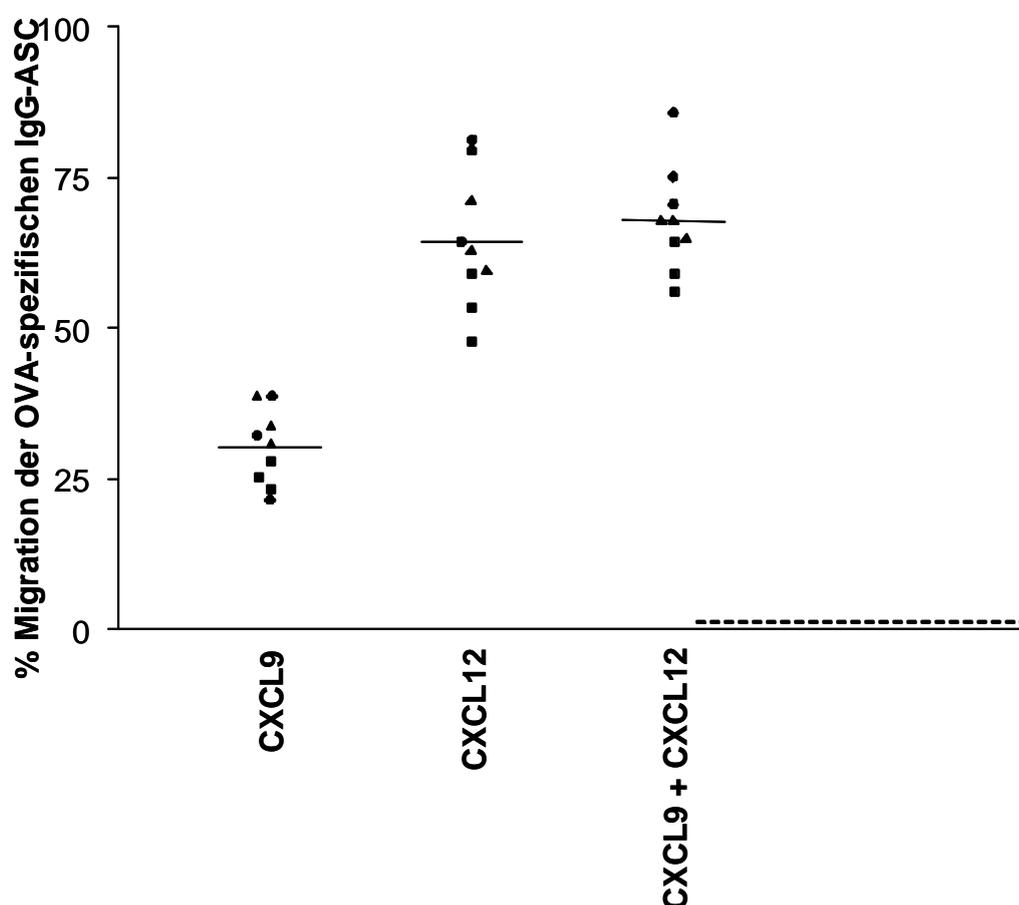


Abbildung 13: Migration von OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach Sekundärimmunisierung zu CXCL9, CXCL12 einzeln und zu einer Kombination beider Chemokine.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. In den Experimenten wurde die jeweils optimale Konzentration der Chemokine eingesetzt (CXCL9: 100 nM, CXCL12: 10 nM). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert der Basalmigration der OVA-spezifischen IgG-ASC in den drei Experimenten. Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn anstelle von CXCL9 die anderen CXCR3-Liganden eingesetzt wurden.

5.2.5 Chemotaxis gegen andere Chemokine

Bei allen restlichen Chemokinen, die an Tag 4 getestet wurden, konnte keine Migration oberhalb der Basalmigration von 1,5 % festgestellt werden. Als Beispiel ist in Abb. 14 ein Experiment gezeigt, in dem die Chemotaxis zu CXCL13 (BLC) getestet wurde. Alle überprüften Chemokine sind in Tabelle 3 aufgelistet.

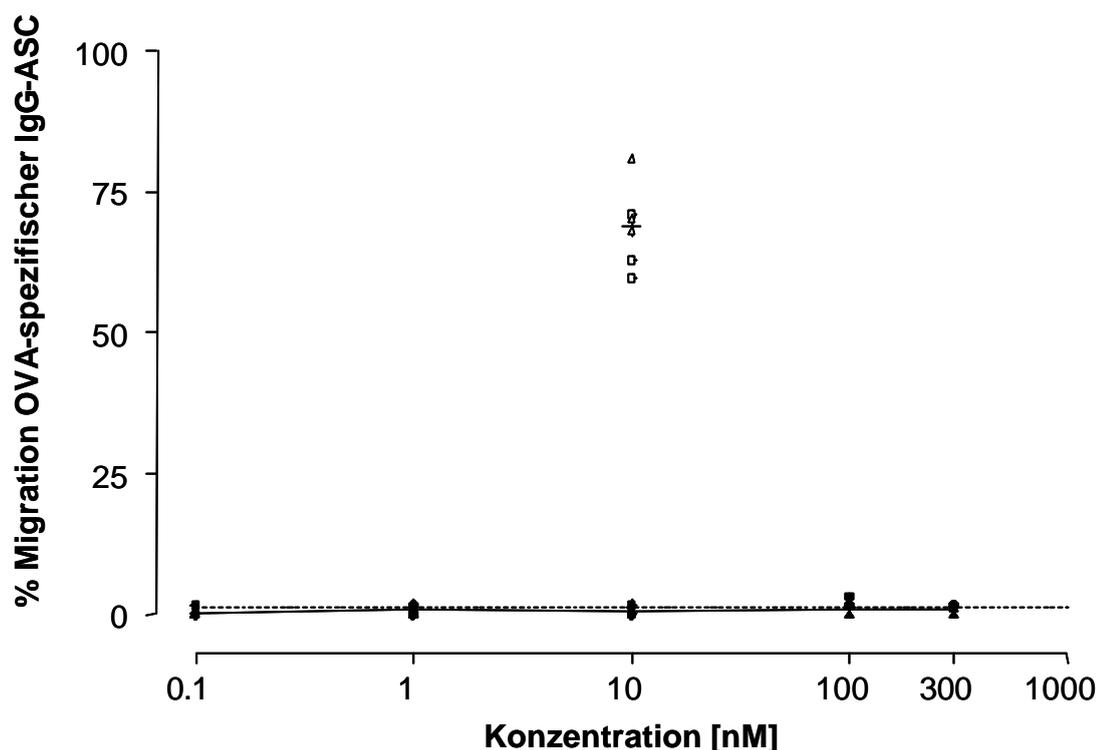


Abbildung 14: Chemotaxis von Antigen-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach Sekundärimmunisierung mit OVA zu verschiedenen Konzentrationen von CXCL13.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Nicht ausgefüllte Symbole kennzeichnen die Einzelwerte der Positivkontrollen (Migration der OVA-spezifischen IgG-ASC zu CXCL12). Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert der Basalmigration der OVA-spezifischen IgG-ASC in den beiden Experimenten.

Rezeptor	Getesteter Ligand	Migration
CCR1	CCL3	-
CCR2	CCL2	-
CCR3	CCL11	-
CCR4	CCL17	-
CCR5	CCL4	-
CCR6	CCL20	-
CCR7	CCL19	-
CCR8	CCL1	-
CCR9	CCL25	-
CCR10	CCL27	-
CXCR1	CXCL6	-
CXCR2	CXCL6	-
CXCR3	CXCL9, 10, 11	+
CXCR4	CXCL12	+
CXCR5	CXCL13	-
XCR1	XCL1	-
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1	-

Tabelle 3: Übersicht über die Chemokine, zu denen die Chemotaxis bei den OVA-spezifischen IgG-ASC aus der Milz am Tag 4 nach Sekundärimmunisierung getestet wurde.

Einzelheiten sind im Text erläutert.

Sofern dies möglich war, wurden Positivkontrollen für die Funktionalität der Chemokine durchgeführt, diese sind in der Tabelle 4 zusammen mit der Art der analysierten Zellen und dem Anteil der jeweils migrierten Zellen vermerkt. Da einige Chemokine nur auf ganz bestimmte Zellarten chemotaktisch wirken, konnten diese Kontrollen nicht in allen Fällen durchgeführt werden. Bei den verwendeten Chemokinen handelte es sich mit der Ausnahme von CCL17 um kommerziell erhältliche, rekombinante Proteine, daher kann davon ausgegangen werden, dass die Funktionalität der einzelnen Chargen vom Hersteller überprüft

worden war. In allen Versuchen wurde die Migration zu CXCL12 als Positivkontrolle für die Fähigkeit der jeweils verwendeten Zellen zur Chemotaxis verwendet.

Chemokin	Zellart	Migration
CCL4	CD4 ⁺ T-Zellen (<i>in vitro</i> aktivierte Th1-Zellen)	40 %
CCL11	Eosinophile Granulozyten	>50 %
CCL17	CD4 ⁺ T-Zellen	15 %
CCL21	CD4 ⁺ T-Zellen	75 %
CCL19	CD4 ⁺ T-Zellen	75 %
CXCL9	CD4 ⁺ T-Zellen	25 %
CXCL12	CD4 ⁺ T-Zellen	40 %
CXCL13	CD4 ⁺ T-Zellen	15 %

Tabelle 4: Positivkontrollen für die in den Experimenten verwendeten Chargen der rekombinanten Chemokine.
Einzelheiten sind im Text erläutert.

5.3 Chemotaxis von Antikörper sezernierenden Zellen aus dem Knochenmark

Die Chemotaxis wurde bei diesen Zellen an zwei verschiedenen Zeitpunkten in der Sekundärantwort auf OVA geprüft, die sich aus der in Abb. 7 gezeigten Kinetik ergaben: Zum einen wurde die Migration zum Zeitpunkt ihres Erscheinens im Knochenmark an Tag 6 nach Sekundärimmunisierung getestet, zum anderen wurde ein Zeitpunkt gewählt, an der sich die eingewanderten Zellen schon länger in ihrem Zielorgan befanden, nämlich am Tag 12. Es wurden diejenigen Chemokine analysiert, mit denen zuvor bei den Zellen aus der Milz Chemotaxis ausgelöst werden konnte.

5.3.1 Chemotaxis an Tag 6 und Tag 12 nach Sekundärimmunisierung

Die Chemotaxis gegen CXCL9, 10, 11 und 12 wurde zunächst an Tag 6 nach der Sekundärimmunisierung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt migrierten gegen diese Chemokine prozentual etwa gleich viele Ovalbumin-spezifische IgG-ASC aus der Milz wie aus dem

Knochenmark. Dies galt sowohl für CXCL12 als auch für die CXCR3-Liganden, von denen in Abb. 15 exemplarisch CXCL9 dargestellt ist. Als nächstes wurde die Migration der IgG-ASC aus dem Knochenmark am Tag 12 nach der Sekundärimmunisierung getestet. Im Gegensatz zum Tag 6 ließ sich im Transwell®-Versuch durch keines der vier Chemokine eine Migration der Zellen auslösen. Die Chemokine wurden in einem breiten Konzentrationsbereich zwischen 300 nM und 0,1 nM getestet.

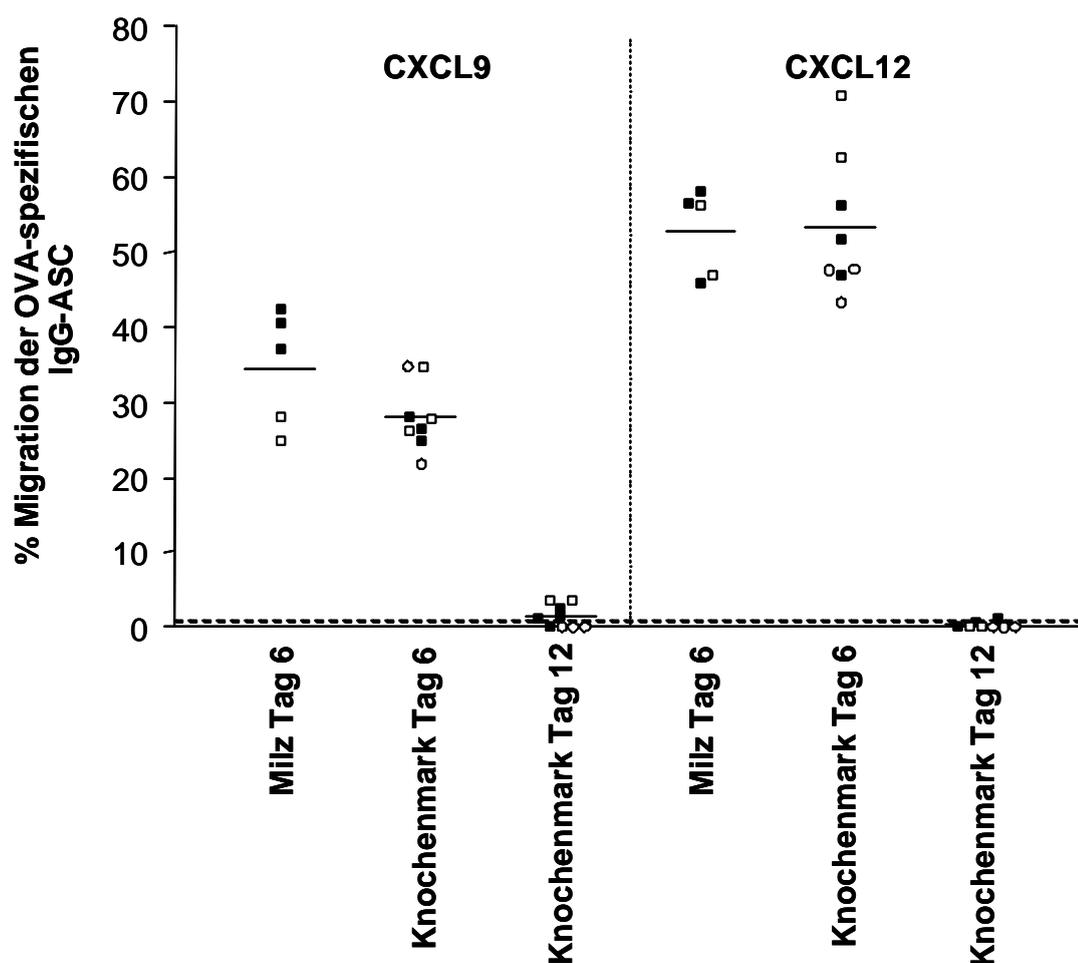


Abbildung 15: Chemotaxis von Antigen-spezifischen IgG-ASC aus dem Knochenmark an Tag 6 und Tag 12 nach Sekundärimmunisierung mit OVA zu CXCL9 und CXCL12.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert der Basalmigration der OVA-spezifischen IgG-ASC in den beiden Experimenten.

Das gleiche Chemotaxisexperiment wurde auch durchgeführt, nachdem die Zellen nach der Gewinnung der mononukleären Zellen und den folgenden zwei Waschschrinen für 3 Stunden

in Chemokin-freiem Medium im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ vorinkubiert worden waren. Hierdurch sollte eine eventuelle Desensibilisierung und Internalisierung der Chemokinrezeptoren durch ihre Liganden, die im Gewebe bzw. in der Zellsuspension vorhanden sein können, reversibel gemacht werden. Die Fähigkeit, gegen einen Gradienten von CXCR3- bzw. CXCR4-Liganden zu migrieren, wurde durch die Vorinkubation im Chemokin-freien Medium nicht wiederhergestellt (Abb. 16). Die Anzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC im Knochenmark pro 5×10^5 mononukleäre Zellen betrug 374 an Tag 6 und 198 an Tag 12. In der Milz war ihre Zahl an Tag 12 schon zu gering, um ein Chemotaxisexperiment durchführen zu können.

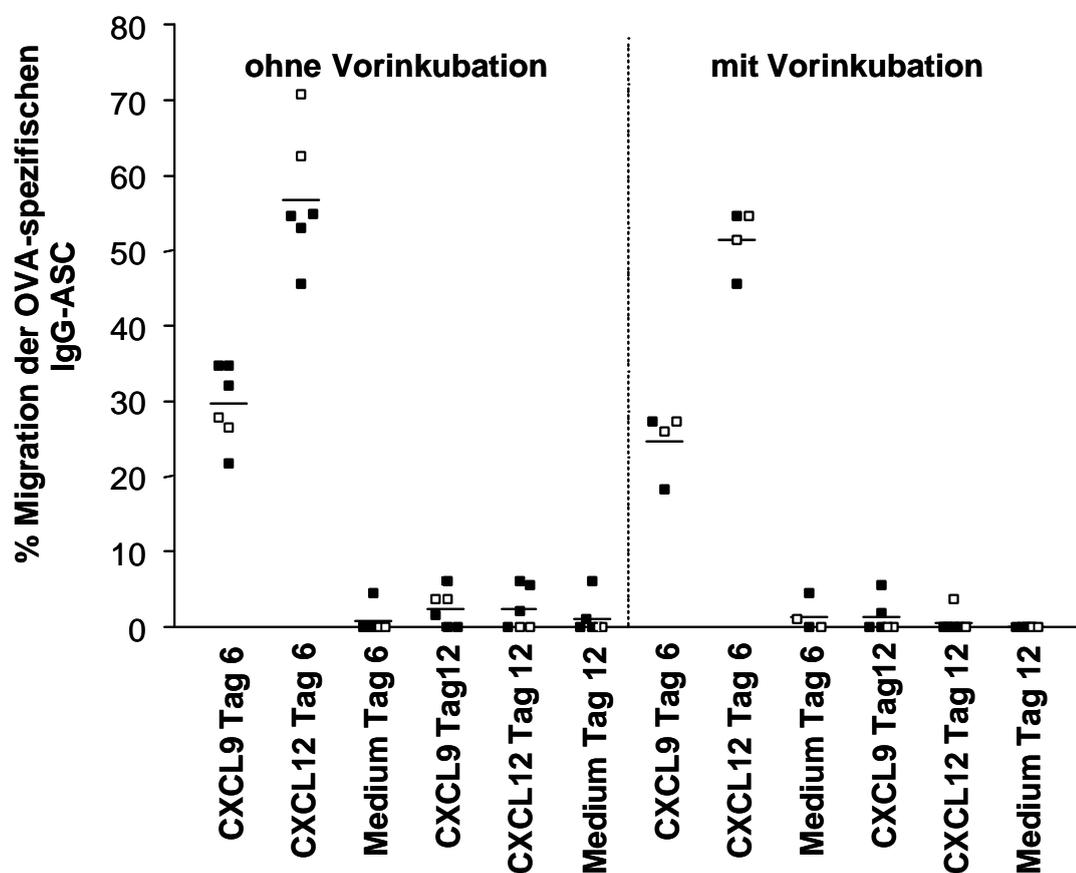


Abbildung 16: Migration von OVA- spezifischen IgG-ASC aus dem Knochenmark mit und ohne Vorinkubation in Chemokin-freiem Medium.

Die Chemotaxis wurde in Transwell®-Versuchen geprüft und die OVA-spezifischen IgG-ASC mittels ELISPOT quantifiziert. Gezeigt ist der Anteil der OVA-spezifischen IgG-ASC, der in das untere Kompartiment der Transwells® migrierte bezogen auf die Gesamtzahl von OVA-spezifischen IgG-ASC, welche auf die Transwells® gegeben wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit zwei bzw. vier Tieren. Werte, die innerhalb des gleichen Experiments ermittelt wurden, sind mit identischen Symbolen gekennzeichnet.

5.4 Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 an der Oberfläche der Plasmazellen

Wie unter 5.3 beschrieben, zeigten IgG-sezernierende Zellen aus dem Knochenmark im Transwell®-Experiment an Tag 6 und Tag 12 ein unterschiedliches Migrationsverhalten gegen Gradienten von CXCL12 und CXCL9: Während die Zellen an Tag 6 zu beiden Liganden migrierten, hatten sie diese Fähigkeit bis Tag 12 verloren. Da ausgeschlossen werden konnte, dass die Zellen infolge kurzfristiger Rezeptordesensibilisierung refraktär waren, sollten die Gründe für den Verlust der Chemotaxis am Tag 12 weiter untersucht werden. Es kamen hierfür sowohl eine nicht mehr vorhandene Rezeptorexpression an der Oberfläche, andererseits aber auch ein Regulationsmechanismus, der im Ablauf der Signaltransduktion unterhalb der Rezeptorebene lag, in Frage. Zunächst wurde Durchflusszytometrisch die Expression von CXCR4 auf der Oberfläche der Zellen untersucht.

5.4.1 Identifizierung der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen im Durchflusszytometer

Um die Spezifität dieser Färbung zu überprüfen, wurde sie vergleichend auf Knochenmarkszellen von nicht immunisierten Mäusen sowie am Tag 12 nach der Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin durchgeführt. In Abb. 17 kann man erkennen, dass es in nicht-immunisierten Tieren eine Population gab, die das Proteoglykan CD138 (Syndecan-1), einen Marker für murine Plasmazellen, an der Zelloberfläche exprimierte. Bei den immunisierten Mäusen konnte man zusätzlich eine Population erkennen, die positiv für CD138 war (CD138⁺) und auch OVA an der Zelloberfläche gebunden hatte. Diese Zellen machten an Tag 12 etwa 0,1 % aller analysierten Zellen aus, in den nicht immunisierten Kontrollen betrug ihr Anteil weniger als ein Zehntel dieses Wertes. Es handelte sich hierbei um die OVA-spezifischen Plasmazellen.

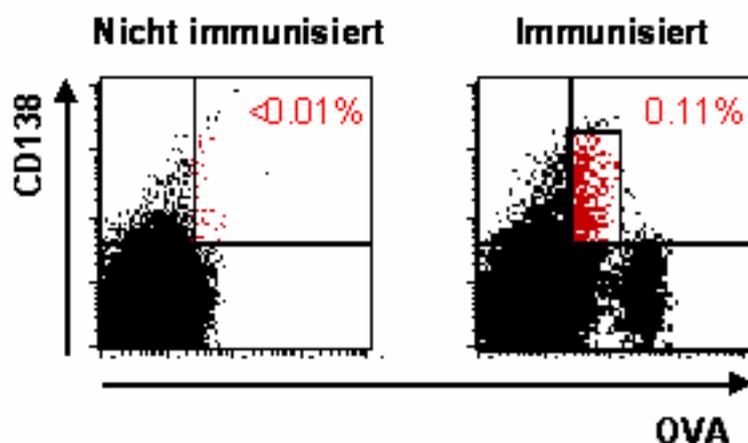


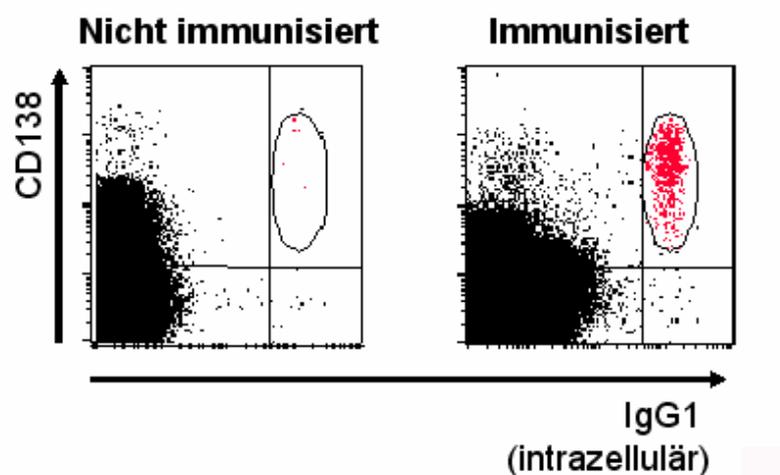
Abbildung 17: Identifizierung von OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark von Mäusen vor und nach der Immunisierung.

Knochenmarkszellen von Mäusen an Tag 6 nach Sekundärimmunisierung (rechtes Bild) sowie von nicht immunisierten Kontrolltieren (linkes Bild) wurden gewonnen und OVA-spezifische Plasmazellen wurden im FACS durch die Expression des Oberflächenmarkers CD138 sowie der Fähigkeit der Zellen, OVA zu binden, identifiziert. Die doppelt positiven OVA -spezifischen Plasmazellen und ihre Frequenzen sind rot dargestellt. Es wurden pro Färbung 500 000 Zellen analysiert. Dargestellt sind die lebenden Zellen, tote Zellen wurden mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Ein repräsentatives Beispiel aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist hier gezeigt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den CD138⁺-Zellen, die OVA an der Oberfläche gebunden hatten, tatsächlich um Plasmazellen handelte, wurde eine Färbung der in diesen Zellen enthaltenen Immunglobuline durchgeführt. Dazu wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und dann mit Antikörpern gegen IgG1 intrazellulär gefärbt. Es ließ sich feststellen, dass die CD138⁺-Zellen größtenteils auch positiv für diese Immunglobuline waren (Abb. 18). Es ist bekannt, dass bei Mäusen in der Sekundärantwort gegen Ovalbumin bei dem hier angewandten Immunisierungsprotokoll über 90 % der Plasmazellen Antikörper dieses Isotyps bzw. dieser Unterklasse produzieren (32). Aus den Färbungen war ersichtlich, dass es sich bei den CD138⁺-Zellen um Plasmazellen handelte. In der nicht-immunisierten Kontrolle ließen sich keine IgG1⁺-Zellen feststellen, was auf die Haltung der Tiere unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen zurückzuführen war. Die CD138⁺-Zellen hatten, wie aus Abb. 17 ersichtlich, Ovalbumin an ihrer Oberfläche gebunden. Dies geschieht bei denjenigen Plasmazellen, die spezifisch für dieses Protein sind, über die an der Zelloberfläche vorhandenen Immunglobuline. Im Verlauf ihrer Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen nimmt die Expression der Oberflächen-Immunglobuline ab. Ein Teil davon ist jedoch noch auf den Plasmazellen vorhanden, die dadurch fähig sind, das Antigen ihrer Spezifität zu binden. Die stärker Ovalbumin-bindenden B-Zellen waren zusammen mit

Makrophagen, die mit Immunglobulinen opsonisiertes Ovalbumin über Fc-Rezeptoren an ihrer Oberfläche binden, in der CD138-negativen ($CD138^-$) Population enthalten, was durch eine Färbung mit dem B-Zell-Marker B220 (CD45R) sowie mit dem Makrophagen-Marker Mac-1 (CD11b) bestätigt werden konnte.

A



B

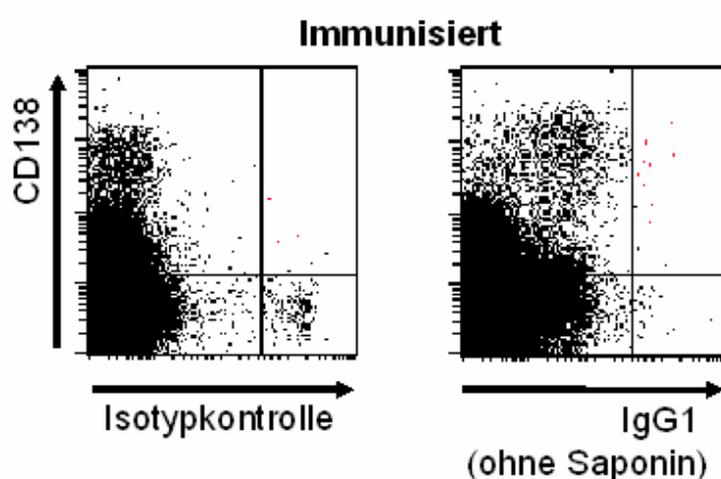


Abbildung 18: Intrazelluläre Färbung von IgG1 bei OVA-spezifischen Plasmazellen.

Die Knochenmarkszellen von Mäusen an Tag 6 nach OVA-Sekundärimmunisierung sowie von nicht immunisierten Kontrolltieren wurden mit dem Oberflächenmarker CD138 und mit OVA gefärbt wie in Abb. 17 dargestellt. Dann wurde eine intrazelluläre Färbung von IgG1 durchgeführt (A). Die $CD138^+OVA^+$ Zellen sind hier rot dargestellt. Sie enthalten intrazelluläres IgG1. Die Frequenz der Zellen im rechten oberen Quadranten beträgt bei den immunisierten Tieren 0,13 % und bei den Kontrolltieren weniger als 0,01 %. Als Kontrollen der intrazellulären Färbung wurden eine Isotypkontrolle sowie eine Färbung mit IgG1 auf nicht permeabilisierten Zellen (ohne Saponinbehandlung) durchgeführt (B) Die Frequenz der Zellen im rechten oberen Quadranten betrug bei beiden Kontrollen weniger als 0,01 %. Es wurden pro Färbung 500 000 Zellen analysiert. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist hier gezeigt.

Die intrazelluläre Färbung von IgG1 bestätigte die Spezifität der Oberflächenfärbung. Mit der Kombination aus anti-CD138 und Ovalbumin ließen sich demnach Plasmazellen, die nach der Immunisierung mit OVA spezifisch für dieses Antigen waren, im Durchflusszytometer nachweisen.

5.4.2 Expression von CXCR4 an der Oberfläche von Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen aus dem Knochenmark

Zum Vergleich der CXCR4-Oberflächenexpression an Tag 6 und Tag 12 nach der Ovalbumin-Sekundärimmunisierung wurden die Plasmazellen zusätzlich mit Antikörpern gegen das murine CXCR4-Molekül gefärbt. Aus Abb. 19 A ist ersichtlich, dass 56 % der Plasmazellen am Tag 6 positiv für CXCR4 (CXCR4⁺) sind. An Tag 12 ist – trotz nicht mehr vorhandener Chemotaxis zu CXCL12 – ein noch höherer Anteil an Plasmazellen CXCR4⁺. Die Intensität der Färbung erscheint am Tag 12 stärker, allerdings läßt sich aufgrund der insgesamt geringen Zahl von Plasmazellen keine genaue quantitative Aussage darüber treffen. Als Kontrollen für die Spezifität der Färbung wurden die Zellen mit einem 100-fachen Überschuss von ungekoppeltem Antikörper gegen CXCR4 für 10 Minuten vorinkubiert (geblockt) bevor mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurde. Wenn es sich um eine unspezifische Bindung des CXCR4-Antikörpers gehandelt hätte, so wären die Bindungsstellen nicht abzusättigen, so dass trotz der vorhergehenden Blockierung eine Bindung des gekoppelten Antikörpers erfolgt wäre. Wie in Abb. 19 B erkennbar ist, ließ sich die Färbung blockieren. Als weitere Kontrolle wurde die so genannte Isotypkontrolle durchgeführt. Deren Prinzip basiert darauf, dass man die Zellen mit einem Antikörper inkubiert, von dem man weiß, dass er keines der Antigene, die auf den zu untersuchenden Zellen vorhanden sind, bindet. Bezüglich seiner sonstigen Eigenschaften, also der Spezies, aus der er gewonnen wurde, seines Isotyps und des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes gleicht der Antikörper genau dem zu prüfenden Antikörper. In Abb. 19 C sieht man, dass der als Isotypkontrolle verwendete Antikörper nur in geringem Maße an die Plasmazellen gebunden hatte. Beide Kontrollen bestätigten die Spezifität der CXCR4-Färbung.

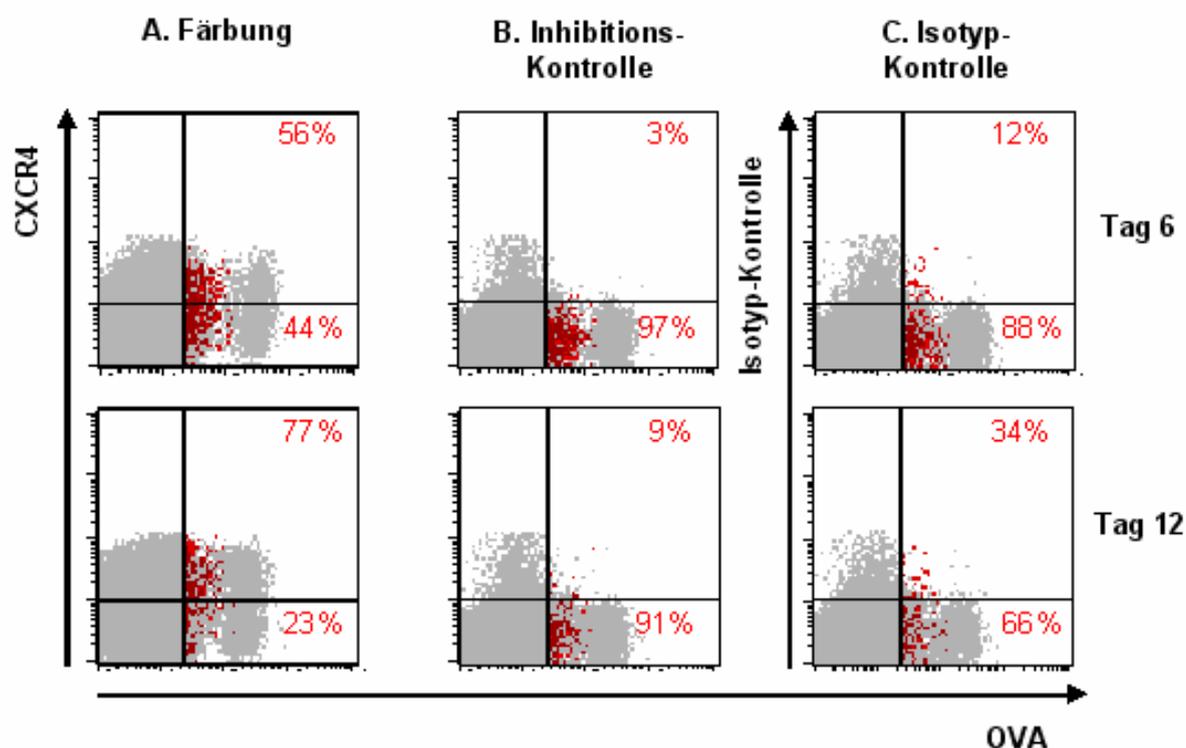


Abbildung 19: FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 auf Zellen aus dem Knochenmark. Die Zellen wurden an der Oberfläche für CXCR4 gefärbt (A). Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden die Zellen mit einem Überschuss an nicht-fluoreszenzmarkiertem Antikörper vorinkubiert (Inhibierung) und dann gefärbt (B), bzw. eine Isotypkontrolle durchgeführt (C). In der oberen Reihe sind Zellen aus dem Knochenmark am Tag 6 nach der Immunisierung dargestellt, die untere zeigt die Zellen am Tag 12. Pro Färbung wurden 500 000 Zellen analysiert. OVA-spezifische Plasmazellen wurden als CD138⁺OVA⁺ identifiziert (analog zu Abb. 17) und sind hier rot dargestellt. Die Frequenzangaben in den Quadranten beziehen sich auf diese Zellen. Dargestellt sind die lebenden Zellen, tote Zellen wurden mittels PI-Färbung identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist hier gezeigt.

5.4.3 Zelltransfer von Ovalbumin-spezifischen ASC aus der Milz

Die beschriebenen Resultate deuteten darauf hin, dass es sich bei der Translokation der Population OVA-spezifischer IgG-ASC um eine durch Chemokine vermittelte Migration handelte. Diese Translokation war ausschließlich bei einer Sekundärantwort zu beobachten (Abb. 6 und 7). Neben intrinsischen Unterschieden der aus Primär- und Sekundärantworten stammenden ASC kam als Ursache hierfür eine Veränderung des Chemokinmilieus im Körper in Frage. Es sollte nun untersucht werden, ob die nach der Sekundärimmunisierung im Knochenmark herrschenden Bedingungen sich von denen bei der Primärantwort unterschieden. Dies ließ sich mittels eines Zelltransfer-Experiments überprüfen. Dazu wurde eine definierte Zahl Milzzellen von Mäusen, die 8 Wochen zuvor mit OVA in Aluminium-

Magnesium-Hydroxid als Adjuvans primärimmunisiert worden waren, in syngene Rezipienten transferiert, die noch nie Kontakt mit OVA gehabt hatten. Eine Gruppe von Rezipienten war 8 Wochen früher mit Bovinem Serum-Albumin (BSA) in Aluminium-Magnesium-Hydroxid primärimmunisiert worden, während die andere Gruppe nicht immunisiert war. Zusammen mit den Zellen wurde allen Rezipienten sowohl OVA als auch BSA in einer für Sekundärimmunisierungen gebräuchlichen Dosis von jeweils 100 µg verabreicht. Mit der Zugabe von OVA sollte erreicht werden, dass die Aktivierung der OVA-spezifischen ASC (bzw. ihre Entstehung aus Gedächtnis-B-Zellen) in der Milz der Donoren zeitgleich mit dem Zelltransfer erfolgte. Das BSA bewirkte, dass bei den Rezipienten, die schon mit diesem Antigen primärimmunisiert worden waren, dann die Bedingungen einer Sekundärimmunisierung herrschten. Die zweite Gruppe von Rezipienten bekam zum Zeitpunkt des Zelltransfers das erste Mal BSA verabreicht. Die Tiere beider Gruppen wurden am Tag 6 nach dem Transfer getötet und ihre Milzen und das Knochenmark wurden mittels ELISPOT auf das Vorhandensein OVA-spezifischer IgG-ASC untersucht. In Abb. 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Daraus ist erkennbar, dass die ASC fast ausschließlich im Knochenmark, nicht jedoch in der Milz zu finden waren. Die Immunisierung mit BSA schien die Zahl der OVA-spezifischen IgG-ASC im Knochenmark nicht zu beeinflussen, denn beide Gruppen von Rezipienten wiesen eine vergleichbare Anzahl dieser Zellen im Knochenmark auf.

Transfer von Milzzellen nach Sekundärimmunisierung mit OVA

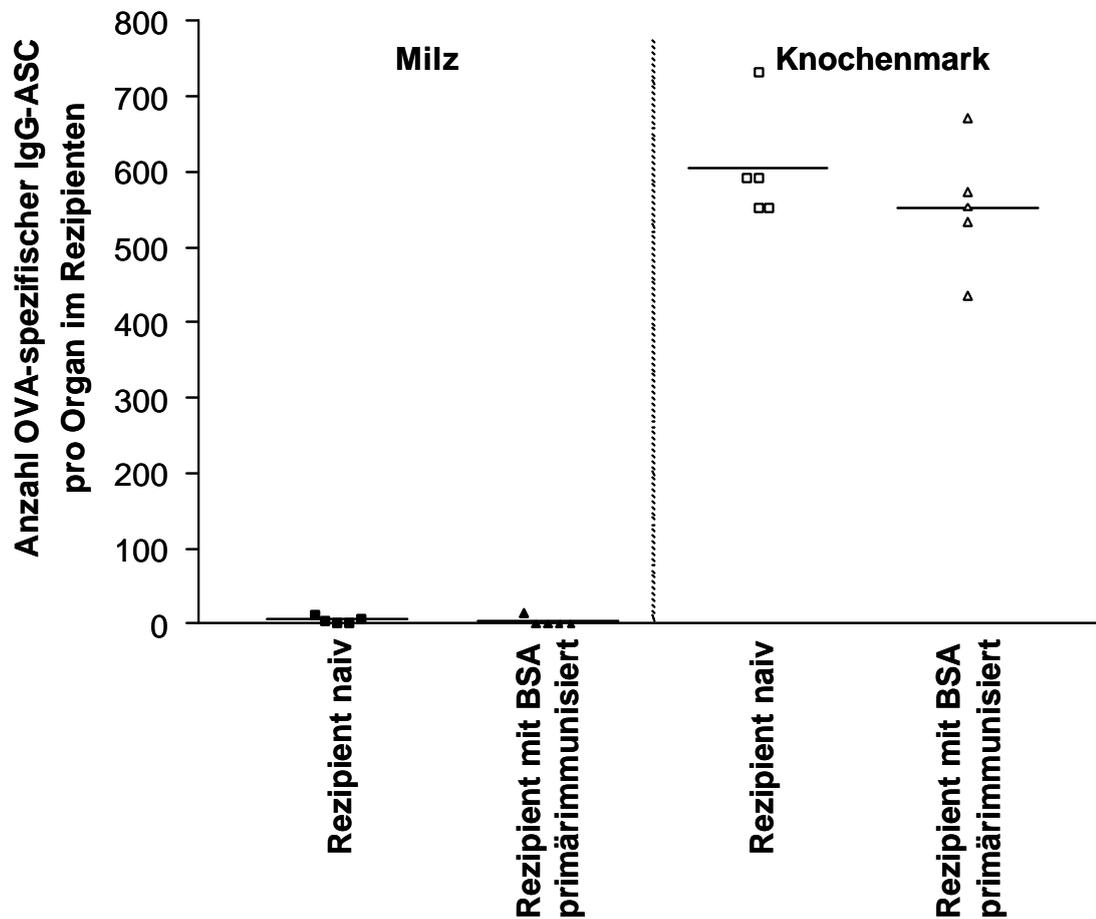


Abbildung 20: Anzahl OVA-spezifischer IgG-ASC in Milz und Knochenmark von Mäusen, denen Milzzellen zusammen mit BSA transferiert worden waren.

Die Donoren der Milzzellen waren zuvor mit OVA sekundärimmunisiert worden. Ein Teil der Rezipienten hatte eine Primärimmunisierung mit BSA erhalten (Einzelheiten siehe Text). Die Gesamtzahl der OVA-spezifischen IgG-ASC pro Organ wurde mittels ELISPOT ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie die jeweiligen Mittelwerte der verschiedenen Gruppen. Die Werte aus den Versuchen mit Knochenmarkszellen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test statistisch analysiert. Die Unterschiede zwischen naiven und primärimmunisierten Rezipienten wurden als nicht signifikant angesehen, da $p > 0,05$.

5.5 Chemokinexpression im gesunden und chronisch entzündeten Gewebe

Den Liganden von CXCR3 ist gemeinsam, dass ihre Bildung im Verlauf von Entzündungen im Gewebe induziert wird (114). Die zuvor beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine Rolle der Liganden von CXCR3 bei der Migration von Antikörper-sezernierenden Zellen vom Ort ihrer Bildung, den sekundären lymphatischen Organen (hier der Milz), in entzündetes Gewebe hin. Nun sollte die Expression von mRNA der entsprechenden Liganden in diesen Geweben überprüft werden. Es wurde Organmaterial von nicht-immunisierten BALB/c-Mäusen sowie nach Primär- und Sekundärimmunisierung mit OVA analysiert. Zur Untersuchung von entzündetem Gewebe wurden Nieren von weiblichen (NZB/W)F1-Mäusen gewählt. In diesem Mausmodell für humanen Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) tritt bei den weiblichen Tieren etwa im Alter von 5 Monaten eine klinisch manifeste chronische Glomerulonephritis auf. Antikörper sind an der Pathogenese beteiligt (89). Es wurden Tiere im Alter von 4 und 6 Monaten untersucht. Als Nachweismethode wurde die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Lightcycler®-Technologie) gewählt, mit der eine relative Quantifizierung der im Gewebe enthaltenen Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) möglich ist (115).

5.5.1 Normalisierung der cDNA

Um die Menge an ursprünglich vorhandener Chemokin-mRNA in verschiedenen Gewebeproben vergleichen zu können war es zunächst nötig, diese Proben nach dem Umschreiben der mRNA in Copy-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) auf eine gemeinsame Bezugsgröße zu normalisieren. Als Maßstab wurde das Haushaltsgen β -Actin gewählt, bei dem man voraussetzt, dass es konstitutiv exprimiert und nicht durch entzündliche Vorgänge induzierbar bzw. reguliert ist. Die Expression von β -Actin wurde in den einzelnen Proben relativ zueinander mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Dann wurden die Proben so verdünnt, dass in allen dieselbe Menge an β -Actin zu detektieren war. In Abb. 21 A und B ist beispielhaft die Messung von β -Actin in den Knochenmarksproben vor und nach der Normalisierung dargestellt. Die Zykluszahl wurde gegen die Fluoreszenzintensität von rotem Licht (640 nm) aufgetragen, welches infolge des Energietransfers (FRET) zwischen den beiden Sonden entstand.

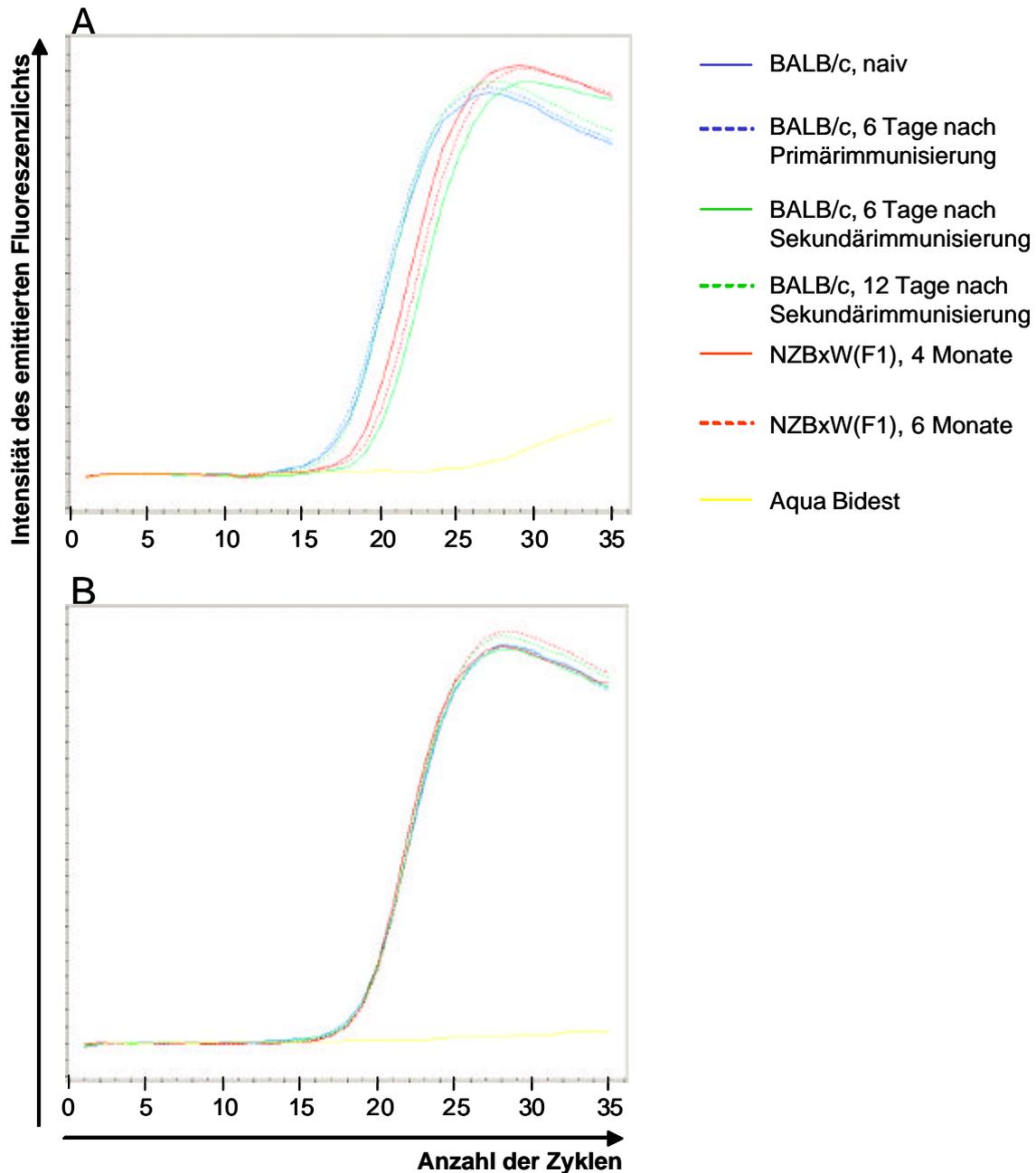


Abbildung 21 A und B: Normalisierung der cDNA aus Gewebeproben auf die jeweils enthaltene Menge an β -Actin-mRNA.

Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Gewebeproben aus dem Knochenmark vor (A) und nach (B) der Normalisierung. Die PCR-Läufe der einzelnen Proben, die in Echtzeit aufgezeichnet wurden, sind mit verschiedenfarbigen Linien gekennzeichnet. Nach der Normalisierung war in allen Proben die gleiche Menge an β -Actin vorhanden. Daher liegen die Kurven übereinander.

5.5.2 Analyse der mRNA-Expression von CXCR3- und CXCR4-Liganden bei NZB/W(F1)- und BALB/c-Mäusen

In den auf β -Actin normalisierten Proben von NZB/W(F1) und BALB/c-Mäusen wurde dann die Expression von CXCR3 und CXCR4-Liganden untersucht. In Abb. 22 ist der Ablauf einer PCR für CXCL10 in Form einer Lightcycler®-Kurve dargestellt. In 50 durchgeführten Amplifikationszyklen ließ sich eine Expression von CXCL10 bei keiner der Proben detektieren, die von gesunden BALB/c-Mäusen stammten, auch die Immunisierung mit OVA führte zu den untersuchten Zeitpunkten nicht zu einer nachweisbaren Expression von CXCL10. Dagegen war aber bei den NZB/W(F1)-Mäusen in allen drei analysierten Geweben (Milz, Niere und Knochenmark) CXCL10-Expression vorhanden, die sich jeweils nach etwa 25-30 Amplifikationszyklen detektieren ließ. Dies traf sowohl auf 4 Monate alte als auch 6 Monate alte Tiere zu. Da sich bei den Geweben, die von BALB/c-Mäusen stammten, kein Amplikon detektieren ließ, selbst wenn 25 Amplifikationszyklen mehr durchgeführt wurden als bei den NZB/W(F1), ergibt sich bei letzteren unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz eine mindestens 1115-fache Erhöhung der Genexpression von CXCL10. Die Expression von CXCL10 in der Milz der naiven BALB/c-Maus war nur in dem hier dargestellten Experiment zu detektieren. Dieses Resultat war in zwei anderen Experimenten nicht reproduzierbar. Es handelte sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Kontamination der Probe.

CXCL9 und CXCL11, die beiden anderen Liganden für CXCR3, sowie der CXCR4-Ligand CXCL12 wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Expression bei den verschiedenen Mäusen auf.

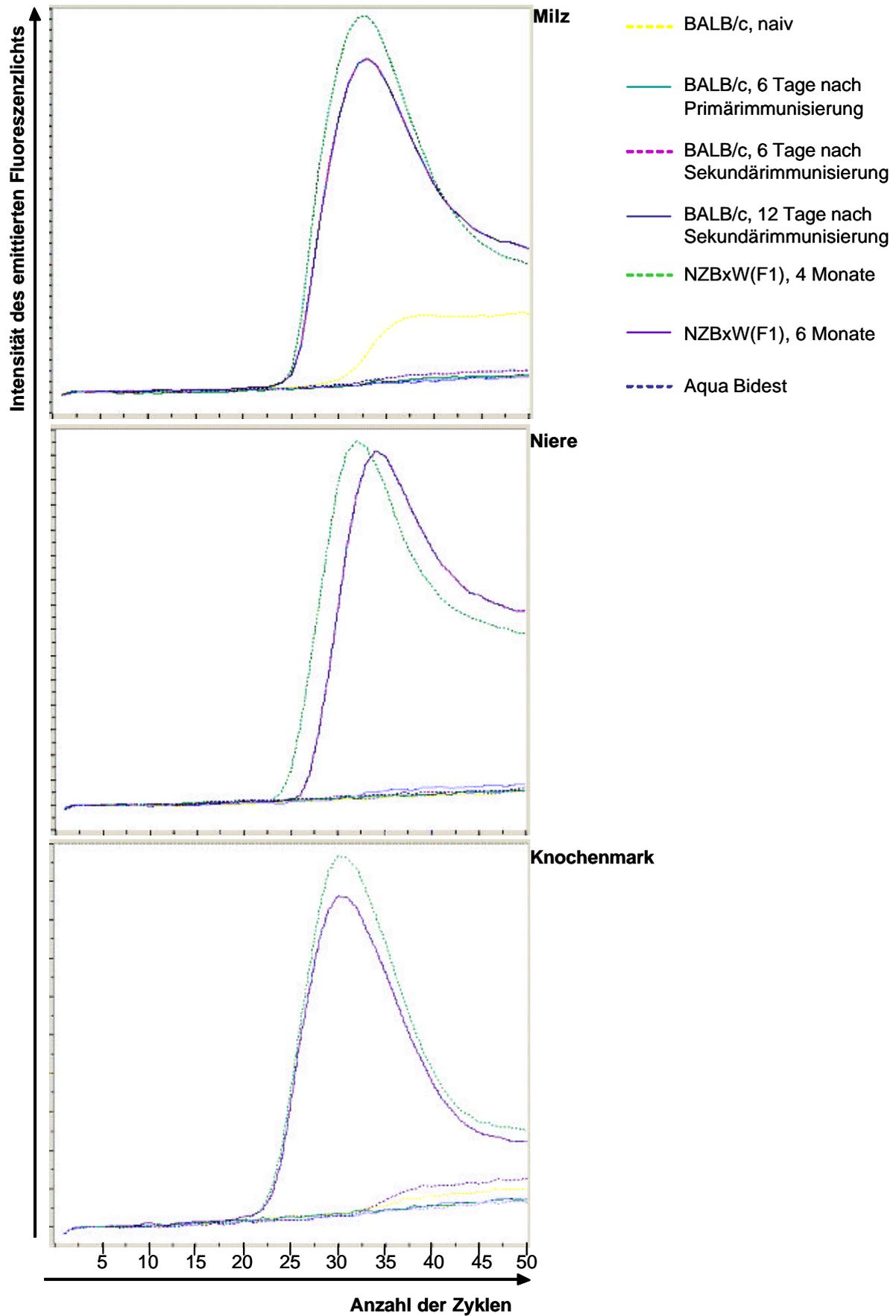


Abbildung 22: Analyse der mRNA von CXCL10 in Gewebeproben aus Milz, Niere und Knochenmark verschiedener Mausstämme.

Die PCR-Läufe der einzelnen Proben, die in Echtzeit aufgezeichnet wurden, sind mit verschiedenfarbigen Linien gekennzeichnet. In der oberen Abbildung sind die Proben aus der Milz, in der mittleren die aus der Niere und in der unteren die aus dem Knochenmark dargestellt. Die Proben waren zuvor auf die Expression von β -Actin normalisiert worden. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei voneinander unabhängig durchgeführten gezeigt. Jede Gewebeprobe stellte ein Gemisch aus den jeweiligen Organen von 3 Tieren einer Gruppe dar.