

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
2	<i>Einleitung</i>	9
3	<i>Schrifttum</i>	10
3.1	Angeborene und erworbene Immunität	10
3.2	Das erworbene Immunsystem	11
3.2.1	Aufbau und Funktion lymphatischer Organe	11
3.2.2	Antikörper - Struktur und Funktion	11
3.2.3	B-Zellentwicklung im Knochenmark	12
3.2.4	B-Zellaktivierung in sekundär lymphatischen Organen	13
3.2.5	Keimzentrumsreaktion und B-Zellgedächtnis	15
3.2.6	Stimulation von B-Zellen	16
3.2.7	Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen	17
3.3	Chemokine und Chemokinrezeptoren	18
3.3.1	Aufbau und Funktion	18
3.3.2	Verlauf der Leukozytenmigration	19
3.3.3	Chemokinrezeptorexpression und Migrationsverhalten vor und während der B-Zellaktivierung	20
3.3.4	Chemokinrezeptorexpression und Chemotaxis von Plasmazellvorläufern	21
3.3.5	Plasmazellakkumulation in entzündetem Gewebe	23
4	<i>Material und Methoden</i>	24
4.1	Übersicht über die verwendeten Materialien	24
4.1.1	Lösungen und Medien	24
4.1.2	Material für zellbiologisches Arbeiten	25
4.1.3	Reagenzien für die Zellisolierung	25
4.1.4	Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse	26
4.1.5	Reagenzien für die B-Zellstimulation	27
4.1.6	Reagenzien für die Chemotaxisversuche	28
4.1.7	ELISpot-Reagenzien	28
4.1.8	Herkunft der Zellen	29

4.2	Isolation mononukleärer Zellen	29
4.2.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Blut	29
4.2.2	Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus der Tonsille	30
4.2.3	Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Knochen	30
4.2.4	Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Darm	30
4.2.5	Zellzahlbestimmung	31
4.3	Durchflusszytometrische Analyse	31
4.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	31
4.3.2	Darstellung von Oberflächenmolekülen zur durchflusszytometrischen Untersuchung	33
4.3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung von Zellzyklen	33
4.4	Zellsortierung	34
4.4.1	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	34
4.4.2	Magnetisch-assoziierte Zellsortierung (MACS)	34
4.5	Aktivierung von B-Zellen	35
4.5.1	Aktivierung von PBMC mit Tetanus-Toxoid	35
4.5.2	Aktivierung von B-Zellen mit CD40L-exprimierenden Zellen	35
4.5.2.1	Aktivierung von B-Zellen	35
4.5.2.2	Aktivierung naiver und Gedächtnis-B-Zellen	38
4.5.3	Aktivierung über Toll-like-receptor (TLR)-9 mit CpG 2006	38
4.5.4	Aktivierung über den B-Zellrezeptor mit <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	38
4.6	Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISpot	39
4.6.1	Prinzip der Enzym-gekoppelten Immunospot Methode	39
4.6.2	Durchführung des ELISpots	39
4.7	Analyse der Chemotaxis	40
4.7.1	Prinzip der Chemotaxis-Versuche im Transwell®-System	40
4.7.2	Analyse der Chemotaxis IgG-sezernierender Zellen	41
4.8	Graphische Darstellung und Statistik	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4	43

5.1.1	Nachweis von CD38(++)/CD20(-)-B-Zellen in humanem Blut vor und nach einer Auffrischimpfung mit Tetanus-Toxoid	43
5.1.2	Expression von CXCR3 und CXCR4 auf peripheren B-Zellen und Plasmazellvorläufern des Menschen	45
5.1.3	Die Expression von CXCR3 ist mit der Co-Expression von IgG1 assoziiert	48
5.1.4	Expression von CXCR3 und CXCR4 auf tonsillären Plasmazellvorläufern	50
5.1.5	Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmablasten und Plasmazellen des Knochenmarks	51
5.1.6	Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmazellvorläufern des Darms	52
5.2	Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4	53
5.2.1	Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen mittels Tetanus-Toxoid	53
5.2.2	Stimulation von B-Zellen über CD40 (Basiskultur)	56
5.2.3	Aktivierung von naiven- und Gedächtnis-B-Zellen mit der Basiskultur	59
5.2.4	Analyse von CXCR3 und CXCR4 auf ausdifferenzierenden B-Zellen	61
5.2.5	Die Induktion der CXCR3-Expression erfolgt in der frühen Phase der B-Zellaktivierung	62
5.2.6	IFN- γ induziert die Expression von CXCR3	63
5.2.7	IFN- γ wirkt direkt auf B-Zellen	65
5.2.8	IFN- γ induziert Migrationsfähigkeit gegen CXCL9	66
5.2.9	CXCR3-Expression ist stabil nach Re-Aktivierung	68
5.2.10	CXCR4 wird konstitutiv in T-Zell-abhängiger wie T-Zell-unabhängiger Aktivierung hochreguliert	71
5.2.11	Die Hochregulation der CXCR3- und CXCR4-Expression während der terminalen B-Zelldifferenzierung ist proliferationsunabhängig	73
6	Diskussion	75
6.1	Einleitung	75
6.2	Diskussion der Ergebnisse	76
6.2.1	Die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf verschiedenen B-Zellpopulationen	76
6.2.2	Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 auf Plasmazellen und deren Vorläufern in verschiedenen lymphatischen Organen	77
6.2.3	Stimulation der B-Zellen	81
6.2.4	Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4	82

6.3	Diskussion der Methodik	85
6.3.1	Herkunft der Zellen	85
6.3.2	FACS	86
6.3.3	Stimulationsmodelle	86
6.3.4	Migrationsassay und ELISpot	87
6.4	Ausblick	88
7	Zusammenfassung	89
7.1	Expression und Regulation von CXCR3 und CXCR4 während der terminalen B-Zelldifferenzierung	89
8	Summary	92
8.1	Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells	92
9	Referenzen	94
10	Abkürzungsverzeichnis	107
11	Publikationen und Kongressbeiträge	111
11.1	Publikationen	111
11.2	Kongressbeiträge	112
12	Danksagung	114
13	Lebenslauf	115
14	Erklärung	116