

5 Ergebnisse

5.1 Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4

5.1.1 Nachweis von CD38(++)/CD20(-)-B-Zellen in humanem Blut vor und nach einer Auffrischimpfung mit Tetanus-Toxoid

Plasmazellen und deren Vorläufer vermitteln durch die Sekretion von Antikörpern die erworbene humorale Immunität. Nach einer Auffrischimpfung können Gedächtnis-B-Zellen in regionalen Lymphknoten zu Plasmazellvorläufern ausdifferenzieren. Diese sind dann fünf bis sieben Tage später im Blut zu detektieren (105). Die entstandenen Plasmazellvorläufer befinden sich auf dem Weg in Knochenmark, entzündetes Gewebe oder Mukosa, wo sie weiter zu Plasmazellen ausdifferenzieren und lokal Antikörper produzieren können (106).

Hier wurde durchflusszytometrisch die Häufigkeit von Plasmazellvorläufern im Blut von Menschen vor und sechs Tage nach einer Auffrischimpfung mit Tetanus-Toxoid bestimmt. In Anlehnung an die Literatur wurden die Plasmazellvorläufer durchflusszytometrisch über die Expression von CD19(+)/CD38(++)/CD20(-) oder CD19(+)/CD38(++)/CD27(++) charakterisiert (47, 107, 108). Die Häufigkeit der hier untersuchten CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Zellen der PBMC lag bei 0,083 +/- 0,021 %. Sechs Tage nach der Impfung stieg die Frequenz der CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Zellen der PBMC auf 0,2798 +/- 0,072 %. (Abb. 5, Tab. 2).

Tab. 2: Häufigkeit von CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten in PBMC von fünf Menschen vor und sechs Tage nach Tetanus-Toxoid Auffrischimpfung

Blutspender	% CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)	% CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)
	Tag 0 vor Immunisierung	Tag 6 nach Immunisierung
Spender 1	0,05 %	0,26 %
Spender 2	0,09 %	0,16 %
Spender 3	0,11 %	0,33 %
Spender 4	0,10 %	0,27 %
Spender 5	0,07 %	0,38 %

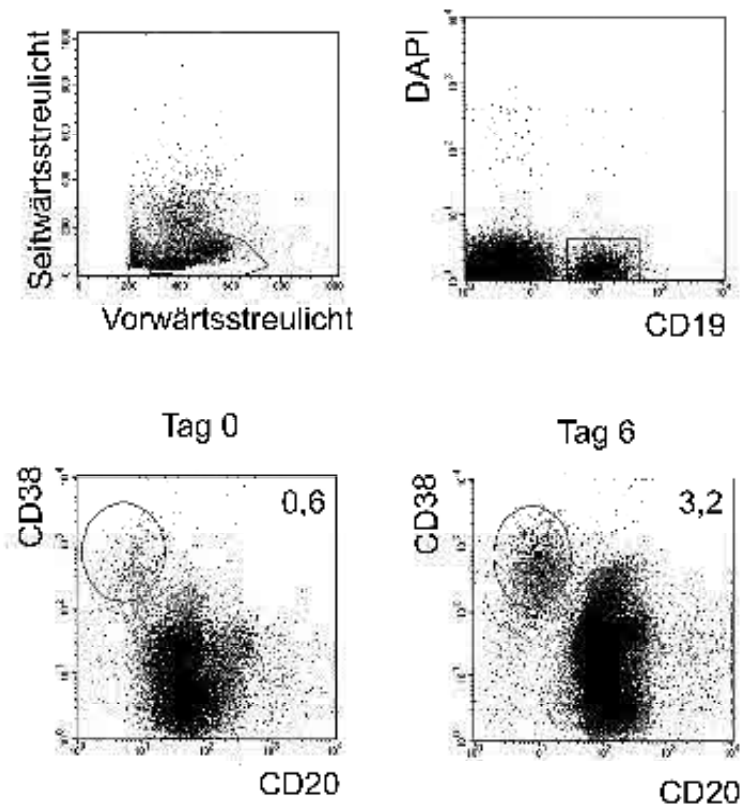


Abb. 5: Charakterisierung von Plasmablasten aus humanem Blut

Die Lymphozytenpopulation wurde zunächst über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert (oberes linkes Bild). Über CD19(+)/DAPI(-) wurden lebende B-Zellen charakterisiert (oberes rechtes Bild). Die Angabe der Häufigkeit der CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten in dem markierten Fenster entspricht dem prozentualen Anteil dieser Zellen an den B-Zellen. Untersucht wurden Zellen aus Blut vor (Tag 0) und sechs Tage nach einer Auffrischimpfung gegen Tetanus (Tag 6). Diese Abbildung ist repräsentativ für fünf unabhängig voneinander durchgeführte Experimente von fünf Blutspendern (siehe Tab.1).

5.1.2 Expression von CXCR3 und CXCR4 auf peripheren B-Zellen und Plasmazellvorläufern des Menschen

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 und ihre korrespondierenden Liganden eine wichtige regulatorische Funktion für die Lokalisation von IgG-sezernierenden Plasmazellen und deren unmittelbaren Vorläufern in entzündetem Gewebe respektive Knochenmark haben (3, 66, 94). Es sollte nun untersucht werden, ob diese beiden Rezeptoren auch auf unterschiedlichen humanen B-Zellpopulationen ausgeprägt werden.

B-Zellen wurden mit dem Marker CD19 identifiziert und machten 18,9 +/- 5,3 % der Lymphozyten im Blut aus. Analysiert wurde zunächst die Häufigkeit der CXCR3- und CXCR4-ausprägenden Zellen der gesamten B-Zellpopulation. CXCR3 wurde auf 13,5 +/- 7,1 % der Zellen und CXCR4 auf 77,7 +/- 7,8 % exprimiert. Die naiven B-Zellen wurden als CD19(+)/CD27(-) charakterisiert (109). Von diesen Zellen trugen 6,4 +/- 4,3 % CXCR3 und 87,6 +/- 6,1 % CXCR4 auf der Oberfläche. Gedächtnis-B-Zellen ließen sich durch die Expression von CD27 von den naiven B-Zellen abgrenzen (109). Von dieser CD19(+)/CD27(+)-Gedächtnis-B-Zellpopulation trugen 23,7 +/- 8,1 % das Molekül CXCR3, während CXCR4 auf 63,3 +/- 12,1 % zu finden war (Abb. 6A). Auf den über CD19(+)/CD38(++)/CD20(-) definierten Plasmazellvorläufern wurde CXCR3 auf 27,5 +/- 3,1 % und CXCR4 auf 1,72 +/- 0,6 % nachgewiesen (Abb. 6B). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die von der Maus bekannten Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 auf humanen B-Zellpopulationen ausgeprägt werden können.

In Experimenten einer Diplomarbeit, die parallel zu dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe angefertigt wurde, konnte jedoch gezeigt werden, dass ca. 12 % der IgG-sezernierenden Zellen aus dem Blut gegen den CXCR4-Liganden CXCL12 migrieren, d. h. diesen Rezeptor tragen müssen (131). Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen im Durchflusszytometer nachweisbarer Expression von CXCR4 und der Migration gegen CXCL12 wurde in weiteren Versuchen näher betrachtet. So konnte gezeigt werden, dass die CXCR4-Markierung auf CXCR4-exprimierenden B-Zellen durch Zugabe von CXCL12 unmittelbar vor der Zugabe des Antikörpers, anti-CXCR4, blockiert werden konnte. Es ist also möglich, dass der Rezeptor auf Plasmazellvorläufern bereits durch seinen Liganden besetzt ist. Plasmazellvorläufer können aus Keimzentren hervorgehen. Es wurde von Bleul et al. (1998) beschrieben, dass Keimzentren von einem CXCL12-Saum umgeben werden (95). Aber auch in der Milz sind Plasmablasten co-lokalisiert mit CXCL12-exprimierenden Zellen (3). Dies könnte erklären, dass das Keimzentrum oder die Milz verlassende Plasmablasten CXCR4

exprimieren, welches dann von CXCL12 besetzt wird. In diesem Fall wäre durchflusszytometrisch keine CXCR4-Expression zu detektieren. Wurden PBMC für 24 Stunden in Medium kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert, stieg die Häufigkeit CXCR4-exprimierender Plasmazellen von 2,3 +/- 0,7 % auf 32,2 +/-12,2 % deutlich an (Daten nicht gezeigt). So kann die Expression von CXCR4 zwar durch Bestandteile des Mediums wie FKS oder von T-Zellen oder Monozyten sezernierten Zytokinen auf den Plasmazellvorläufern hochreguliert worden sein, eine andere Möglichkeit ist aber die des Ablösens des gebundenen Liganden CXCL12. Ein vergleichbarer Effekt tritt bei der durchflusszytometrischen Darstellung von CXCR3 nicht auf.

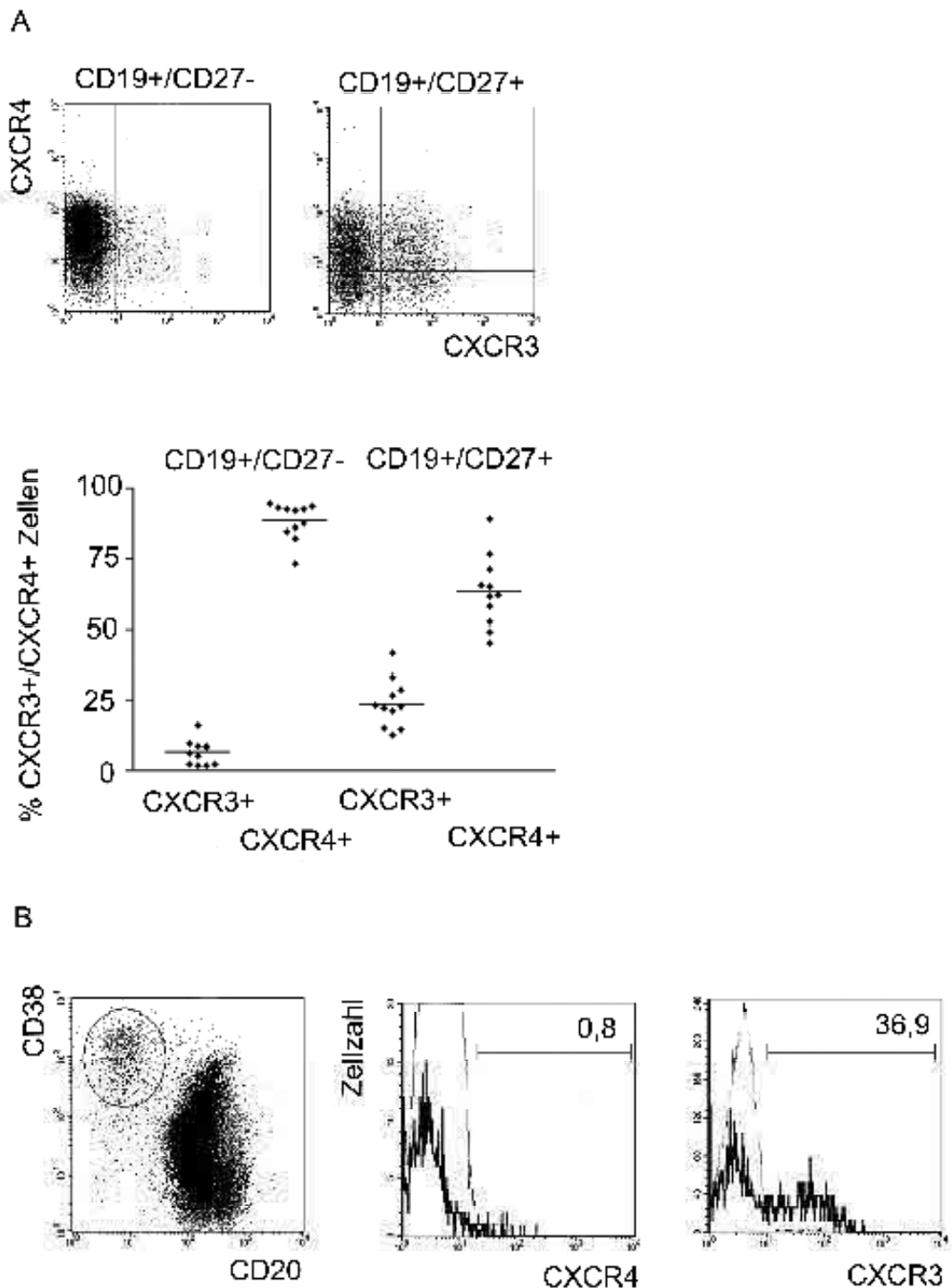


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse von CXCR3 und CXCR4 auf verschiedenen B-Zellpopulationen.

(A) Expression von CXCR3 und CXCR4 auf CD19(+)/CD27(-) naiven und CD19(+)/CD27(+)-Gedächtnis-B-Zellen. In dem Diagramm werden die Häufigkeiten angegeben, mit der naive und Gedächtnis-B-Zellen CXCR3 bzw. CXCR4 exprimieren. Mit jedem Punkt ist ein Experiment von einem Blutspender dargestellt. (B) Plasmablasten des peripheren Bluts wurden über CD38(++)/CD20(-) definiert (linkes Bild). Die Histogramme

zeigen die Expression von CXCR4 respektive CXCR3 (dicke Linie). Die angegebenen Frequenzen geben die Erhöhung gegenüber der Isotypkontrolle (dünne Linie) an. Die Abbildungen der Durchflusszytometrie sind repräsentativ für Ergebnisse von elf verschiedenen Blutspender.

5.1.3 Die Expression von CXCR3 ist mit der Co-Expression von IgG1 assoziiert

In den nächsten Experimenten wurde die Expression von CXCR3 bzw. CXCR4 auf Gedächtnis-B-Zellen unterschiedlicher Antikörpersubklassen untersucht. Die Zellen wurden über CD19 und die Expression von IgG1, IgG2, IgG3, IgM und IgA definiert. Da IgM auch auf naiven B-Zellen ausgeprägt wird, wurden die IgM-tragenden Gedächtnis-B-Zellen über die Co-Expression von CD27 bestimmt (109). Zellen mit den Isotypen IgG4 und IgE konnten nicht untersucht werden, da die Häufigkeit dieser Zellen im Blut zu gering ist, um sie analysieren zu können.

CXCR3 wurde von 30,6 +/- 3,6 % der IgG1(+)-Zellen, von 14,9 +/- 1,9 % der Zellen des Isotyps IgG2 und von 19,7-22,5 % der IgG3(+)-, IgA(+)- oder IgM(+)-Zellen ausgeprägt (Abb. 7). Der Unterschied in der CXCR3-Expression zwischen IgG1- und IgG2-tragenden B-Zellen war signifikant ($p < 0,0001$). Ebenfalls signifikant, wenngleich weniger stark ausgeprägt, war der Unterschied von IgG1- zu IgG3- ($p < 0,0137$) und IgM-tragenden B-Zellen ($p < 0,0078$). Damit konnte eindeutig eine positive Assoziation von CXCR3 mit der Co-Expression des Isotyps IgG1 festgestellt werden. Für CXCR4 konnte keine vergleichbare Assoziation von IgG1- zu IgG2-tragenden B-Zellen mit der Co-Expression von CXCR4 festgestellt werden. Dieser Chemokinrezeptor wird auf 69,5-87,1 % auf Gedächtnis-B-Zellen ausgeprägt (Abb. 7).

Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die beiden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 unabhängig voneinander reguliert werden. Da der Klassenwechsel von IgM zu den anderen Antikörpersubklassen über Zytokine reguliert wird, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass Zytokine auch an der Regulation von CXCR3 beteiligt sind.

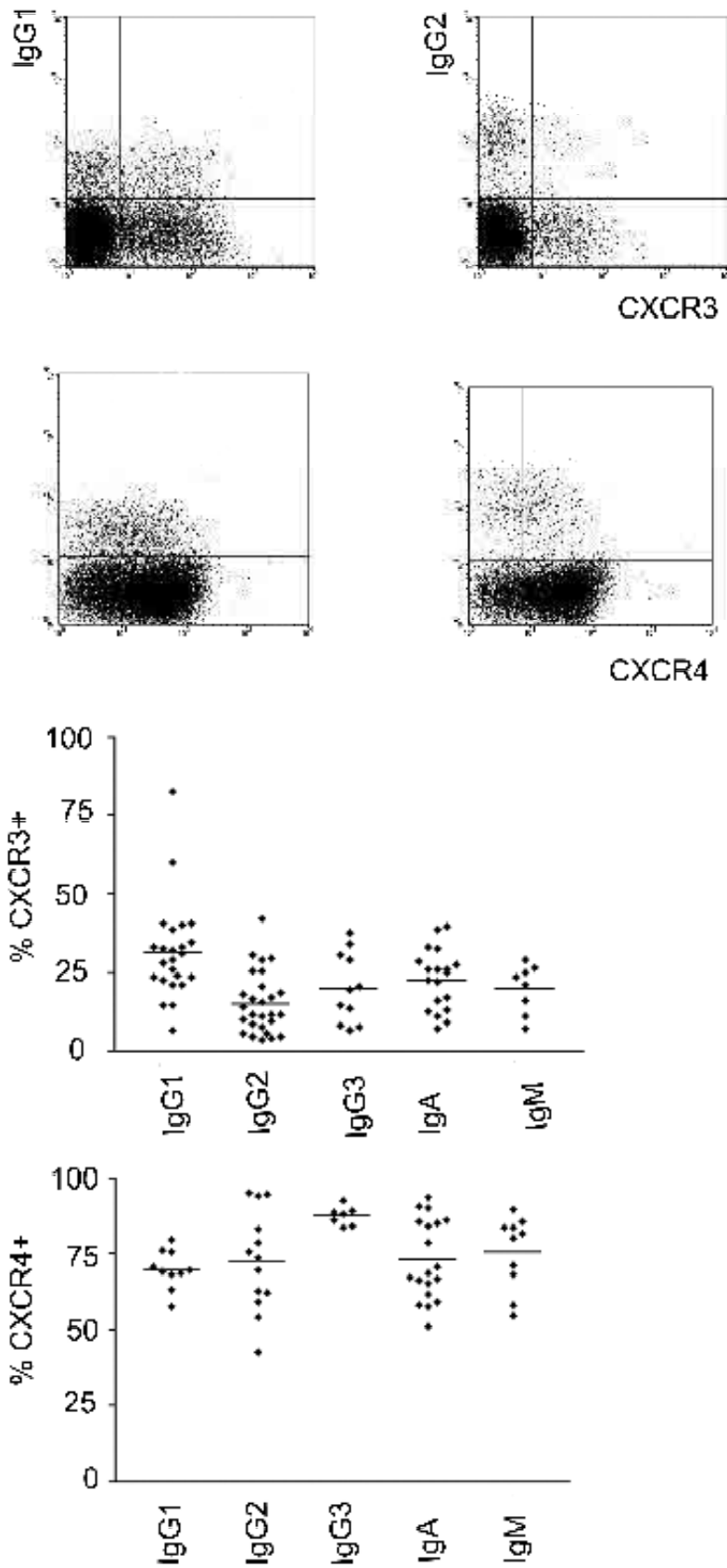


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Co-Expression verschiedener Antikörpersubklassen und CXCR3 bzw. CXCR4 auf Gedächtnis-B-Zellen .

IgG1- (linke dot plots) bzw. IgG2-ausprägende (rechte dot plots) CD27(+)-Gedächtnis-B-Zellen wurden auf die Co-Expression von CXCR3 (obere dot plots) respektive CXCR4 (untere dot plots) analysiert. Die Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse sind repräsentativ für Daten von > 7 Blutspendern. In den beiden Graphiken entspricht jeder Punkt einem Blutspender (> 7 Spender). Die Prozentangaben beschreiben, mit welcher Häufigkeit die jeweilige Antikörpersubklasse CXCR3 (oberer Graph) bzw. CXCR4 (unterer Graph) ausprägt.

5.1.4 Expression von CXCR3 und CXCR4 auf tonsillären Plasmazellvorläufern

Naive und Gedächtnis-B-Zellen können in sekundär lymphatischen Organen zu Plasmazellvorläufern differenzieren (2). Repräsentativ wurde hier die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmazellvorläufern der Tonsille beschrieben. Es handelt sich bei den Tonsillen um entzündete Organe, die im Rahmen einer Tonsillektomie entfernt wurden.

Die CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Plasmazellvorläufer wurden durchflusszytometrisch auf die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 hin untersucht. CXCR4 wurde mit einer Frequenz von 48,4 +/- 6,8 % gemessen. Der Chemokinrezeptor CXCR3 wurde mit einer großen Varianz auf 19,3 +/- 7,0 % der Plasmazellvorläufer ausgeprägt (Abb. 8). Da die CXCR3-Expression auf den Plasmablasten und Gedächtnis-B-Zellen in anderen untersuchten Organen jeweils mit einer relativ konstanten Häufigkeit gemessen wurde, kann diese große Abweichung mit dem stark variierenden Grad der Entzündung erklärt werden. Ein Bezug zwischen Entzündungsgrad der Tonsille und CXCR3-Expression auf Plasmazellvorläufern wurde nicht hergestellt.

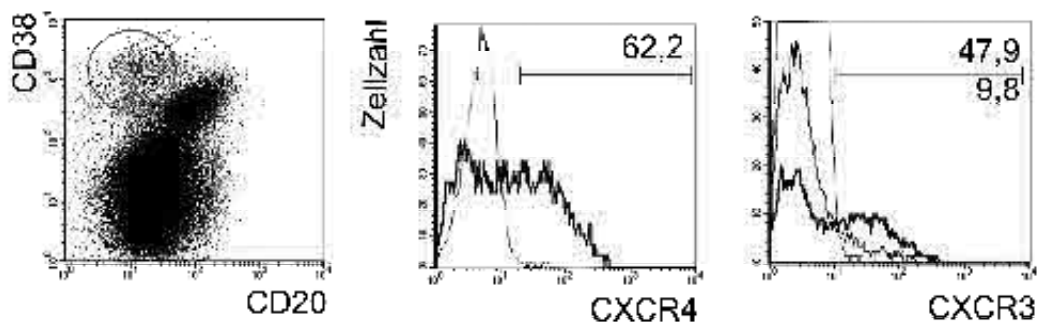


Abb. 8: CXCR3- und CXCR4-Expression tonsillärer Plasmablasten

Antikörper-sezernierende Zellen der Tonsille wurden über CD38(++)/CD20(-) definiert (linkes Bild). Die Histogramme zeigen die Expression von CXCR4 (dicke Linie) respektive CXCR3 (dicke und mittlere Linie). Für die Expression von CXCR3 wurden aufgrund der Varianz (19,7 +/- 7,0 %) Histogramme aus zwei unterschiedlichen Experimenten dargestellt. Die angegebenen Frequenzen geben die Erhöhung gegenüber der Isotypkontrolle (dünne Linie) an. Diese Abbildung ist repräsentativ für Experimente aus acht Tonsillen.

5.1.5 Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmablasten und Plasmazellen des Knochenmarks

Für langanhaltende Antikörpertiter nach einer Sekundärimmunisierung sind Plasmazellen aus dem Knochenmark verantwortlich (110). Für die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark spielt der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein korrespondierender Ligand CXCL12 eine wichtige Rolle (3, 11, 94).

Während CXCR4 auf 71,6 +/- 6,6 % der CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Zellen im Knochenmark getragen wird, exprimieren nur 8,6 +/- 1,7 % dieser Zellen CXCR3 (Abb. 9). Da die Darstellung durch Zugabe des Liganden CXCL12 unmittelbar vor der Zugabe von anti-CXCR4 blockiert werden konnte, ist denkbar, dass der Rezeptor bereits durch seinen im Knochenmark vorkommenden Liganden besetzt ist (97, 111). Diese Ergebnisse zeigen, dass CXCR4 auf mindestens 70-80 % der Plasmazellen ausgeprägt wird.

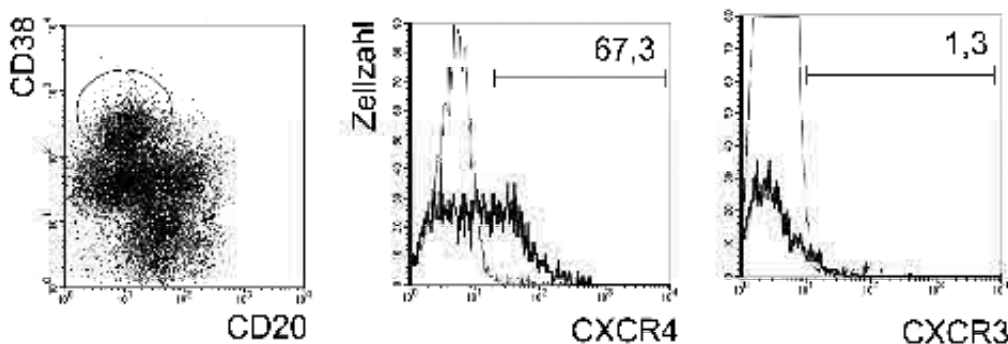


Abb. 9: Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmablasten und Plasmazellen im Knochenmark

Plasmazellen und Plasmablasten des Knochenmarks wurden über CD38(++)/CD20(-) definiert (linkes Bild). Die Histogramme zeigen die Expression von CXCR4 respektive CXCR3 (dicke Linie). Die angegebenen Häufigkeiten geben die Erhöhung gegenüber der Isotypkontrolle (dünne Linie) an. Diese Abbildung ist repräsentativ für Ergebnisse von sieben verschiedenen Knochenmark-Proben.

5.1.6 Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmazellvorläufern des Darms

Der quantitativ bedeutsamste Teil des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) ist der des Darmes (GALT). Es handelt sich bei dem untersuchten Material um Teile unterschiedlicher Darmabschnitte, die aufgrund schwerer Entzündungen oder Tumore entfernt wurden.

Hier wurde die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Plasmazellvorläufern durchflusszytometrisch untersucht. CXCR4 wurde von 9,5 +/- 5,9 % und CXCR3 von 26,9 +/- 17,2 % dieser Zellen ausgeprägt (Abb. 10).

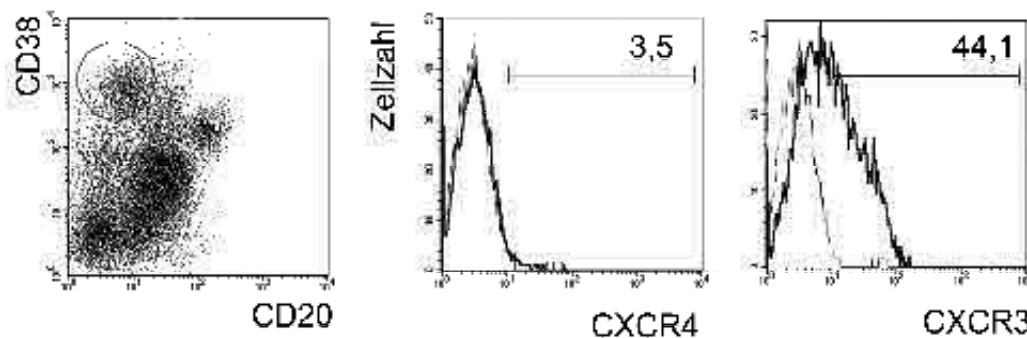


Abb. 10: Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmablasten des Dickdarms (Colon)

Plasmablasten wurden über CD38(++)/CD20(-) definiert (linkes Bild). Die Histogramme zeigen die Expression von CXCR4 respektive CXCR3 (dicke Linie). Die angegebenen Frequenzen geben die Erhöhung gegenüber der Isotypkontrolle (dünne Linie) an. Diese Abbildung ist repräsentativ für Experimente von drei Patienten, das Material stammt aus verschiedenen Darmabschnitten (Colon, Appendix).

5.2 Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4

5.2.1 Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen mittels Tetanus-Toxoid

Die unterschiedliche Häufigkeit mit der CXCR3 und CXCR4 von den einzelnen B-Zellpopulationen exprimiert wird, sowie die positive Assoziation der Co-Expression von CXCR3 mit IgG1, warfen die Frage nach der Regulation beider Chemokinrezeptoren während der Ausdifferenzierung zu Plasmazellen auf. Das Interesse galt dabei vor allem den Gedächtnis-B-Zellen, die nach ihrer Aktivierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen für den Langzeitantikörpertiter verantwortlich sind (7), sowie an Autoimmunerkrankungen beteiligt sein können (112).

Es ist möglich, Gedächtnis-T-Zellen Antigen-spezifisch mit Tetanus-Toxoid, dem Impfstoff gegen Tetanus, zu stimulieren. Basierend auf der Annahme, dass bei einer großen Mehrheit der Blutspender ein Impfschutz gegen Tetanus besteht, schien die Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen mittels Tetanus-Toxoid zu Antigen-spezifischen IgG-sezernierenden Zellen eine adäquate Methode zu sein. Es sollte so der Verlauf der Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Antigen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen nach Stimulation und Differenzierung zu Plasmablasten verfolgt werden.

Aus dem Blut isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) wurden für 6 Tage mit Tetanus-Toxoid stimuliert und an Tag 3 und Tag 6 sowohl durchflusszytometrisch als auch im ELISpot analysiert. Die für die Stimulation eingesetzte Konzentration von 20 Letalfaktoren (LF)/ml stellte sich durch Titration (2 LF/ml, 20 LF/ml, 200 LF/ml) bei der Etablierung des für Tetanus-Toxoid spezifischen ELISpot als geeignet heraus. Während bei einer Konzentration von 2 LF/ml keine Spots zu detektieren waren, unterschied sich diese Anzahl bei 20 LF/ml und 200 LF/ml nicht.

Obwohl durchflusszytometrisch am dritten Tag der Kultur noch keine Zellen mit dem Plasmazellphänotyp CD38(++)/CD27(++), nachzuweisen waren (Abb. 13A), sezernierten 0,34 +/- 0,18 % der Zellen bereits Antikörper vom Typ IgG. Tetanus-Toxoid-spezifische Plasmablasten waren zu diesem Zeitpunkt nicht messbar. Bei den IgG-sezernierenden Zellen handelt es sich um Vorläufer der CD38(++)-Zellen, die CD38 noch nicht hoch exprimieren (51, 113). Es handelt sich bei den IgG-sezernierenden Zellen nicht um bereits vor der Stimulation vorkommende CD38(++)/CD27(++)-Zellen, da diese am dritten Tag der Stimulation durchflusszytometrisch nicht mehr zu detektieren sind (Abb. 11A).

Am Tag 6 konnte durchflusszytometrisch eine deutlich abgesetzte Population von CD38(++)/CD27(++)-Zellen detektiert werden (Abb. 11A). Es konnten 4,1 +/- 1,4 % IgG-sezernierende Zellen innerhalb der gesamten PBMC nachgewiesen werden. Es sezernierten

aber nur 0,005 +/- 0,002 % der PBMC Tetanus-Toxoid-spezifische Antikörper (Abb. 11B). Da also nur 0,1 % der IgG-sezernierenden Zellen spezifisch für Tetanus-Toxoid waren, stellte sich dieses System als ungeeignet zur Antigen-spezifischen Stimulation heraus. Es erfolgte vielmehr eine Antigen-unabhängige, auch als Bystander-Aktivierung bezeichnete Stimulation von verschiedenen B-Zellpopulationen. Vermutlich regulieren die durch das Tetanus-Toxoid aktivierten T-Zellen das Molekül CD40L hoch und können so unabhängig vom Antigen sämtliche leicht aktivierbaren Gedächtnis-B-Zellen stimulieren. Ein weiterer Nachteil dieses Systems ist, dass T-Zellen und Monozyten Zytokine produzieren, die „en detail“ nicht zu bestimmen sind und sich vermutlich auch Spender-abhängig in Zusammensetzung und Menge unterscheiden.

Das hier getestete Modell hat sich zur Untersuchung der Zelldifferenzierung Antigen-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen als ungeeignet herausgestellt.

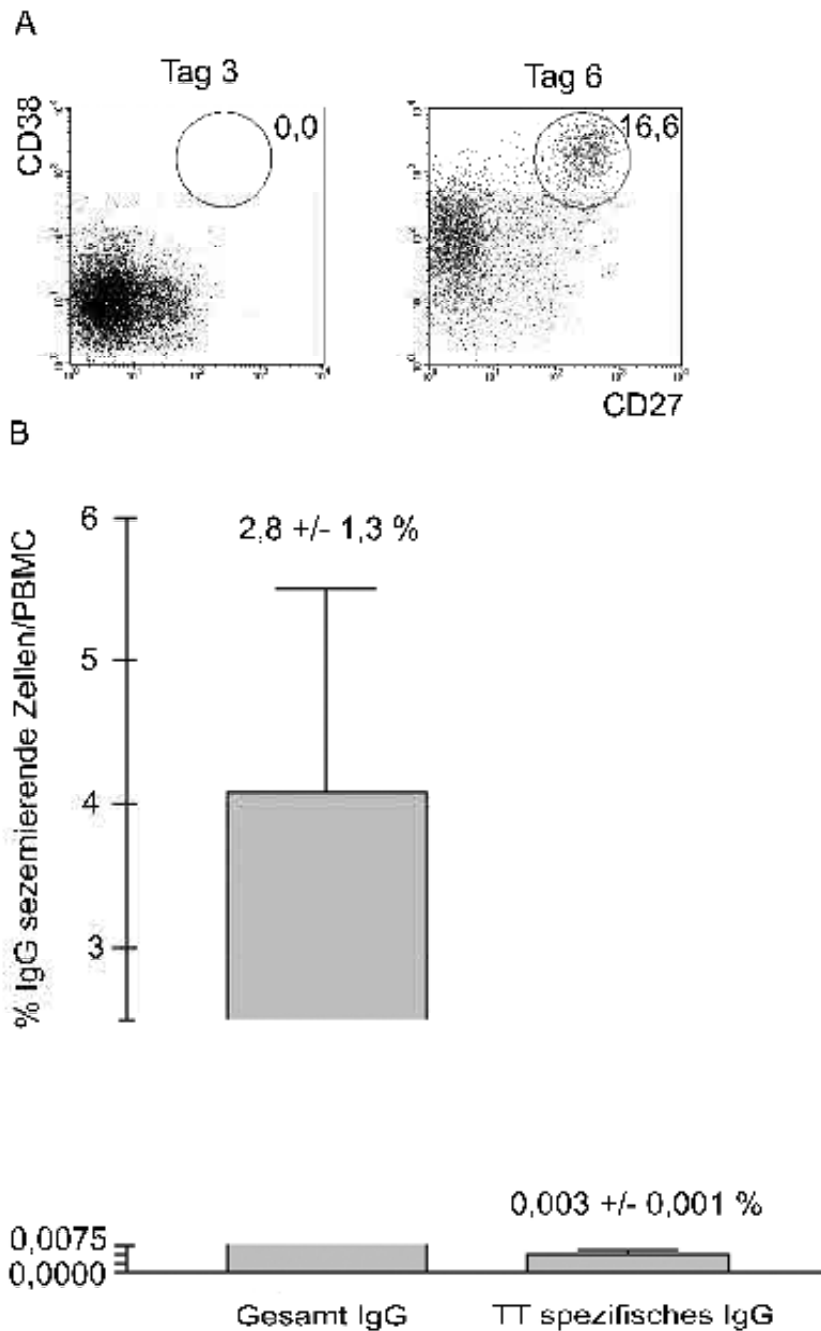


Abb. 11: Charakterisierung Antikörper-sezernierender Zellen am dritten und sechsten Tag nach der Stimulation von humanen PBMC mit Tetanus-Toxoid.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Häufigkeit von CD38(++)/CD27(++)-Plasmablasten. Die angegebenen Häufigkeiten der in den runden Fenstern markierten CD38(++)/CD27(++) beziehen sich auf die CD19(+)-B-Zellen. (B) Bestimmung der Häufigkeit Antikörper-sezernierender Zellen im ELISpot. Untersucht wurden Gesamt-IgG und Tetanus-Toxoid-spezifische IgG-sezernierende Zellen. Die angegebenen Frequenzen IgG-sezernierender Zellen beziehen sich auf die PBMC. Diese Abbildung ist repräsentativ für Experimente von fünf Blutspendern.

5.2.2 Stimulation von B-Zellen über CD40 (Basiskultur)

Die Stimulation über CD40 mittels CD40L, das vorübergehend auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist ein bekanntes Modell zur Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen (47, 51, 52). Die murine T-Zelllinie EL4B5 trägt CD40L konstitutiv auf ihrer Oberfläche (Abb. 13B). Durch die hohe Übereinstimmung zwischen CD40L der Maus und des Menschen wurde eine Kreuzreaktivität zwischen murinem CD40L und humanem CD40 bereits beschrieben (24, 46). In Anlehnung an das von Wen et al. (1987) beschriebene Modell zur Stimulation von B-Zellen mittels der Zelllinie EL4B5 wurde nun ein Kultursystem etabliert (114, 115). Über magnetisch-assoziierte Zellsortierung wurden B-Zellen aus PBMC zu > 98 % angereichert (Abb. 13A) und für 8 Tage mit der Zelllinie EL4B5 kultiviert. Um die Proliferation der EL4B5-Zellen zu hemmen und so ein Überwuchern der B-Zellen zu vermeiden, wurden die EL4B5-Zellen mit 50 Gy radioaktiv bestrahlt. Der von Wen et al. (1987) beschriebene Überstand aus einer mit PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozyten-Kultur stellte die für die Aktivierung notwendige Quelle von Interleukinen dar und wurde zu 5 Vol. % der Kultur zugesetzt. Abweichend von der von Wen et al. (1987) beschriebenen Analyse des Kulturüberstandes auf Antikörper mittels ELISA, sollte hier der Phänotyp der aktivierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Da die beschriebene eingesetzte Zahl der B-Zellen sowie das Verhältnis zu den EL4B5-Zellen für diese Methode nicht praktikabel war, wurde zunächst das für die durchflusszytometrische Analyse optimale Verhältnis von B-Zellen zu EL4B5-Zellen ermittelt. B-Zellen zu EL4B5-Zellen wurden in den folgenden Verhältnissen zueinander in Kultur genommen und am Tag 8 auf die Frequenz von CD38(++)/CD20(-)-Zellen untersucht: 5:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 sowie 1:100. Das technisch durchführbare optimale Verhältnis zur B-Zellstimulation von B-Zellen zu EL4B5-Zellen lag bei 1:10 (Abb.12 und Daten nicht gezeigt). Die durchflusszytometrische Analyse am Tag 8 der Kultur zeigte eine deutliche Population von CD19(+)/CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten. Den Großteil der Kultur machten jedoch die durch die Bestrahlung toten, stark granulierten und fragmentierten EL4B5-Zellen aus. Die Bestrahlung hemmt zunächst die Proliferation der EL4B5-Zellen, am Tag 4 der Kultur ist der Großteil dieser Zellen tot. Die B-Zellen waren auch über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht nicht mehr eindeutig von den toten EL4B5-Zellen abzugrenzen. Es ist möglich, dass durch die mit dem Zelltod einhergehende Faltung der Zellmembran Antikörper unspezifisch gebunden werden konnten. Dies machte die präzise durchflusszytometrische Auswertung unmöglich.

In den folgenden Schritten wurde das von Wen et al. (1987) beschriebene Modell weiter modifiziert, so dass eine durchflusszytometrische Analyse möglich wurde. Da aus der

Literatur bekannt ist, dass das CD40-Signal über 3 Tage für die Aktivierung von B-Zellen ausreichend ist (47, 52), wurde das oben beschriebene Modell dahingehend verändert.

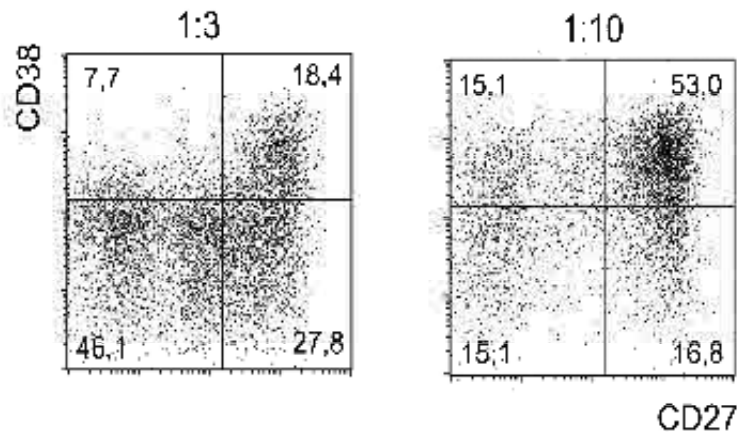


Abb. 12: Ermittlung des geeigneten Verhältnisses von B-Zellen zu Zellen der T-Zelllinie EL4B5 zur Stimulation zu Plasmablasten

Zu >98% magnetisch aufgereinigte CD19(+)-B-Zellen wurden u.a. im Verhältnis 1:3 bzw. 1:10 mit den konstitutiv CD40L exprimierenden EL4B5-Zellen co-kultiviert. Überstand aus einer unspezifisch mit PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozyten-Kultur wurde zu 5 Vol.% zugesetzt. Am Tag 8 erfolgte die Analyse, entstandene Plasmablasten wurden über CD38(++)/CD27(++), definiert. Diese Abbildung ist repräsentativ für die Experimente von 2 Blutspendern.

In einer Primärkultur wurde über 3 Tage das vorübergehende CD40-Signal imitiert, indem B-Zellen und EL4B5-Zellen co-kultiviert wurden. Darauffolgend wurden die EL4B5-Zellen über magnetisch-assoziierte Zellsortierung entfernt und die B-Zellen für 5 weitere Tage kultiviert. Der Überstand wurde zu 5 Vol. % sowohl der Primär- als auch der Sekundärkultur zugesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse an Tag 8 der Kultur zeigte eine Population von 30-40 % CD38(++)/CD20(-)-Zellen (Abb. 13C). Eine ELISpot Analyse zeigte, dass eine vergleichbare Frequenz der Zellen Antikörper sezerniert. Das bestätigte, dass dieses System die B-Zellen veranlasst, in Antikörper-sezernierende Zellen zu differenzieren. Wurden die EL4B5-Zellen bereits am Tag 2 der Primärkultur entfernt, waren die B-Zellen nicht in der Lage zu CD38(++)/CD20(-)-Zellen auszudifferenzieren.

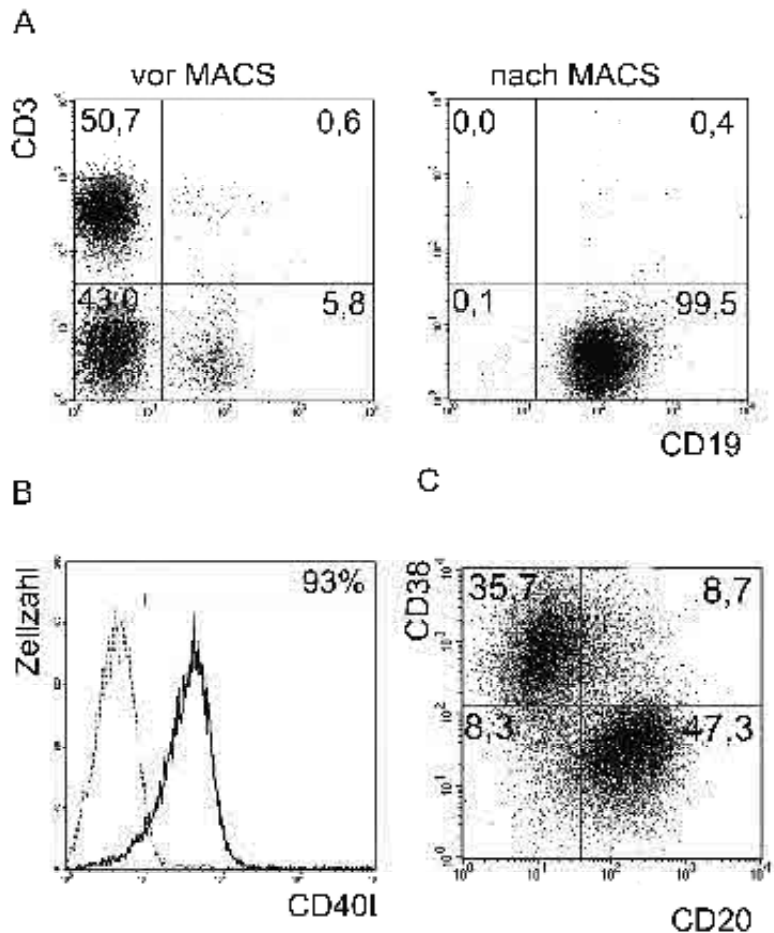


Abb. 13: Stimulation von B-Zellen mit der T-Zelllinie EL4B5

(A) Zu >98% magnetisch aufgereinigte CD19(+)-B-Zellen wurden für drei Tage mit den konstitutiv CD40L-exprimierenden EL4B5-Zellen (B) stimuliert. Nach Entfernen der EL4B5-Zellen wurden die B-Zellen für fünf weitere Tage kultiviert. Überstand aus einer unspezifisch mit PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozyten-Kultur bzw. rekombinante Zytokine wurden über die gesamte Kulturdauer zugesetzt. (C) Die Analyse erfolgte am achten Tag der Kultur. Etwa 30-40 % der B-Zellen differenzierten zu CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten. Diese Abbildung ist repräsentativ für die Experimente von > 25 Blutspendern.

Um den Überstand aus der mit PMA/PHA stimulierten T-Zell/Monozyten-Kultur zu spezifizieren, sollte dieser durch rekombinant hergestellte Zytokine ersetzt werden. Ziel war die Aktivierung von B-Zellen unter definierten und gleichzeitig minimalsten Bedingungen. Der Ersatz des Überstands durch IL-2 und IL-10 resultierte sogar in einer höheren Frequenz von Plasmablasten, was für inhibitorische Bestandteile innerhalb des Überstands spricht. Die

Ergänzung von IL-3 (50 U/ml), IL-6 (50 U/ml) oder TNF- α (10 ng/ml) konnte die Häufigkeit der entstandenen Plasmablasten nicht weiter erhöhen. Die Beifügung von TGF- β (50 U/ml) inhibierte die Bildung von Plasmablasten. Obwohl TGF- β in der B-Zelldifferenzierung eine Rolle für den Klassenwechsel zu IgA spielt, ist es gleichzeitig auch als proliferationshemmend beschrieben (116).

Das Basissystem stellte somit die Co-Kultivierung von EL4B5- und B-Zellen für 3 Tage mit einer anschließenden fünftägigen Kultivierung der B-Zellen dar, wobei IL-2 und IL-10 über die gesamte Kulturdauer zugesetzt wurden. Dieses System wird nachfolgend auch als Basiskultur bezeichnet.

5.2.3 Aktivierung von naiven- und Gedächtnis-B-Zellen mit der Basiskultur

Aus der Literatur ist bekannt, dass über CD40 in Gegenwart von IL-2 und IL-10 fast ausschließlich Gedächtnis-B-Zellen angeregt werden und zu Plasmazellvorläufern ausdifferenzieren (51). So galt es zunächst abzuklären, ob auch in dem im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Modell vorwiegend Gedächtnis-B-Zellen aktiviert werden.

Mit Hilfe magnetisch-assoziiertes Zellsortierung wurden naive und Gedächtnis-B-Zellen aus peripherem Blut aufgereinigt. Erstere machten 75,4 +/- 6,3 % und letztgenannte 24,6 +/- 6,3 % der B-Zellpopulation aus. Die Anreicherung naiver B-Zellen erfolgte vorerst über eine Depletion CD27-exprimierender Zellen mit folgender Anreicherung über CD19. Im Fall der Gedächtnis-B-Zellen wurden vor der Anreicherung der CD19(+)-B-Zellen die IgD-exprimierenden naiven B-Zellen entfernt. Nach der Trennung hatten die naiven und Gedächtnis-B-Zellen eine Reinheit von 83,9 +/- 6,4 % respektive 84,8 +/- 2,1 %. (Abb. 14A).

Beide Populationen wurden dann in Kultur genommen und mit den EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 aktiviert. Am Tag 8 der Kultur befanden sich in der Gedächtnis-B-Zellkultur 39,5 +/- 1,3 % CD38(++)/CD20(-)-Zellen, während es in der Kultur der naiven Zellen 13,9 +/- 0,7 % (Abb. 14B) waren. Dies bestätigte, dass auch in diesem Stimulationsmodell vorwiegend Gedächtnis-B-Zellen aktiviert wurden. Ob es sich bei den, nach der Stimulation angereicherter naiver B-Zellen, entstandenen CD38(++)/CD20(-)-Zellen um ausdifferenzierte naive oder Gedächtnis-B-Zellen handelte, ist aufgrund der Reinheit von nur 83,9 +/- 6,4 % nicht zu unterscheiden. Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Für das ursprüngliche Ziel, die Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 während einer Gedächtniszellantwort zu verfolgen, ist mit der hier entwickelten Basiskultur die Grundlage geschaffen worden.

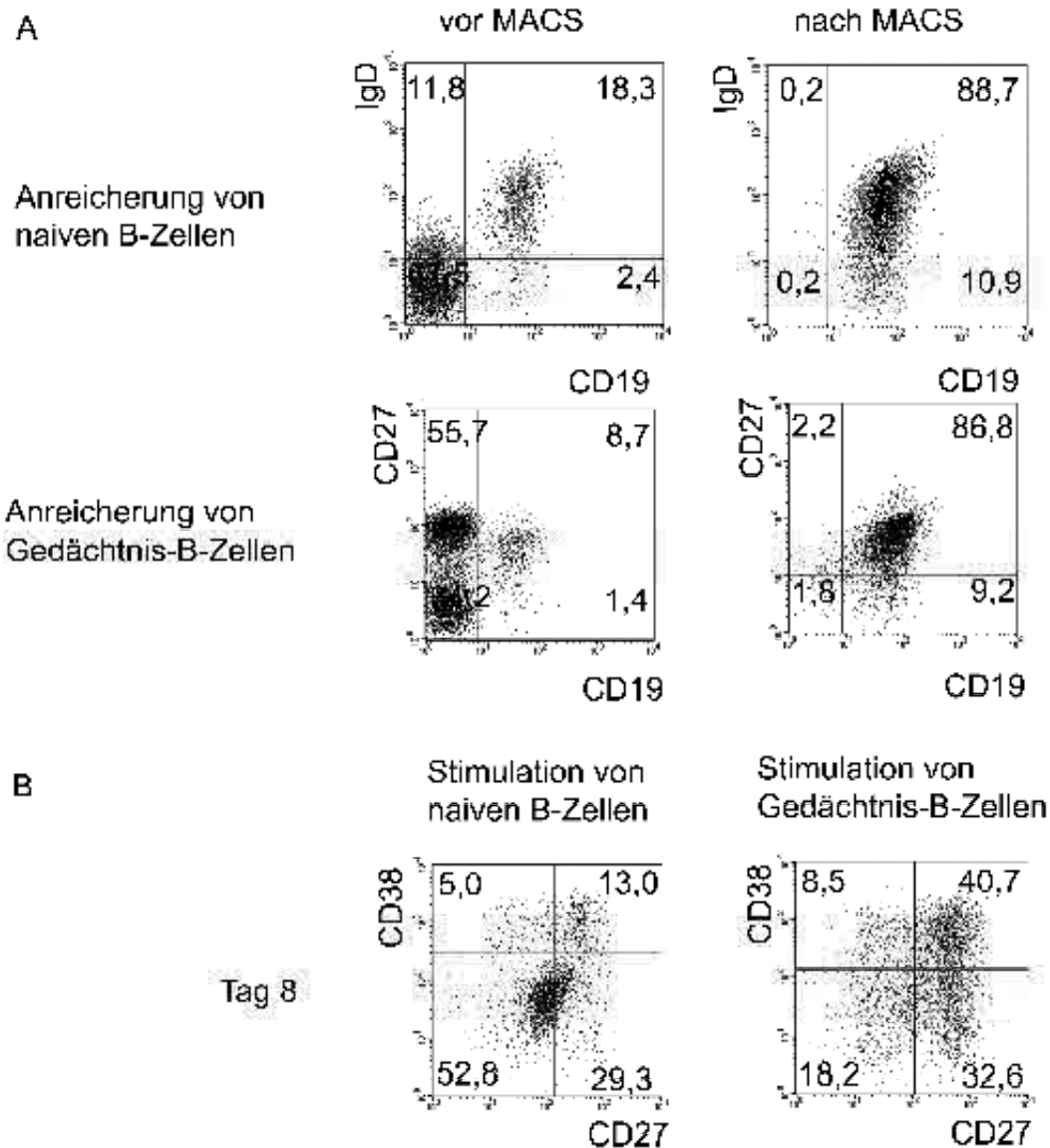


Abb. 14: Aktivierung von naiven und Gedächtnis-B-Zellen mittels EL4B5-Zellen.

(A) Anreicherung naiver respektive Gedächtnis-B-Zellen aus PBMC über magnetisch-assoziierte Zellsortierung. Naive B-Zellen wurden über die Depletion von CD27(+)-Zellen und Anreicherung CD19(+)-Zellen aufgereinigt (Reinheit ca. 84 %). Diese Zellen wurden über CD19(+)/IgD(+) definiert (obere Bilder). Im Fall der Gedächtnis-B-Zellen wurden vor der Anreicherung der CD19(+)-B-Zellen die IgD-exprimierenden naiven B-Zellen entfernt. Gedächtnis-B-Zellen sind CD19(+)/CD27(+) (untere Bilder) (Reinheit ca. 85 %). (B) Am Tag 8 der Stimulation mit EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 wurde die Frequenz der aus naiven (linkes Bild) und Gedächtnis-B-Zellen (rechtes Bild) entstandenen CD38(++)/CD27(++)-Plasmablasten bestimmt. Diese Abbildung ist repräsentativ für sechs Blutspender.

5.2.4 Analyse von CXCR3 und CXCR4 auf ausdifferenzierenden B-Zellen

Das oben beschriebene Modell zur Stimulation von B-Zellen mittels der T-Zelllinie EL4B5, IL-2 und IL-10 sollte nun als Ausgangspunkt dienen, die Regulation von CXCR3 und CXCR4 während der Ausdifferenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen zu verfolgen. Die Expression von CXCR3 und CXCR4 wurde am Tag 0, Tag 3 und Tag 8 der Kultur durchflusszytometrisch analysiert.

Von den isolierten B-Zellen exprimierten 13,5 +/- 7,1 % bereits zu Beginn der Kultur CXCR3. Davon trugen 23,7 +/- 8,1 % der Gedächtnis-B-Zellen und 6,4 +/- 4,3 % der naiven B-Zellen den Rezeptor. Analysiert an Tag 3 und Tag 8 blieb die Häufigkeit CXCR3-ausprägender B-Zellen, sowohl der aktivierten CD38-/CD38(+/-)/CD20(+)-B-Zellen als auch der CD38(++)/CD20(-)-Plasmazellvorläufer, bis zum achten Tag der Kultur in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 15).

Im Unterschied dazu waren am Tag 0 schon 77,7 % +/- 7,8 der gesamten B-Zellpopulation, CXCR4 positiv. Es exprimierten 87,6 +/- 6,1 % der naiven und 63,3 +/- 12,1 % der Gedächtnis-B-Zellen diesen Chemokinrezeptor. Auch hier blieb die Frequenz der CXCR4-tragenden Zellen auf den zu unterschiedlichen Graden aktivierten B-Zellen bis zu Tag 8 vergleichbar (Abb. 15).

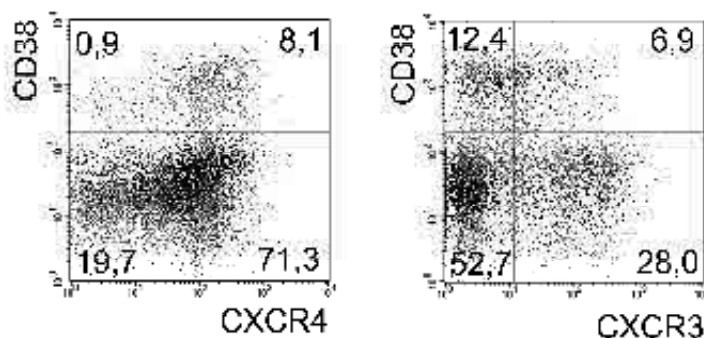


Abb. 15: CXCR3 und CXCR4-Expression nach B-Zellstimulation mit CD40L

Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4- respektive CXCR3-Expression auf generierten CD38(++)-Plasmablasten und aktivierten CD38(+/-)-B-Zellen am Tag 8. Die B-Zellen wurden mit CD40L exprimierenden EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 für drei Tage und mit IL-2 und IL-10 für fünf weitere Tage stimuliert. Diese Abbildung ist repräsentativ für fünf Blutspender.

5.2.5 Die Induktion der CXCR3-Expression erfolgt in der frühen Phase der B-Zellaktivierung

Die Assoziation zwischen der Co-Expression von CXCR3 und der Antikörpersubklasse IgG1 ließ bereits vermuten, dass Zytokine, die für den Klassenwechsel verantwortlich sind, auch an der Induktion von CXCR3 beteiligt sein können. Die Regulation von Chemokinrezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen durch Zytokine wurde bereits beschrieben (86, 117, 118).

Um zu prüfen, ob Zytokine tatsächlich eine Rolle bei der Regulation von CXCR3 auf B-Zellen spielen, wurden diese mit der Basiskultur aktiviert. Als Zytokinquelle wurde zunächst der von Wen et al. (1987) beschriebene Überstand aus der PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozyten-Kultur verwendet (115). Die Zusammensetzung sowie die Menge der einzelnen Zytokine wurde nicht weiter charakterisiert und ist vermutlich abhängig vom Blutspender und der Zusammensetzung der T-Zell- und Monozytenpopulationen variabel. Wurde der Überstand am Tag 0 der Basiskultur hinzugegeben, konnte CXCR3 auf 70-80 % der B-Zellen detektiert werden. Wurde der Überstand am Tag 3 oder am Tag 6 der Kultur zugegeben, konnte keine Induktion von CXCR3 beobachtet werden (Abb. 16).

Dieses Resultat zeigt, dass CXCR3 zu Beginn der B-Zellaktivierung von löslichen Faktoren induziert werden kann. Die Zugabe von Überstand ab dem dritten Tag der Stimulation führte nicht zu einer erhöhten Frequenz CXCR3 exprimierender Zellen.

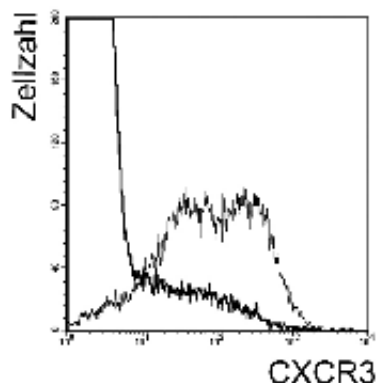


Abb. 16: Die Induktion von CXCR3 erfolgt zu Beginn der B-Zellaktivierung.

B-Zellen wurden mittels EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 für drei Tage und mit IL-2 und IL-10 für fünf weitere Tage stimuliert. Die Analyse der CXCR3-Expression der B-Zellen erfolgte am Tag 8 der Kultur. Zusätzlich zur Basiskultur wurde der Überstand einer PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozytenkultur am Tag 6 der Kultur (dunklere Linie) bzw. am Tag 0 der Kultur (hellere Linie) hinzugegeben. Diese Abbildung ist repräsentativ für drei Blutspender.

5.2.6 IFN- γ induziert die Expression von CXCR3

Die Liganden von CXCR3 sind CXCL9, CXCL10 und CXCL11. Sie werden in entzündetem Gewebe verstärkt synthetisiert und leiten Lymphozyten entlang eines Konzentrationsgradienten in Entzündungsherde (119). Um einen oder mehrere Faktoren aus dem Überstand, der/die für die Induktion von CXCR3 verantwortlich ist/sind, genauer zu entschlüsseln, sollten nun verschiedene rekombinante Zytokine zu Beginn der Kultur ergänzt werden. In Frage kamen einerseits Interleukine, die während Entzündungen vermehrt sezerniert werden: Dazu gehören IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Andererseits werden charakteristischerweise IFN- γ - welches gleichzeitig zu den inflammatorischen Zytokinen gehört - und IL-4 während Th1- respektive Th2-Antworten gebildet (23). Die Möglichkeit, dass von T-Zellen produzierte Interleukine für Klassenwechsel und die Induktion von CXCR3 eine Rolle spielen, wurde bereits erwähnt.

Da 13,5 +/- 7,1 % der B-Zellen bereits vor der Kultur CXCR3 auf ihrer Oberfläche tragen, wurden für die folgenden Experimente mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) die CXCR3(+)-B-Zellen entfernt. Auf diese Weise sollte abgesichert werden, dass es sich nicht um die Expansion der bereits CXCR3-exprimierenden Zellen handelt. Die CXCR3(-)-B-Zellen wurden mit der Basiskultur aktiviert. Parallel dazu wurden Kulturen angesetzt, denen eines der oben genannten Interleukine beigelegt wurde. In der Basiskultur wurde bis Tag 8 ein Anstieg auf 19,5 +/- 3,8 % CXCR3 exprimierende Zellen beobachtet. Dies betraf sowohl die CD19(+)-B-Zellen als auch die CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten (Abb. 16). Die Zugabe von IFN- α (20 U/ml, 200 U/ml, 6600 U/ml), IFN- β (20 U/ml, 200 U/ml, 6600 U/ml), IL-1 β (50 U/ml), IL-4 (100 U/ml), IL-6 (50 U/ml) oder TNF- α (200 U/ml) konnte die Häufigkeit der CXCR3 exprimierenden Zellen nicht erhöhen. Wurde IFN- γ (50 U/ml) ergänzt, konnte jedoch am Tag 8 - verglichen mit der Basiskultur - eine signifikant ($p < 0,0078$) höhere Häufigkeit von 49,9 +/- 6,5 % CXCR3(+)-Plasmablasten beobachtet werden (Abb. 16, Tab. 3). Ein Anstieg der CXCR3-Expression war ebenfalls auf den CD19(+)-B-Zellen an Tag 3 und Tag 8 zu beobachten. Während IL-1 β und IL-4 in einigen, IFN- α /IFN- β in allen Experimenten die Häufigkeit von CD38(++)/CD20(-)-Zellen deutlich steigern konnten, wurde die Häufigkeit dieser Zellen durch eine 10-fache Erhöhung der IFN- γ Konzentration (2000 U/ml) reduziert. Die Steigerung der CXCR3-exprimierenden Zellen war mit der erhöhten IFN- γ Konzentration nur minimal (Tab. 3). Dass die Zugabe von IFN- γ am Tag 3 keinen Einfluss auf die CXCR3-Expression hatte (Abb. 17, Tab. 3), bestätigte, dass die Induktion dieses Moleküls früh während der Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen reguliert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den getesteten Zytokinen nur IFN- γ die CXCR3-Expression während der frühen Phase der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen induzieren kann.

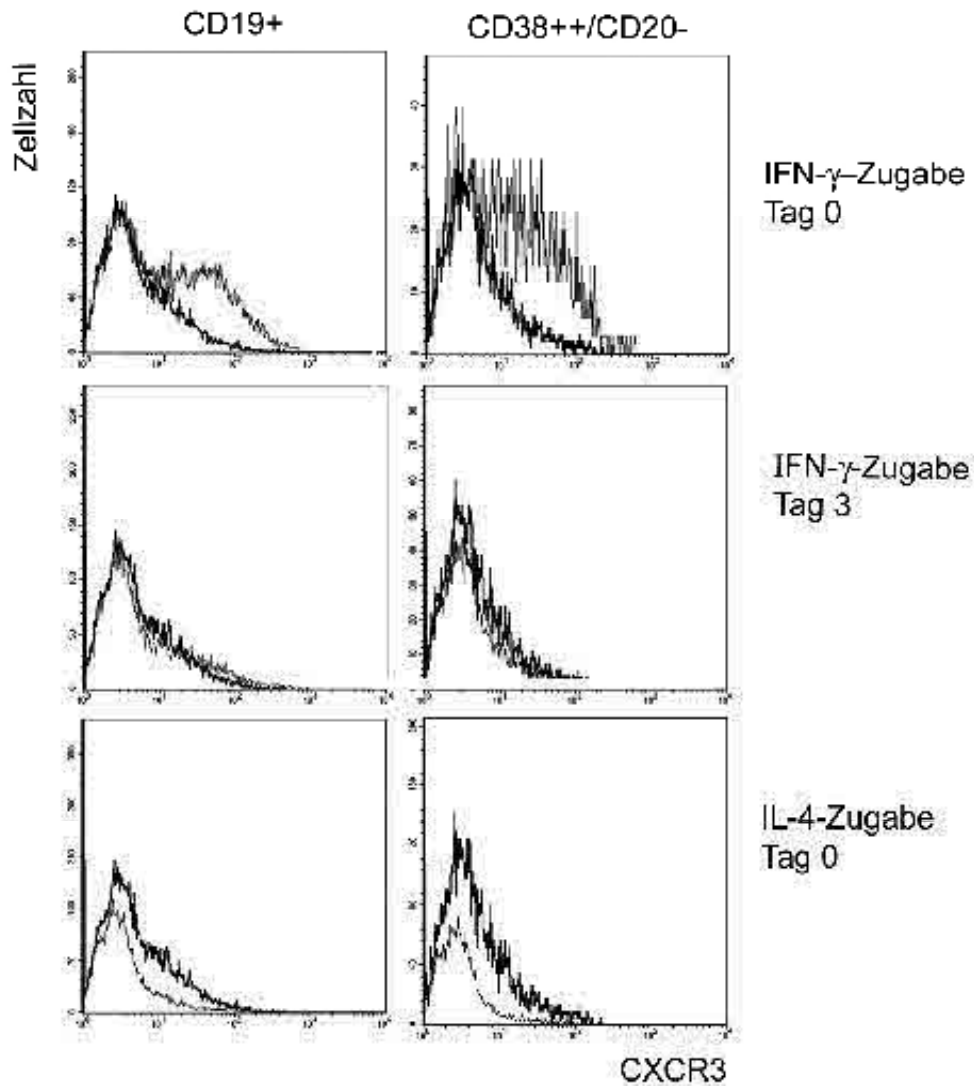


Abb. 17: CXCR3 wird auf B-Zellen und Plasmablasten durch IFN- γ induziert

CXCR3(-)-B-Zellen wurden mittels EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 für drei Tage und mit IL-2 und IL-10 für fünf weitere Tage stimuliert. Die Expression von CXCR3 auf den CD19(+)-B-Zellen (linke Bilder) und den CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten (rechte Bilder) wurde am Tag 8 durchflusszytometrisch analysiert (dunklere Linie). IFN- γ wurde am Tag 0 der Stimulation (obere Bilder) oder am Tag 3 (mittlere Bilder) hinzugegeben. Alternativ wurde IL-4 am Tag 0 der Basiskultur (untere Bilder) ergänzt. Die Anzahl der Blutspender mit der jedes Experiment durchgeführt wurde ist in Tabelle 2 angegeben.

Tab 3. Einfluss von Zytokinen auf die CXCR3 Expression

Kulturbedingungen	CXCR3(+) Zellen	Differenz CXCR3(+) Zellen zur Basiskultur	Anzahl untersuchter Blutspender (n)
CD40L, IL-2, IL-10 (Basiskultur)	19.5 +/- 3.8 %	-	8
+ IFN- γ (200 U/ml) Tag (T) 0	50.0 +/- 6.5 %	30.5 +/- 10.3 %	8
+ IFN- γ (2000 U/ml) T 0	65.8 +/- 4.7 %	34.7 +/- 8.5 %	3
+ IFN- γ (200 U/ml) T 3	12.8 +/- 1.0 %	4.5 +/- 4.8 %	3
+ IFN- α/β (20 U/ml) T 0	23.4 +/- 1.8 %	3.9 +/- 5.6 %	4
+ IFN- α/β (200 U/ml) T 0	18.4 +/- 1.6 %	-1.1 +/- 5.4 %	4
+ IFN- α/β (6600U/ml) T 0	24.1 +/- 1.8 %	4.6 +/- 5.6 %	4
+ IL-4 (100 U/ml) T 0	22.4 +/- 5.5 %	3.7 +/- 9.3 %	5
+ IL-6 (50 U/ml) T 0	22.9 +/- 3.7 %	-8.2 +/- 7.5 %	3
+ IL-1 β (50 U/ml) T 0	33.6 +/- 0.7 %	0.6 +/- 4.5 %	2
+ TNF- α (200 U/ml) T 0	33.1 +/- 0.7 %	-2.2 +/- 4.5 %	2
CpG 2006, IL-2, IL-10	25.8 +/- 2.6 %	-	5
+ IFN- γ (200 U/ml) T 0	43.4 +/- 2.3 %	30.5 +/- 10.3 %	5

5.2.7 IFN- γ wirkt direkt auf B-Zellen

Aus dem vorangegangenen Experiment geht hervor, dass IFN- γ die Expression von CXCR3 beeinflusst. Es ist jedoch nicht beantwortet, ob es sich hierbei um einen direkten Effekt auf die B-Zellen handelt. Da IFN- γ nur eine Wirkung zeigte, wenn es zu Beginn der Kultur präsent war, musste ein indirekter Effekt durch die ebenfalls zu Beginn der Kultur anwesenden EL4B5-Zellen ausgeschlossen werden. Zur Abklärung wurden CXCR3(-)-B-Zellen mit CpG 2006, IL-2 und IL-10 in der Abwesenheit von weiteren Zellen stimuliert. CpG ist ein Oligonukleotid, das Gedächtnis-B-Zellen über den TLR-9 aktiviert (35). Die Zugabe von IFN- γ zu Beginn in eine parallel laufende Kultur sollte auch unter diesen

Stimulationsbedingungen dessen Einfluss auf die CXCR3-Expression klären. Am dritten und achten Tag wurde die CXCR3-Expression auf B-Zellen und den entstandenen Plasmablasten untersucht. Auch in diesem Stimulationssystem konnte durch IFN- γ die CXCR3-Expression auf den generierten Plasmablasten von einer Häufigkeit von 25,4 +/- 2,3 % auf 42,2 +/- 1,8 % erhöht werden; es handelt sich hierbei folglich um einen direkten Effekt auf die B-Zellen (Abb. 18, Tab. 3).

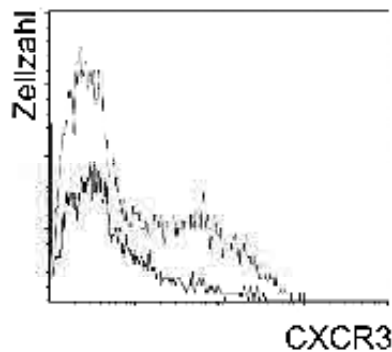


Abb. 18: IFN- γ induziert CXCR3 direkt.

CXCR3(-)-B-Zellen wurden mit CpG 2006, IL-2 und IL-10 (dunklere Linie) bzw. zusätzlich mit IFN- γ (helle Linie) aktiviert. Die Expression von CXCR3 wurde durchflusszytometrisch am Tag 8 auf den CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten gemessen. Diese Abbildung ist repräsentativ für Experimente von fünf Bluspendern (siehe Tabelle 2).

5.2.8 IFN- γ induziert Migrationsfähigkeit gegen CXCL9

Die Expression eines Chemokinrezeptors und die Fähigkeit, sich gerichtet gegen einen Konzentrationsgradienten zu bewegen, sind nicht zwingend miteinander verbunden. Es wurde u.a. in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Antigen-spezifische Plasmazellen aus dem Knochenmark sechs Tage nach einer Immunisierung noch gegen den CXCR4-Liganden migrieren können, während diese Fähigkeit zwölf Tage nach der Immunisierung trotz unveränderter CXCR4-Expression verloren ging (85, 94).

Ob der induzierte Chemokinrezeptor CXCR3 mit einem gesteigerten Migrationsverhalten IgG-sezernierender Plasmazellvorläufer einher geht, sollte im Chemotaxis-Assay untersucht werden. Dazu wurde der Chemotaxis-Versuch zunächst für humane IgG-sezernierende Zellen etabliert. Mit Tetanus-Toxoid stimulierte PBMC wurden nach einer Dauer von 6 Tagen in die obere Kammer einer Transwell[®]-Platte gegeben. Die Chemokine CXCL12, als CXCR4-Ligand und CXCL9, Ligand von CXCR3, wurden in Konzentrationen von 0,1 nM, 10 nM und 66

100 nM eingesetzt. IgG-sezernierende Zellen wurden im ELISpot quantifiziert. Die Titration der Chemokine ergab - vergleichbar zu den Versuchen mit murinen Zellen (94) - eine maximale Migrationsfrequenz in Bereichen von 0,1-10 nM für CXCL12 und 10-100 nM für CXCL9. In der parallel zu dieser Arbeit angefertigten Diplomarbeit konnten diese Konzentrationsbereiche ebenfalls für nach Immunisierungen aus dem Blut gewonnenen Plasmablasten bestätigt werden (131).

Im Chemotaxis-Versuch wurde nun untersucht, ob die Zugabe von IFN- γ das Migrationsverhalten IgG-sezernierender Zellen nach der Stimulation von CXCR3(-)-B-Zellen mittels der Basiskultur ändert. Die in der 100 %-Kontrolle ermittelte Gesamtzahl IgG-sezernierender Zellen war vergleichbar, unabhängig von der Zugabe von IFN- γ . Bestimmt wurde der Anteil IgG-sezernierender Zellen, die gegen den Liganden CXCL9 (100nM) migrieren. Das jeweilige Ergebnis wurde auf die zugehörige 100 %-Kontrolle bezogen. Die sogenannte Basalmigration gegen Medium ohne Zusätze von Chemokinen stellte eine Negativ-Kontrolle dar, sie lag bei <2 %. Wurde der Kultur kein IFN- γ zugesetzt, lag die Frequenz der migrierten IgG-sezernierenden Zellen bei 16,2 +/- 3,9 %. Die Präsenz von IFN- γ zu Beginn der Stimulation erhöhte diese Häufigkeit signifikant auf 43,5 +/- 6,6 % ($p < 0,0313$) (Abb. 19).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Induktion von CXCR3 mit IFN- γ auf IgG-sezernierenden Zellen mit einer verstärkten Migration gegen CXCL9 einher geht.

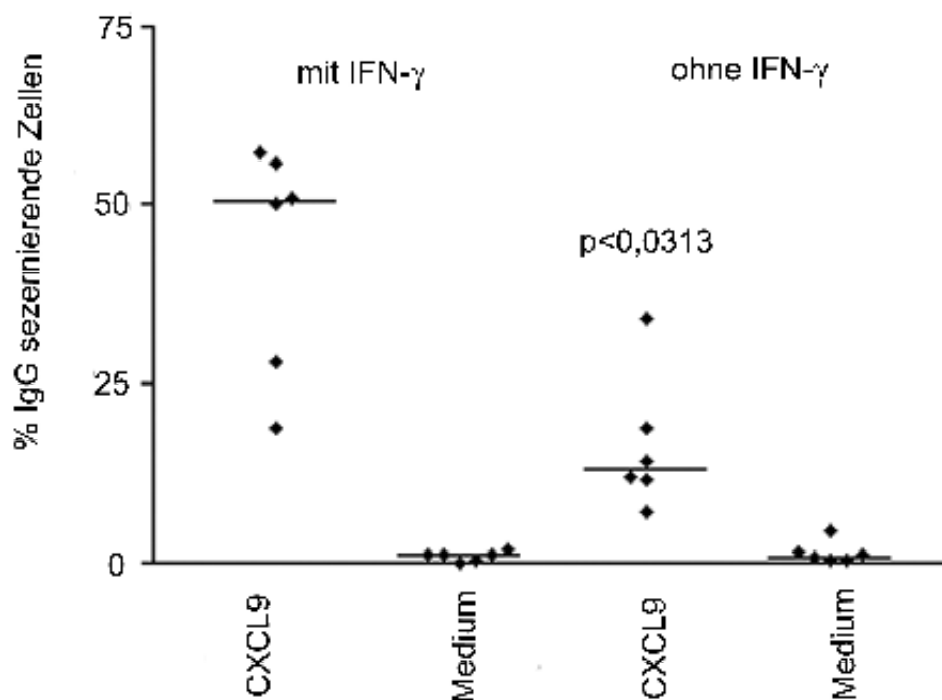


Abb. 19: Bestimmung der Chemotaxis IgG-sezernierender Plasmablasten gegen den CXCR3 Liganden CXCL9

CXCR3(-)-B-Zellen wurden mit EL4B5-Zellen, IL-2 und IL-10 für drei Tage und mit IL-2 und IL-10 für fünf weitere Tage stimuliert. In einer parallel verlaufenden Kultur wurde IFN- γ zu Beginn der Basiskultur ergänzt. Am achten Tag der Kultur wurde die Migration der generierten IgG-sezernierenden Zellen gegen 100nM CXCL9 bzw. gegen Medium im Chemotaxis-Versuch untersucht und im IgG-spezifischen ELISpot quantifiziert. Die Frequenzangaben beziehen sich jeweils auf die zugehörige 100 %-Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus einem dreifach angesetzten Experiment.

5.2.9 CXCR3-Expression ist stabil nach Re-Aktivierung

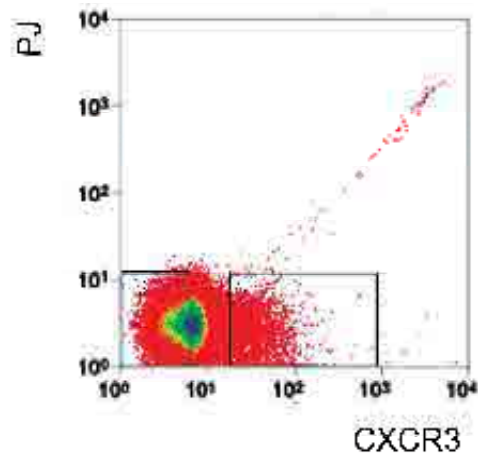
Wurde die gesamte B-Zellpopulation aktiviert, blieb die Häufigkeit CXCR3-ausprägender B-Zellen konstant. Ob die CXCR3(+)-Gedächtnis-B-Zellen möglicherweise ein Gedächtnis für CXCR3 besitzen, wenn sie aktiviert werden, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

Hierzu wurden von jeweils einem Spender Kulturen dreier verschiedener Zellpopulationen mit CpG, IL-2 und IL-10 stimuliert. Nach Aufreinigung der CD19(+)-B-Zellen über magnetisch-assoziierte Zellsortierung wurde CXCR3 auf der Oberfläche dargestellt und über

Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung in CXCR3-positive und CXCR3-negative Zellen sortiert (Abb. 20A). Parallel wurde eine dritte Kultur aus Zellen angesetzt, die den Zellsortierer passiert hatten, ohne auf eine der genannten Populationen sortiert zu sein und so die gesamte B-Zellpopulation repräsentierten. Die Analyse der Kulturen am Tag 3 und Tag 8 ergab, dass 19,3 +/- 11,1 % der gesamten Zellfraktion, 11,4 +/- 2,9 % der auf CXCR3(-) sortierten und 75,0 +/- 7,9 % der auf CXCR3(+)-sortierten Zellen diesen Chemokinrezeptor auf ihrer Oberfläche trugen (Abb. 20B).

Ist CXCR3 einmal induziert, bleibt es auf Gedächtnis-B-Zellen unabhängig von der Zugabe von IFN- γ während deren Aktivierung konstant.

A



B

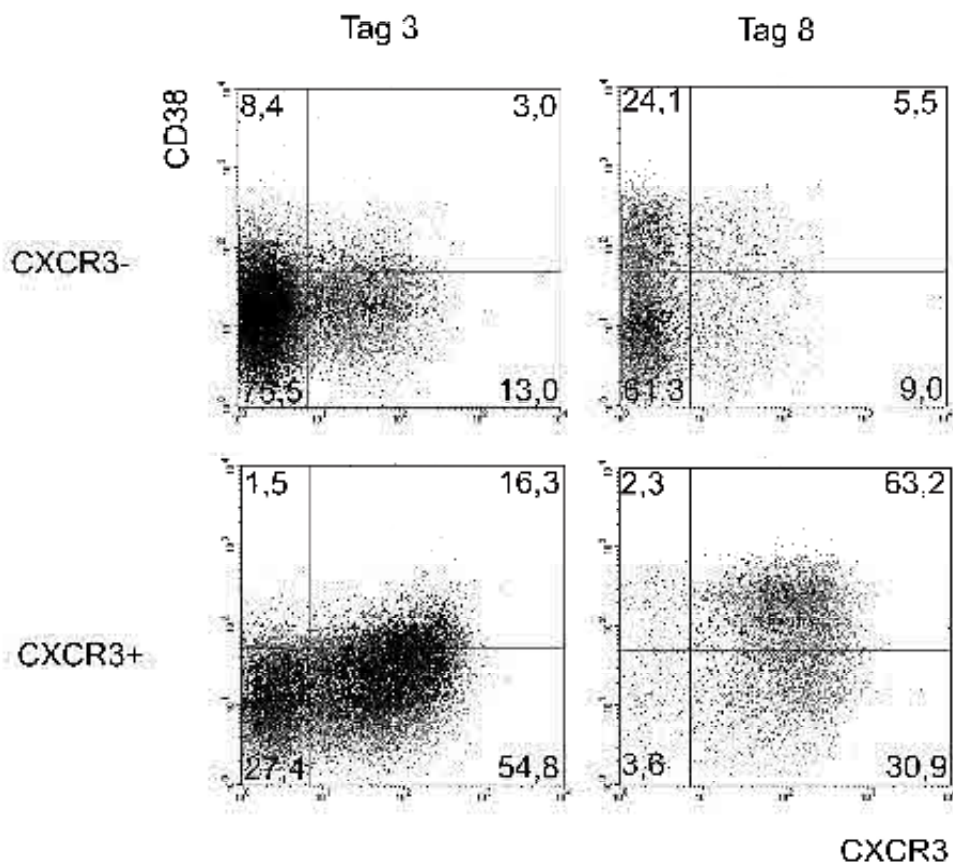


Abb. 20: Stimulation CXCR3(+)- und CXCR3(-)-B-Zellen.

(A) CD19(+)-B-Zellen wurden über den Zellsortierer in CXCR3(+) (rechtes Fenster) und CXCR3(-) (linkes Fenster) getrennt. (B) CXCR3(+) (untere Bilder) und CXCR3(-) (obere Bilder) B-Zellen wurden mit CpG 2006, IL-2 und IL-10 aktiviert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte jeweils am dritten (linke Bilder) und achten (rechte Bilder) Tag der Stimulation. Diese Abbildung zeigt repräsentativ ein Experiment von fünf untersuchten Blutspendern.

5.2.10 CXCR4 wird konstitutiv in T-Zell-abhängiger wie T-Zell-unabhängiger Aktivierung hochreguliert

CXCR4 wurde auf 77,7 +/- 7,8 % der B-Zellen exprimiert und erhöhte sich nach Stimulation mit der Basiskultur auf 90-95 %. Es ist denkbar, dass der Rezeptor während der Aktivierung von zuvor CXCR4(-)-Zellen hochreguliert wurde, oder dass nur bereits CXCR4 exprimierende Zellen stimuliert wurden. Um die Regulation genauer verfolgen zu können, wurden aus den magnetisch angereicherten B-Zellen die CXCR4(+) mittels FACS heraussortiert. Wurden die CXCR4(-), hauptsächlich dem Gedächtniszellpool angehörenden Zellen mit der Basiskultur aktiviert, exprimierten bereits am dritten Tag der Kultur mehr als 50 % der Zellen den Rezeptor, diese Häufigkeit steigerte sich bis zum Tag 8 der Kultur auf über 70 %. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei der beobachteten Hochregulation von CXCR4 um ein T-Zell-abhängiges Signal handelte, wurden parallel zu der genannten Aktivierung CXCR4(-)-B-Zellen mit CpG 2006, IL-2 und IL-10 oder *Staphylococcus aureus* Cowan I, IL-2 und IL-10 stimuliert. Ebenfalls in den T-Zell-unabhängigen Aktivierungsmodellen erhöhte sich die Häufigkeit CXCR4(+)-Zellen. In den getesteten Stimulationsmodellen exprimierten am dritten Tag bereits 64,6 +/- 19,6 % der CD19(+)-Zellen, am achten Tag 67,9 +/- 11,0 % der aktivierten CD19(+)-B-Zellen und CD38(++)/CD20(-)-Plasmazellblasten den Chemokinrezeptor CXCR4 (Abb. 21). Es handelt sich bei den eingesetzten Stimulationsfaktoren um Signale, die essentiell für die Plasmazelldifferenzierung sind. Ein weiteres Reduzieren der Stimulationsbedingungen zur Identifikation des CXCR4 induzierenden Faktors ist daher nicht möglich.

Diese Ergebnisse sprechen für eine konstitutiv mit der Aktivierung einher gehende Hochregulation der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4.

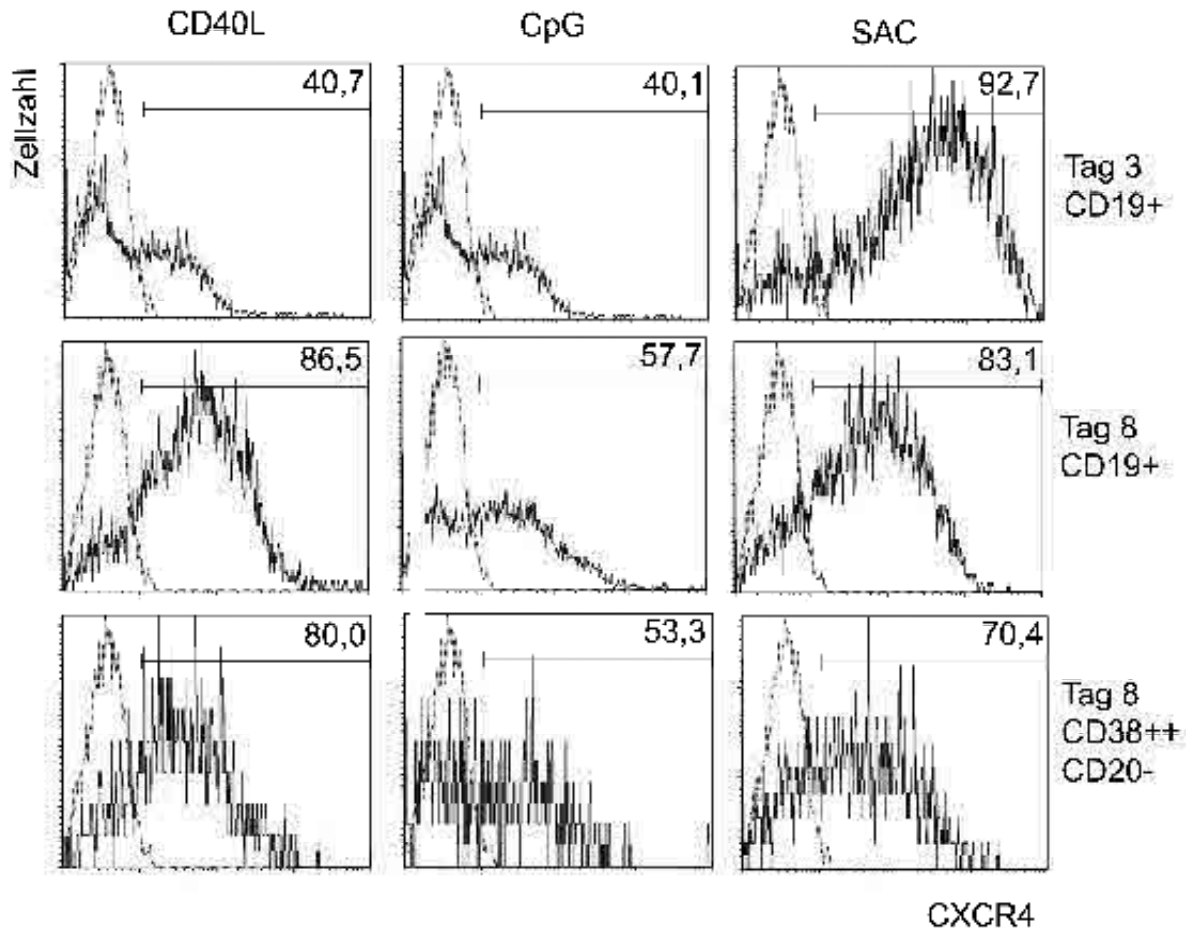


Abb. 21: CXCR4-Expression nach T-Zell-abhängiger und T-Zell-unabhängiger B-Zellstimulation

CXCR4(-)-B-Zellen wurden nach der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (helle Linie) mit IL-2, IL-10 und EL4B5 -Zellen (CD40L) (linke Bilder) oder CpG 2006 (mittlere Bilder) oder *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) (rechte Bilder) stimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression der CD19(+)-B-Zellen erfolgte am dritten Tag (obere Reihe). Am achten Tag wurden sowohl B-Zellen (mittlere Reihe) als auch CD38(++)/CD20(-)-Plasmablasten (untere Reihe) untersucht. Die angegebenen Frequenzen beziehen sich auf die CXCR4(-)-B-Zellen nach der Sortierung (helle Linie). Diese Abbildung ist repräsentativ für drei Experimente. Aufgrund der geringen Anzahl der CXCR4(-)-B-Zellen wurden für jedes Experiment PBMC von 5-8 Blutspendern vereinigt.

5.2.11 Die Hochregulation der CXCR3- und CXCR4-Expression während der terminalen B-Zelldifferenzierung ist proliferationsunabhängig

Es wurde in neueren Publikationen beschrieben, dass die Expression von verschiedenen Chemokinrezeptoren, darunter CXCR3 und CXCR4, mit der Zahl der Zellteilungen korreliert ist (120, 121). Dazu wurde durchflusszytometrisch dem Verlust von CFDA-SE, einem Marker für Zellteilung, die Chemokinrezeptorexpression gegenüber gestellt.

In den folgenden Experimenten wurden sortierte CXCR3(-)- respektive CXCR4(-)-B-Zellen mit CFDA-SE gefärbt. Anschließend wurden sie mit der Basiskultur oder mit CpG aktiviert. Im Falle der CXCR3(-)-B-Zellen wurde dieser Rezeptor mit IFN- γ induziert. Nach 8 Tagen wurde die CFDA-SE-Färbung mit der Expression von CXCR3 respektive CXCR4 korreliert. Verglichen wurden die Häufigkeiten von proliferierenden Zellen und den nicht-proliferierenden, die den entsprechenden Chemokinrezeptor auf ihrer Oberfläche trugen. Die Häufigkeit der proliferierenden sowie der nicht-proliferierenden Zellen, die CXCR3 bzw. CXCR4 ausprägten unterschied sich in beiden Simulationsmodellen nicht (Abb. 22, Tab. 4).

Zusammengefasst kann also festgehalten werden, dass die Hochregulation von CXCR3 und CXCR4 während der Ausdifferenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen proliferationsunabhängig ist.

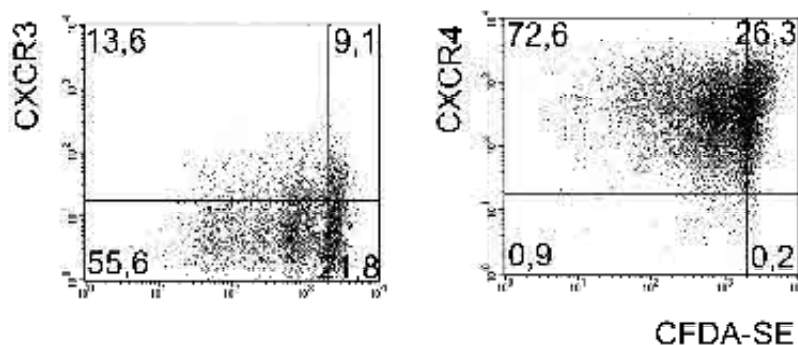


Abb. 22: Die Expression von CXCR3 und CXCR4 ist proliferationsunabhängig

CXCR3(-)- respektive CXCR4(-)-B-Zellen wurden mit CFDA-SE gefärbt und mit der Basiskultur aktiviert. Die CXCR3(-)-B-Zellen wurden zusätzlich mit IFN- γ co-stimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am Tag 8. Dieses Experiment ist repräsentativ für drei unterschiedliche Experimente. Aufgrund der geringen Anzahl CXCR3(-)- und CXCR4(-)-B-Zellen aus einem Spender wurden für jedes Experiment PBMC von 6-10 Blutspendern vereinigt.

Tab. 4: Frequenzen proliferierender und nicht- proliferierender CXCR3(+)- bzw. CXCR4(+)-Zellen

Experiment	CXCR3(+)	CXCR3(+)	CXCR4(+)	CXCR4(+)
	proliferierend	nicht proliferierend	proliferierend	nicht proliferierend
Experiment 1				
CD40L-Stimulation	32,20%	28,10%	97,10%	97,30%
Experiment 2				
CD40L-Stimulation	19,70%	29,40%	98,80%	99,40%
Experiment 3				
CD40L-Stimulation	34,00%	24,00%	90,60%	95,20%
Experiment 4				
CpG-Stimulation	73,00%	69,90%	56,00%	63,70%
Experiment 5				
CpG-Stimulation	67,10%	59,30%	80,60%	84,30%