

3 Schrifttum

3.1 Angeborene und erworbene Immunität

Der Schutz des Organismus vor Pathogenen wird durch das komplexe System von angeborener und erworbener Immunität aufrecht erhalten. Durch die angeborene Immunität kommt es zur schnellen einleitenden zellulären Reaktion von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten. Löslicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem. Die erworbene Immunität folgt mit einer Zeitverzögerung von vier bis sieben Tagen mit der Aktivierung antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten (14). Die erworbene humorale Antwort erfolgt mit der Sekretion von spezifischen Antikörpern ausdifferenzierter B-Zellen, den Plasmazellen und ihren unmittelbaren Vorläufern, den Plasmablasten.

Überwinden Mikroorganismen die epitheliale Barriere des Organismus, werden diese sofort aufgrund ihrer Oberflächenstruktur von Makrophagen als fremd erkannt. Die Stimulation von Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen wie auch auf neutrophilen Granulozyten führt zur Phagozytose des Erregers sowie der Freisetzung von Zytokinen, darunter auch Chemokinen. Durch die Sekretion dieser Proteine kommt es zur Änderung adhäsiver Eigenschaften des Endothels, die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen den Austritt aus der Blutbahn und die Migration gegen einen Chemokingradienten in entzündetes Gewebe ermöglicht.

Parallel zur angeborenen Reaktion wird das Pathogen von sessilen dendritischen Zellen phagozytiert und in die regionalen Lymphknoten transportiert. Dort wird das in Peptide gespaltene, auf die Zelloberfläche translozierte Antigen den T-Zellen präsentiert, die, sofern sie spezifisch für das entsprechende Antigen sind, sowohl über die Stimulation des T-Zellrezeptors als auch über Zytokine aktiviert werden (15). Auch B-Zellen sind in der Lage Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Erkennt der B-Zellrezeptor das passende Antigen, wird dieses gebunden und in die Zelle aufgenommen. Zusammen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex MHC II wird es dann der aktivierten CD4 positiven T-Helferzelle präsentiert, welche wiederum die Differenzierung der B-Zelle zur Antikörper-sezernierenden Zelle unterstützen kann.

3.2 Das erworbene Immunsystem

3.2.1 Aufbau und Funktion lymphatischer Organe

Man unterscheidet die primären/zentralen und sekundären/peripheren lymphatischen Organe. In den primär lymphatischen Organen findet die Entwicklung und Reifung der Zellen des Immunsystems statt. Ihren Ursprung haben diese Zellen im Knochenmark, welches für die meisten auch Ort der Reifung ist. Da die Reifung der T-Zellen im Thymus stattfindet, zählt dieser neben dem Knochenmark zu den primär lymphatischen Organen.

In den sekundär lymphatischen Organen finden sich viele der aus Knochenmark und Thymus ausgewanderten Lymphozyten. Dies ist der Ort, an dem Antigen und Lymphozyten aufeinander treffen und eine antigenspezifische Immunantwort eingeleitet wird. Durch Interaktionen mit dem Grundgewebe werden auch die weitere Entwicklung, das Überleben und die Lokalisation der Lymphozyten innerhalb des sekundär lymphatischen Organs reguliert. Zu den sekundär lymphatischen Organen gehören Lymphknoten, Milz und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT). In den Lymphknoten werden Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen über afferente Lymph- und Blutgefäße herantransportiert. In der Rindenzone des Lymphknoten finden sich die lymphatischen Follikel, die hauptsächlich B-Zellen und von diesen gebildete Keimzentren beherbergen. In der anschließenden parakortikalen Zone sind die T-Zellen lokalisiert. In der Milz bilden die T-Zellen in der weißen Pulpa um die Zentralarterien und deren Äste eine sogenannte periarteriole lymphatische Scheide, welche wiederum von B-Zellen flankiert wird. Den ausgeprägtesten Teil des MALT macht das GALT (gut associated lymphoid tissue) aus, zu dem u.a. Tonsille, Appendix und Peyersche-Platten des Krummdarms gehören. Hier kann Antigen an bestimmten Stellen das Darmepithel durch fenestrierte M-Zellen penetrieren und gelangt in den darunter gelegenen Dom aus B-Zellen und angrenzenden T-Zellen. Das BALT (bronchus associated lymphoid tissue) und ebenso der übrige Teil des MALT hat einen ähnlichen Aufbau, die Ansammlungen aus B- und T-Zellen sind jedoch diffuser über die Mukosa verteilt.

3.2.2 Antikörper - Struktur und Funktion

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, können gebunden auf der B-Zelle als sogenannter B-Zellrezeptor vorliegen oder von der ausdifferenzierten B-Zelle, der Plasmazelle, sezerniert werden. Die biologische Funktion von sezernierten Antikörpern ist das Binden von Pathogenen sowie das Erkennbarmachen entsprechender Substanzen für Makrophagen. Über die gebundene Form des Antikörpers können naive und Gedächtnis-B-Zellen aktiviert

werden. Antikörper erkennen sehr spezifisch den Teil des Antigens, der komplementär zu der eigenen Struktur ist. Der Teil des Antigens, den sie erkennen, wird als Epitop bezeichnet. Es werden fünf verschiedenen Antikörperklassen unterschieden, dabei handelt es sich um IgM, IgD, IgG, IgA und IgE.

Der strukturelle Aufbau eines Antikörpers soll im Folgenden am Beispiel des als Monomer vorliegenden IgG beschrieben werden. Antikörper haben in der löslichen, sezernierten Form eine Y-förmige Gestalt, die aus vier flexibel miteinander verbundenen Polypeptidketten besteht. Bei zwei der Polypeptidketten handelt es sich um die identischen schweren Ketten (50 kDa), die aus vier Immunglobulin Domänen bestehen; die anderen beiden sind die zwei - aus zwei Immunglobulin Domänen bestehenden - identischen leichten Ketten (25 kDa). Ein Antigen wird von den aminoterminalen Domänen der schweren und leichten Kette gebunden, während die Effektorfunktionen über die carboxyterminalen Domänen der schweren Ketten reguliert werden. Die carboxyterminalen Domänen beider Ketten sind in der Aminosäuresequenz konstant und werden daher auch konstante Region des Antikörpers genannt, sie bestimmen die Antikörperklasse. Der antigenbindende Teil des Antikörpers ist die sogenannte variable Region. Die Spezifität, mit der ein Antigen gebunden werden kann, erhöht sich durch Punktmutationen in bestimmten Aminosäurebereichen, den hypervariablen Regionen innerhalb der variablen Region. Dadurch kommt es zu einer Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten.

Naive B-Zellen tragen IgM auf ihrer Oberfläche. Differenzieren diese zur Plasmazelle aus, wird IgM sezerniert. Mit der Hilfe von T-Zellen und Zytokinen kann der Klassenwechsel eingeleitet werden, aus dem Antikörper mit höherer Affinität hervorgehen. Das überwiegend vorkommenden IgG wird beim Menschen noch einmal unterteilt in IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Ebenfalls in großen Mengen kommt IgA vor, das als Dimer vorliegen kann. Die sekretorische Komponente des IgA Dimers gewährleistet den Austritt aus dem Epithel in die Mukusschicht der Schleimhäute (1, 16).

3.2.3 B-Zellentwicklung im Knochenmark

Die B-Zellentwicklung, ausgehend von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, erfolgt in festgelegten, aufeinander folgenden Schritten. Im Knochenmark entwickeln sich verschiedene B-Zellvorstufen zur unreifen B-Zelle, die in Knochenmark oder Peripherie zur reifen naiven B-Zelle wird. Charakterisiert ist die B-Zellentwicklung u.a. durch die Rearrangierung der Gensegmente, welche die schweren und leichten Ketten eines Antikörpers ausmachen. Durch die Rearrangierung kommt es zu einer Vielzahl unterschiedlicher B-

Zellrezeptoren, die später in der Peripherie auf eine ebenso große Vielfalt von Antigenen reagieren können. Bereits auf der letzten Stufe der pre-B-Zelle, einer der B-Zellvorstufen, findet sich ein pre-B-Zellrezeptor. Auf der daraus hervorgehenden unreifen sowie der reifen B-Zelle wird dann der funktionale B-Zellrezeptor ausgeprägt. Bereits die unreife B-Zelle kann in sekundär lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten oder Tonsille auswandern, ist aber vor der Entwicklung zur reifen B-Zelle noch nicht in der Lage nach Antigenkontakt zur Plasmazelle auszudifferenzieren. Während all dieser Entwicklungsstufen, sowohl im Knochenmark als auch in der Peripherie, kommt es zur Selektion, d.h. Zellen, die autoreaktiv sind, gehen in Apoptose oder werden anerg (1).

3.2.4 B-Zellaktivierung in sekundär lymphatischen Organen

Nach einer kurzen unreifen Phase in der Peripherie entsteht die reife (naive) B-Zelle, die im Lymphknoten auf ihr passendes Antigen sowie auf Signale von anderen Zellen mit der Bildung von Antikörpern reagieren kann.

Bindet ein Proteinantigen an den entsprechenden B-Zellrezeptor, kommt es innerhalb von Sekunden zur Translokation des Rezeptors mit dem gebundenen Antigen (17). Auf der Zelloberfläche befinden sich außerdem Moleküle, die in der internationalen Nomenklatur unter der Bezeichnung Cluster of differentiation (CD) zusammengefasst werden. Dazu gehört auch der Komplex aus CD19/CD21, der ebenfalls eine wichtige Rolle bei der B-Zellaktivierung spielt. Ist das entsprechende Antigen vom Komplement umgeben, so bindet dies an CD21 und es kommt zur Kreuzvernetzung des CD19/CD21 Komplexes mit dem B-Zellrezeptor und in diesem Fall zu einem längeren Aufenthalt des translozierten Rezeptors in der Zellmembran. Auf diese Weise wird die Signaltransduktion verlängert (18). Die so gesteigerte B-Zellantwort resultiert aus einem verstärkten Calciumeinstrom, der Induktion von DNS-Synthese und Antikörperproduktion (19-21). Die Proliferation der B-Zellen beginnt am dritten Tag nach Antigenkontakt und erreicht ihren Höhepunkt zwischen viertem und fünftem Tag (14). In Lysosomen wird das Proteinantigen in Peptide gespalten und gelangt so, eingelagert in das MHC II-Protein, an die Oberfläche. Das Fehlen von CD19 führt zu einer deutlich reduzierten Primärantwort sowie einer eingeschränkten Keimzentrumsreaktion (22). Im Falle eines Proteinantigens ist die Hilfe von CD4(+)-T-Helferzellen zur Stimulation der B-Zellen notwendig; die T-Zellen werden durch aus dem entzündeten Gewebe einwandernde dendritische Zellen aktiviert (15). T-Helferzellen werden eingeteilt in Th1- und Th2-Zellen, erstere können anhand von IFN- γ , letztere anhand von Interleukin (IL)-4 Produktion identifiziert werden (23).

Nach Aktivierung kommt es zur Interaktion von B- und T-Zellen im an der T-Zellzone angrenzenden Teil des Follikels (14). Fehlen antigenspezifische T-Zellen, ist die klonale Expansion der B-Zellen nach einer Immunisierung deutlich reduziert (14). Bei der Interaktion zwischen B- und T-Zelle ist vor allem die Signalübertragung zwischen CD40 und CD40L von Bedeutung. CD40 gehört zu der TNF-Rezeptor-Familie und wird neben allen Entwicklungsstufen der B-Zellen auch auf dendritischen Zellen exprimiert (24). CD40L, ein Mitglied der TNF-Familie, wird innerhalb von 5-15 Minuten nach Aktivierung auf T-Helferzellen induziert (25). Nach dem Peak der CD40L-Expression nach sechs bis acht Stunden kommt es dann zum graduellen Abfall durch Endozytose und lysosomale Degradierung sowie Herunterregulieren der CD40L-mRNA-Expression (26). Die Interaktion zwischen CD40 und CD40L spielt eine entscheidende Rolle auf sämtlichen B-Zellentwicklungsstufen. Im Falle der Aktivierung reifer B-Zellen kann die Keimzentrumsreaktion, der Klassenwechsel sowie die Selektion und Reifung von Gedächtnis-B-Zellen eingeleitet werden (24). Mutationen von CD40L können beim Menschen und der Maus zum fehlenden Immunglobulin-Klassenwechsel und so zum Hyper-IgM-Syndrom führen, welches durch ein fehlendes B-Zellgedächtnis schwere Immundefizienz zur Folge hat (27, 28). Ebenfalls hemmt die Blockade von CD40L die klonale Expansion der B-Zellen (14). Die Interaktion zwischen CD40 und CD40L ist ein wichtiges co-stimulatorisches Signal, durch das unter anderem die Zytokinsekretion verstärkt und die Differenzierung beeinflusst werden kann (29). Die von T-Zellen abgegebenen Zytokine können für die Produktion bestimmter Antikörpersubklassen verantwortlich sein. Nach Daten von der Maus können bestimmte Zytokine eindeutig mit bestimmten Isotypen in Zusammenhang gebracht werden. So ist bekannt, dass $\text{IFN-}\gamma$ zur vermehrten Bildung von IgG2a und IgG3 führt, IL-4 induziert den Klassenwechsel zu IgG1 und IL-5 sowie TGF- β induzieren den zu IgA (30-32). Im humanen System ist eine derart klare Zuordnung bislang noch nicht bekannt.

B-Zellen können aber auch unabhängig von T-Zellen stimuliert werden. Die sogenannten Thymus-unabhängigen Antigene können, ohne Peptid-spezifische T-Zellhilfe, B-Zellen über Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder den B-Zellrezeptor zur Antikörperproduktion stimulieren. Während bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide oder kapsuläre Polysaccharide vorwiegend naive B-Zellen über TLR-4 respektive den B-Zellrezeptor aktivieren (33, 34), werden durch bakterielle DNS, die unmethylierte CpG Oligonucleotide enthält, vor allem Gedächtnis-B-Zellen über TLR-9 stimuliert (35).

3.2.5 Keimzentrumsreaktion und B-Zellgedächtnis

Für die Bildung von Keimzentren ist die vorherige Stimulation durch CD40L notwendig. Nach vorangegangener Stimulation naiver B-Zellen mit einem T-Zell-abhängigen Antigen und dem Signal über das CD40-Molekül (36), kommt es innerhalb von zwei bis vier Tagen (37) zur oligoklonalen Proliferation der aktivierten B-Zellen und der Bildung von Keimzentren (38). Ohne das Zusammentreffen mit follikulären dendritischen Zellen, die das Antigen unprozessiert auf ihren Ausläufern präsentieren, ist die Keimzentrumsbildung deutlich beeinträchtigt (39).

Innerhalb der folgenden Tage entsteht aus dem Primärfollikel der Sekundärfollikel, der sich durch eine Trennung von sogenannter dunkler und heller Zone auszeichnet (2). In erstgenannter befinden sich die alle sechs Stunden proliferierenden Zentroblasten (37), die mit zufälligen Mutationen in den hypervariablen Regionen hochaffine B-Zellrezeptoren generieren können. Dieses Phänomen wird als sogenannte somatische Hypermutation bezeichnet und erscheint ab dem siebten Tag nach einer Immunisierung (40, 41). In der hellen Zone findet die Selektion der nicht mehr proliferierenden Zentrozyten über deren mutierten B-Zellrezeptor statt (42). So wird bei erfolgreich mutierten Zellen der B-Zellrezeptor über das auf der Oberfläche der follikulären dendritischen Zellen gebundene Antigen ausreichend stimuliert und dient neben dem Stimulus mit CD40L, das von Keimzentrums-T-Zellen exprimiert wird, als Überlebenssignal (25, 43). B-Zellen, durch deren mutierte Antikörpergene es zu einer schwachen Antikörper-Antigenbindung kommt, werden apoptotisch.

Aus der Keimzentrumsreaktion gehen sowohl Plasmablasten als auch Gedächtnis-B-Zellen hervor. Erstere dienen der Sekretion schützender Antikörper, bei letzteren handelt es sich um ruhende Zellen, die bei einer Sekundärantwort, wie z.B. einer Reinfektion, sehr viel schneller für eine hochaffine Immunantwort sorgen (2). Die Keimzentrumsreaktion bei einer Reinfektion oder Auffrischimpfung kommt schneller zustande und auch die durchschnittliche Affinität der Antikörper ist höher. Gedächtnis-B-Zellen haben in der Regel einen Klassenwechsel zu stromabwärts auf der DNS gelegenen Antikörpersubklassen vollzogen (24, 27, 28). Es handelt sich dabei überwiegend um die Antikörperklassen IgG und IgA, die eine längere zytoplasmatische Domäne besitzen, wodurch eine schnellere Signaltransduktion und eine schnellere Immunantwort ermöglicht wird (44).

3.2.6 Stimulation von B-Zellen

Aus *in vitro* Stimulationen von B-Zellen mit CD40L-transfizierten Zellen ist bekannt, dass IL-2, IL-4 und IL-10 Proliferation und Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen auslösen können (45-47). Durch die Stimulation über CD40 in Anwesenheit von IL-4 konnte ein Ausdifferenzieren von Keimzentrums-B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen erreicht werden (48). Ebenso konnten tonsilläre Keimzentrums-B-Zellen in Anwesenheit von CD40L transfizierten Zellen, IL-2 und IL-10 nach sieben Tagen überwiegend zu Zellen mit Gedächtniszellphänotyp und nur einer geringen Frequenz von Zellen mit Plasmazellphänotyp differenzieren, während das Entfernen der CD40L-transfizierten Zellen am dritten Tag und das anschließende Weiterkultivieren mit IL-2 und IL-10 die Frequenz von Plasmazellvorläufern deutlich erhöhte (47, 49). Choe et al. (1998) machen jedoch die Zugabe von IL-10 für das Ausdifferenzieren zu Plasmazellen verantwortlich, fehlendes IL-10 führte nach CD40-Stimulation zum Gedächtniszellphänotyp (50). Tangye et al. (2003) wiederum demonstrierten, dass die Präsenz von CD40L über sieben Tage zu Antikörper produzierenden Zellen führen kann. Diese Zellen tragen jedoch nicht den Plasmazellphänotyp CD38(++), sondern CD38(+/-), die Frequenz von CD38(++)-Zellen erhöhte sich aber auch hier deutlich mit Entfernen des CD40-Signals (51).

Mit der Zugabe von IL-10 konnte CD25, welches ein Teil des Rezeptors für IL-2 ist, induziert werden und so die Proliferation und auch die Zahl Antikörper-sezernierender Zellen je nach Isotyp drei- bis 15-fach erhöht werden (45). CD25 wird unmittelbar mit dem Differenzierungsprozess hochreguliert (52). Weiter spielt IL-6 bei der Entstehung früher Plasmazellen aus den Plasmablasten eine wichtige Rolle, dessen Rezeptor, CD126, mit dem Abbruch des CD40-Signals induziert wird (52, 53).

Diese Versuche zeigen, dass eine *in vitro* Stimulation von B-Zellen über CD40 zu Plasmazellvorläufern in Anwesenheit von mindestens IL-2 und IL-10 möglich ist.

Gedächtnis-B-Zellen können auch über den TLR-9 mit dem Oligonucleotid CpG 2006 zu Antikörper-sezernierenden Zellen stimuliert werden, wobei auch hier für Proliferation und Differenzierung die Anwesenheit von IL-2 und IL-10 benötigt wird (35).

Naive B-Zellen können nach Kontakt mit CD40-stimulierten dendritischen Zellen und deren Sekretion von IL-12 zu IgM-sezernierenden Zellen ausdifferenzieren (49, 54). Naive B-Zellen können aber auch über die Stimulation ihres B-Zellrezeptors zu Plasmazellvorläufern ausdifferenzieren (35).

Werden Gedächtnis-B-Zellen *in vitro* über CD40 und /oder über den B-Zellrezeptor mittels *Staphylococcus aureus* Cowan I aktiviert, so können sie IL-1 β , IL-6, IL-10, GM-CSF und TNF- α sezernieren. (55).

3.2.7 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen

Nach einer Reinfektion oder einer Auffrischimpfung können hochaffine Antikörper im Serum über sehr lange Zeiträume, im Fall von Tetanus und Diphtherie, bis hin zu Jahrzehnten nachgewiesen werden (7). Dabei steigt die Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in der Milz zunächst stark an, um dann stark abzufallen. Im Knochenmark erhöht sich zeitversetzt die Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen (56). Die im Knochenmark lokalisierten Plasmazellen, die beim erwachsenen Menschen etwa 0,2-0,4 % aller dort vorkommenden mononuklären Zellen ausmachen, sind verantwortlich für den anhaltenden Antikörpertiter (57). Plasmazellen sezernieren konstitutiv Tausende von Antikörpermolekülen pro Sekunde (58), wobei 2/3 des täglich produzierten IgG und IgA sowie 1/3 des IgM aus dem Knochenmark stammen (8, 59, 60). Da die Halbwertszeit von ungebundenem Antikörper maximal drei Wochen beträgt (61, 62), ergab sich die Frage nach der Ursache der langanhaltenden Titer. Untersuchungen über die Lebensdauer von Knochenmark-Plasmazellen der Maus ergaben, dass diese drei bis sechs Wochen nach einer Sekundärimmunisierung aufhören zu proliferieren und später mindestens drei Monate ohne DNS-Synthese überleben können (63). In anderen Experimenten wurden Plasmazellen aus dem Knochenmark in naive Mäuse transferiert. In diesen Experimenten waren Antikörpertiter über Monate detektierbar, ohne dass Antigen in die naive Maus injiziert wurde (56). Damit einhergehend wurden Antikörpertiter, spezifisch für das proliferierende Virus LCMV, über ein Jahr nachgewiesen, nachdem Plasmazellen in Mäuse transferiert wurden, denen zuvor Gedächtnis-B-Zellen depletiert wurden (64).

Ein weiterer Versuch, die Ursache für die persistierenden Antikörpertiter zu verstehen, wurde in einer Studie an humanen Plasmazellen unternommen. So wurde nach einer Auffrischimpfung gegen Tetanus ein Anstieg Tetanus-spezifischer Plasmazellen mit einem folgenden Abfall beobachtet. Parallel dazu konnte allerdings ein synchron verlaufender Anstieg und Abfall von Plasmazellen, spezifisch für das Masern- und Poliovirus, detektiert werden, ohne dass die Probanden gegen diese Erreger geimpft worden wären, es bestand lediglich ein Gedächtnis dafür. Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung ist das Auffüllen des Plasmazellpools im Knochenmark über die sogenannte Bystander-Aktivierung (65).

Da Plasmazellen aus dem Knochenmark ungeachtet ihrer Lebensdauer verantwortlich für die Antikörpertiter sind, scheint das Mikromilieu des Knochenmark entscheidend zu deren Überleben und Funktion beizutragen. Es konnten in der Maus verschiedene synergistisch wirkende Faktoren identifiziert werden, die das Überleben von Plasmazellen begünstigen. Aus dem Knochenmark isolierte IgG-sezernierende Plasmazellen wurden in der Präsenz unterschiedlicher Faktoren kultiviert. Vor allem IL-6 und das Triggern des Hyaluronsäurerezeptors CD44 erhöhen die Frequenz überlebender Zellen drastisch (66). So ist bereits aus älteren Untersuchungen bekannt, dass die Umgebung zum Überleben und Wachstum maligner Myelomzellen, den entarteten Plasmazellen, beiträgt (67-69). Vor allem IL-6 spielt hier eine Rolle, welches Myelomzellen über zwei unterschiedliche Signalwege vor Apoptose schützen kann (70). Dass Plasmazellvorläufer autokrin IL-6 synthetisieren können, welches sowohl ein weiteres Ausdifferenzieren als auch Überleben gewährleistet, zeigen Experimente, in denen mittels Blockade des IL-6-Rezeptors Apoptose induziert werden konnte (52, 71).

Plasmazellen können aber auch in verschiedenen entzündeten Geweben gefunden werden (6). Diese können 50 Tage nach Immunisierung in den chronisch entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen, dem Mausmodell für systemischen Lupus erythematodes, identifiziert werden (4). Außerdem wurden Plasmazellen in Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen (5, 10). Es wurde gezeigt, dass die Überlebenszeit von Plasmazellen durch Co-Kultur mit Synovialzellen verlängert werden konnte (72). Diese Daten sprechen dafür, dass Plasmazellen in chronisch entzündetem Gewebe über lange Zeit überleben können. Das inflammatorische Zytokin IL-6 wurde bereits als wichtiger Überlebensfaktor beschrieben und kann auch hier eine entscheidende Rolle spielen.

In den Nieren von NZB/W-Mäusen konnten zwar, verglichen mit gesunden BALB/c-Kontrollmäusen, bis zu 50-fach höhere Plasmazellzahlen detektiert werden, jedoch keine Bildung von Keimzentren (4). Dies deutet an, dass die Plasmazellen in sekundär lymphatischen Geweben gebildet werden und von dort aus in das chronisch entzündete Gewebe einwandern.

3.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

3.3.1 Aufbau und Funktion

Chemokine, kleine Moleküle in der Größe von acht bis 14 kDa, spielen in der Immunologie eine beachtliche Rolle, da sie neben der Leitung von Leukozyten in verschiedene Gewebestrukturen auch für die Genese verschiedener lymphatischer Gewebe verantwortlich

sind (73). Das Fehlen von CXCL12 (SDF-1 α) bzw. dem dazugehörigen Rezeptor CXCR4 führt durch multiple Defekte, z.B. beeinträchtigter Hämatopoese im Knochenmark, bereits embryonal zum Tod (74). Leukozyten können gezielt entlang eines Chemokinkonzentrationsgradienten in bestimmte Areale gelockt werden, wenn sie die entsprechenden korrespondierenden Rezeptoren (sowie Adhäsionsmoleküle) auf ihrer Oberfläche tragen. Am Ziel angekommen oder auch während der Reifung können die Zellen ihr Chemokinrezeptorprofil und so auch ihr Migrationsverhalten ändern (75, 76).

Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte 7-transmembran-Segment-Oberflächenrezeptoren, die durch ihre Pertussis-Toxin-Sensitivität zeigen, dass sie zur G_i-Klasse der heterotrimären G-Proteine gehören (77). Die Aktivierung eines Chemokinrezeptors induziert das G-Protein abhängige Inhibieren der Adenylatcyclase, das Aktivieren der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K), der Phospholipase C, der Proteinkinase C (PKC) und der Proteinkinase A. Dies führt zur Bildung von Inositol-triphosphat und einem intrazellulären Calciumanstieg (78).

Durch Desensibilisierung oder Internalisierung des Chemokinrezeptors kann eine Zelle ihre Migration beenden. Das Desensibilisieren des Chemokinrezeptors ist ein sehr schneller Prozess, in dem die Signaltransduktion durch ein Abkoppeln des Rezeptors vom heterotrimären G-Protein unterbrochen wird (79). Bei der Internalisierung wird der Rezeptor nach Aktivierung von der Oberfläche entfernt und entweder degradiert oder zur Wiederverwertung zurück auf die Oberfläche gebracht. Durch den Internalisierungsprozess wird die Zelle für eine Zeit refraktär für die Liganden des entsprechenden Rezeptors (80). Auf T-Zellen konnte nach Inkubation mit den CXCR3-Liganden eine vorübergehende Internalisierung von CXCR3 sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistologisch gezeigt werden, die nach drei Stunden wieder zu 80 % des Ausgangswertes führte (81).

3.3.2 Verlauf der Leukozytenmigration

Lymphozyten sind in der Lage auf verschiedene Antigene zu reagieren, unabhängig davon, wo diese in den Organismus eintreten. Um eine optimale Immunantwort sicherzustellen, müssen die beteiligten Zellen gleicher Spezifität, d.h. B- und T-Zellen sowie z. B. dendritische Zellen, zur Antigenpräsentation an einem Ort zusammen kommen. Im Darm wird das eintretende Antigen bereits von den dort anwesenden Lymphozyten in Empfang genommen. Tritt ein Antigen allerdings an anderen Stellen in den Körper ein, muss ein Zusammentreffen oben genannter Zellen gewährleistet werden. Reife Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich durch den Körper, wobei sie ein- bis zweimal täglich vom Blut ins

Gewebe gelangen (82). Während naive Lymphozyten ein eher homogenes Migrationsverhalten zeigen, haben Gedächtniszellen mit einer Gewebe-spezifischen Expression von Chemokinrezeptoren und Integrinen ein sehr uneinheitliches Bild (83).

Die Migration von Leukozyten ist ein komplexer Vorgang, der in vier aufeinander folgenden Schritten verläuft. Jeder dieser Schritte ist reversibel, wenn nicht ein erneutes Signal folgt (84). Zuerst kommt es innerhalb von Sekunden zur primären Adhäsion während der die zirkulierenden Lymphozyten mit den Liganden für Adhäsionsmoleküle, den Selektinen oder Integrinen, interagieren. Mit diesem Schritt wird die Geschwindigkeit der Lymphozyten im Blutstrom herabgesetzt. Kommt es nicht binnen der folgenden Sekunden zur Aktivierung der Lymphozyten, wird durch Proteasen die im ersten Schritt hergestellte Adhäsion unterbrochen. Nach der Aktivierung der Integrine, an der auch Chemokine beteiligt sein können, kommt es zu einem minutenlang anhaltenden Arretieren der Lymphozyten. IgG-sezernierende Plasmablasten tragen das Integrin $\alpha_4\beta_1$, IgA-sezernierende Zellen das Integrin $\alpha_4\beta_7$ auf ihrer Oberfläche. Erstgenannte Integrine interagieren mit ihren Liganden, dem in sämtlichen Organen mit Ausnahme der Darmschleimhaut vorkommenden vascular cell-adhesion molecule (VCAM)-1 respektive im Fall von $\alpha_4\beta_7$, mit dem in der Darmschleimhaut vorkommenden mucosal addressin cell-adhesion molecule (MadCAM)-1 (84). Als letzter Schritt folgt das Auswandern der Zellen entlang eines Chemokingradienten (76, 83).

3.3.3 Chemokinrezeptorexpression und Migrationsverhalten vor und während der B-Zellaktivierung

Untersuchungen verschiedener B-Zellpopulationen haben gezeigt, dass diese unterschiedliche Chemokinrezeptorprofile ausprägen sowie variabel auf verschiedene Chemokine reagieren können (3, 85, 86). Um aktiviert zu werden, müssen sowohl naive als auch Gedächtnis-B-Zellen sowie die für das entsprechende Antigen spezifischen T-Zellen zunächst an den Ort ihrer Aktivierung gelangen. Die zur B-Zellaktivierung notwendigen Interaktionen zwischen T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen (54) werden über Chemokine und deren Rezeptoren reguliert (87, 88). Die Chemokine können sowohl vom Grundgewebe der lymphatischen Organe als auch von den einzelnen Zellen gebildet werden, um sich gegenseitig anzulocken. Endothelzellen lymphatischer Gefäße im Lymphknoten, aber auch dendritische Zellen exprimieren die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 (89-91), welche aktivierte dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen anlocken können. Der Chemokinrezeptor CXCR5 ermöglicht den B-Zellen das Einwandern in die Follikel (76, 85). Mit der Expression der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5 können B-Zellen

auch in den Peyerschen-Platten des Dünndarms rekrutiert werden (92). Auf diese Weise werden Zellen mit gleicher Spezifität an einem Ort arretiert und es kommt zur Abgabe von Zytokinen sowie anderen co-stimulatorischen Signalen (93).

Die Expression von Chemokinrezeptoren auf unterschiedlichen B-Zellpopulationen ist variabel, ebenfalls ist das Ausprägen eines Chemokinrezeptors nicht zwingend mit der Migration gegen den korrespondierenden Liganden verbunden (3, 85, 86, 94).

Naive B-Zellen prägen, auch wenn sie aktiviert werden, CXCR4, CXCR5, CCR6 und CCR7 aus und migrieren gegen die entsprechenden Liganden (3, 86). Gedächtnis-B-Zellen tragen den Rezeptor CCR7 nicht mehr auf ihrer Oberfläche, während sie CXCR5 und CXCR4 ausgeprägt und auch gegen Konzentrationsgradienten der zugehörigen Liganden migrieren (86). In verschiedenen Veröffentlichungen wurde die Expression und die Kapazität von Chemokinrezeptoren auf Keimzentrums-B-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen trotz Ausprägen von CCR7, CXCR4 und CXCR5 keine chemotaktische Aktivität gegen die entsprechenden Liganden haben (86, 95). Die ausbleibende Aktinpolymerisation nach Zugabe von CXCL12 zu Keimzentrums-B-Zellen im Gegensatz zu naiven und Gedächtnis-B-Zellen bestätigte, dass diese refraktär für Chemotaxis gegen einen Konzentrationsgradienten von CXCL12 sind. Wurden diese Zellen jedoch mit CD40L, IL-2 und IL-10 zu Gedächtnis-B-Zellen differenziert, konnten sie ihre Migrationsfähigkeit wiedererlangen (86, 95).

3.3.4 Chemokinrezeptorexpression und Chemotaxis von Plasmazellvorläufern

Chemokinrezeptoren und Chemotaxis wurden auf Plasmazellen und ihren Vorläufern analysiert. Es wurde beschrieben, dass Chemokine und gewebespezifische Adhäsionsmoleküle die Migration von Plasmablasten vom Ort ihrer Entstehung zu ihrem Zielorgan koordinieren. Plasmablasten prägen Chemokinrezeptoren aus, mittels derer ihnen eine Migration in Schleimhaut, entzündetes Gewebe oder Knochenmark möglich ist (76, 96). Andere Chemokinrezeptoren, die spezifisch für Chemokine aus sekundär lymphatischen Organen sind, werden herunterreguliert (3, 85).

So wurde von Wehrli et al. (2001) demonstriert, dass mit dem Ausdifferenzieren von B-Zellen zu Plasmazellen die Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5, welche B-Zellen in Follikel und Keimzentrum dirigieren können, weitgehend verloren geht und damit auch die Fähigkeit, gegen die korrespondierenden Liganden zu migrieren (85). Damit wird den Plasmazellvorläufern eventuell das Auswandern aus dem sekundär lymphatischen Gewebe zum Zielorgan ermöglicht. CXCR4 wird von Plasmablasten weiterhin auf der

Oberfläche ausgeprägt und zeigt im Chemotaxis-Assay gegen den Liganden CXCL12, verglichen mit den anderen B-Zellpopulationen, eine erhöhte Sensitivität (3). Diese Daten demonstrieren, dass sich sowohl das Chemokinrezeptorprofil als auch die Fähigkeit, gegen einen Chemokingradienten zu wandern, mit dem Reifen der B-Zelle ändert.

In unserer Arbeitsgruppe wurden IgG-sezernierende Zellen auf ihr Migrationsverhalten gegen 17 verschiedene Chemokine getestet. Es konnte von Hauser et al. (2002) gezeigt werden, dass IgG-sezernierende Plasmazellvorläufer von den getesteten Chemokinen ausschließlich gegen die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und den CXCR4-Ligand CXCL12 (SDF-1 α) migrieren, wobei CXCL16 und CCL28, die Liganden für CXCR6 respektive CCR10, nicht untersucht wurden (94). Das Fehlen von CXCR4 auf Plasmablasten führt zunächst zu einer mehr als dreifach reduzierten Akkumulation dieser Zellen im Knochenmark und resultierte statt dessen in einer Fehllokalisation in der Milz (3). 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 eventuell nur in der frühen Phase der Plasmazellmigration ins Knochenmark von Bedeutung ist (11). Während am sechsten Tag nach einer Immunisierung im Knochenmark ankommende Plasmazellvorläufer noch gegen den Liganden CXCL12 wandern, haben weiter ausgereifte Zellen am Tag 12 nach einer Immunisierung diese Fähigkeit verloren, obwohl der zugehörige Rezeptor CXCR4 vergleichbar ausgeprägt wird (94). So ändert sich mit dem Ausreifen zur Plasmazelle deren Migrationsverhalten gegen CXCL12, nicht aber die Expression von CXCR4. Dieser Rezeptor kann möglicherweise auch andere Funktionen haben; z.B. die Unterstützung des Überlebens von Plasmazellen im Knochenmark durch CXCL12 (66, 94). Im Knochenmark finden sich Plasmazellen und ihre Vorläufer eng co-lokalisiert mit den CXCL12-produzierenden Stromazellen (97). Es konnten jedoch neben CXCR4 auch die Expression von CXCR6 und CCR10 auf Plasmazellen aus dem Knochenmark dargestellt werden. Die Liganden dieser drei Chemokinrezeptoren, CXCL12, CXCL16 und CCL28, wurden im Knochenmark nachgewiesen und konnten sowohl eine VLA-4 vermittelte Adhäsion zu Fibronectin als auch Chemotaxis der Plasmazellen auslösen. Inwiefern auch CXCR6 und CCR10 an der Akkumulation im Knochenmark beteiligt sind, ist noch unklar (13).

IgA-sezernierende Zellen können die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 ausprägen und gegen die zugehörigen Liganden migrieren. Der Ligand für den ersteren, CCL25, wird u.a. im Dünndarm, der für den letztgenannten CCL28 in sämtlichen Schleimhäuten sowie im Knochenmark gebildet (98). Da IgA-sezernierende Zellen aber auch gegen einen Konzentrationsgradienten von CXCL12 wandern können, bleibt offen, inwieweit CXCR4

oder CCR10 für die Lokalisation im Knochenmark verantwortlich ist (98, 99). Da CXCL12 auch in der Schleimhaut synthetisiert wird (100), kann auch dies IgA- und IgG-sezernierende Plasmazellen dorthin locken.

3.3.5 Plasmazellakkumulation in entzündetem Gewebe

Plasmazellvorläufer können auch Chemokinrezeptoren ausprägen, welche ihnen die Akkumulation in nicht-lymphatischem Gewebe ermöglicht. Für die Lokalisation von Plasmazellvorläufern in chronisch entzündetem Gewebe können entweder sogenannte ektopische Keimzentren (5) verantwortlich gemacht werden oder aber das Einwandern IgG-sezernierender Zellen entlang eines Chemokingradienten in entsprechende Organe. Plasmazellen, aber nicht Keimzentren, wurden in chronisch entzündeten Nieren von NZB/W-Mäusen nachgewiesen (4). Außerdem können IgG-sezernierende Zellen gegen die drei korrespondierenden Liganden von CXCR3, CXCL9, CXCL10 und CXCL11, migrieren (94). Diese Liganden werden während einer Entzündung von postkapillären Venolen mit hochprismatischem Endothel (high endothelial venules (HEV)) produziert (101). Es konnte gezeigt werden, dass sich die mRNA der CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 nach Auslösen einer Entzündung bis zu 9-fach von 12 fg/50g cDNS auf 115 fg/50 g cDNS erhöhte. Auch in regionalen Lymphknoten können während einer Entzündung die B-Zellfollikel umgebenden HEV CXCL9 exprimieren. CXCL10 wiederum findet sich in der Makrophagen reichen Zone (102). Die Migration von Plasmablasten in entzündetes Gewebe über CXCR3 ist also wahrscheinlich (96).

CXCR3 wird konstitutiv auf B-Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie exprimiert, während die CXCR3-Expression auf B-Zelltumoren wie dem Mantelzelllymphom oder dem non-Hodgkin-Lymphom heterogen ist. Im Chemotaxis-Assay wurde die Fähigkeit der Zellen nachgewiesen, gegen Konzentrationsgradienten aller drei CXCR3-Liganden zu migrieren. Das könnte zur Ausbreitung des Tumors führen (103, 104).