

6 Diskussion

6.1 Einleitung

Plasmazellen und deren unmittelbare Vorläufer sind verantwortlich für alle in sämtlichen Körperflüssigkeiten vorkommenden Antikörper, den Effektormolekülen des erworbenen humoralen Immunsystems. Sie bilden einen elementaren Schutz vor Infektionen, können aber auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein (106). Bei den Antikörper-sezernierenden Zellen, die in sekundär lymphatischen Organen sowie dem Blut nachgewiesen werden, handelt es sich vermutlich vorrangig um Plasmablasten, die unmittelbaren Plasmazellvorläufer. Für den langanhaltenden spezifischen Antikörpertiter nach einer Auffrischimpfung mit Tetanus-Toxoid sind Plasmazellen aus dem Knochenmark verantwortlich (7, 110). Die dort lokalisierten Plasmazellen sind weiter ausdifferenziert und unterscheiden sich von den Plasmablasten aus sekundär lymphatischen Organen und Blut in der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (105, 113). Die Migration der Plasmablasten vom Ort ihrer Entstehung in das entsprechende Zielorgan wird u.a. über Chemokinrezeptoren reguliert (12, 76, 96).

Die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 wurden auf IgA-sezernierenden Zellen identifiziert. Während diese Zellen über CCR9 und den zugehörigen Liganden ausschließlich in den Dünndarm dirigiert werden, werden IgA-sezernierende Plasmablasten über CCR10 in sämtliche Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe geleitet (98, 122). Mit der Ausdifferenzierung zu Plasmazellen konnte für CCR9 ein Verlust der Migrationsfähigkeit gegen den zugehörigen Liganden beobachtet werden (122).

Plasmazellen aus dem Knochenmark prägen CXCR4, CCR10 und CXCR6 aus und können gegen die korrespondierenden Liganden migrieren (13, 105). Für die Migration von Plasmazellvorläufern aus dem Lymphknoten ins Knochenmark spielt der Chemokinrezeptor CXCR4 eine ausschlaggebende Rolle (3, 94). Mit der Reifung der Plasmablasten geht die Fähigkeit verloren, gegen Konzentrationsgradienten des CXCR4-Liganden zu migrieren (94). Des Weiteren haben IgG-sezernierende Zellen die Kapazität, gegen die Liganden CXCL9, 10 und 11 zu migrieren (94). Bei dem zugehörigen Rezeptor handelt es sich um CXCR3. Die Expression von CXCR3 ist vor allem in entzündetem Gewebe stark erhöht (102, 119), CXCR3 könnte daher für die Akkumulation von Plasmazellen und deren Vorläufern in chronisch entzündeten Geweben mit verantwortlich sein (96). Möglicherweise wandern Plasmablasten in entzündetes Gewebe ein und reifen dort weiter zu Plasmazellen aus (4).

Da die meisten Informationen über die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4, die an der Akkumulation IgG-sezernierender Zellen beteiligt sind, aus Resultaten muriner Plasmazellen und deren Vorläufern stammten, galt das Interesse dieser Arbeit den humanen B-Zellen. Untersucht wurde einerseits die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf unterschiedlichen B-Zellpopulationen, des Weiteren wurde die Regulation der Expression beider Chemokinrezeptoren verfolgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide Chemokinrezeptoren auf humanen B-Zellen ausgeprägt sein können. Die Expression von CXCR3 konnte durch IFN- γ induziert werden. Durch das gleiche Zytokin wird auch die Expression der CXCR3-Liganden im entzündetem Gewebe ausgelöst (119). IFN- γ , das von Th1-Zellen sezerniert wird (23), kann außerdem Antikörperklassenwechsel induzieren (31). Dies könnte mit der positiven Assoziation zwischen der Co-Expression von CXCR3 und IgG1 in Zusammenhang gebracht werden. Nach Induktion der Expression von CXCR3, welches im Blut auf Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmablasten ausgeprägt werden kann, bleibt diese stabil.

Die Induktion des Chemokinrezeptors CXCR4 erfolgt unabhängig von der Art der Aktivierung im Verlauf der Plasmazelldifferenzierung. Dies spricht gegen eine mögliche Regulation der Plasmazellwanderung ins Knochenmark auf der Ebene der CXCR4 Expression.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf verschiedenen B-Zellpopulationen

Es werden konstitutiv ausgeprägte homöostatische und während Entzündungen hochregulierte inflammatorische Chemokine unterschieden (73). Bei CXCL12, dem Liganden von CXCR4 handelt es sich um ein homöostatisches Chemokin (123). CXCL9, CXCL10 und CXCL11, die drei Liganden von CXCR3, sind inflammatorische Chemokine (119).

Während naive Lymphozyten ein homogenes Homing-Verhalten haben, ist das von Gedächtnis- und Effektorzellen sehr heterogen. Dies wird damit erklärt, dass die naiven Zellen kontinuierlich auf der Suche nach dem passenden Antigen zwischen Blut und lymphatischem Gewebe zirkulieren. Gedächtnis- und Effektorzellen zeigen ein Gewebespezifisches Rezirkulationsverhalten (83).

Je nach Aktivierung und Zelltyp werden verschiedene Chemokinrezeptoren ausgeprägt (87). Aufbauend auf Resultaten unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass IgG-sezernierende murine Plasmablasten nach Sekundärimmunisierung gegen die Liganden von CXCR3 und CXCR4

migrieren (94), sollte nun die Expression dieser beiden Chemokinrezeptoren auf humanen B-Zellen und Plasmazellen analysiert werden.

Naive B-Zellen tragen fast alle den Chemokinrezeptor CXCR4, dessen Ligand u.a. in Lymphknoten exprimiert wird (95). Über diesen Rezeptor könnte unter Anderem das Eintreten in den Lymphknoten ermöglicht werden. Bei der Akkumulation im B-Zellfollikel spielt dann vor allem CXCR5 eine Rolle (124). Während ein Teil der Gedächtnis-B-Zellen CXCR3 ausprägt, sind naive B-Zellen CXCR3(-).

Innerhalb der Gedächtnis-B-Zellpopulation zeigte sich eine Variabilität in der Expression von sowohl CXCR4 als auch CXCR3, die naiven B-Zellen zeigten dagegen ein einheitliches Bild. Eine genauere Untersuchung der Verteilung der CXCR3-Expression auf Subpopulationen der Gedächtnis-B-Zellen ergab eine signifikante Assoziation in der Co-Expression von CXCR3 mit IgG1. Aus dieser Beobachtung resultierte die Frage nach Zytokinen, die möglicherweise an der Regulation von CXCR3 und gleichzeitig an der Induktion des Klassenwechsels zu IgG1 beteiligt sind. Ausgelöst wird der Klassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgG2 durch T-Zellen, wobei beim Menschen die eindeutige Zuordnung bestimmter Zytokine am Klassenwechsel zu IgG1 kontrovers diskutiert wird (125-127).

Die fehlende Assoziation in der Co-Expression von CXCR4 mit einem der Isotypen IgG1 oder IgG2 gibt bereits hier den Hinweis, dass die Expression der beiden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 unterschiedlich reguliert wird.

6.2.2 Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 auf Plasmazellen und deren Vorläufern in verschiedenen lymphatischen Organen

Plasmazellvorläufer werden in sekundär lymphatischen Organen gebildet und können über Blut und Lymphe ins Knochenmark gelangen (56, 113).

CXCR3 wird in der entzündeten Tonsille mit einer Variabilität von ca. 19 +/- 7 % der CD38(++)/CD20(-)-Zellen ausgeprägt. Im Blut ist die Häufigkeit vergleichbar, jedoch mit einer vernachlässigbaren Variabilität. Im Knochenmark wird CXCR3 von ca. 8 % der Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert. Die größere Variabilität in der Häufigkeit CXCR3-tragender CD38(++)/CD20(-)-Zellen in der Tonsille kann durch den unterschiedlichen Grad der Entzündung der entnommenen Tonsillen erklärt werden. Jones et al. (2000) erwähnen bei der CXCR3-Expression auf Plasmazellen in der Tonsille ebenfalls ein variierendes Bild, es wird aber dort nicht beschrieben, wie die Plasmazellen charakterisiert wurden (103).

IgG-sezernierende Zellen können gegen die Liganden von CXCR3 migrieren (94). Die CXCR3-Liganden werden während einer Entzündung von postkapillären Venolen mit hochprismatischem Endothel (HEV) produziert (101). Nach Auslösen einer Entzündung kann die mRNA der CXCR3-Liganden CXCL10 und CXCL9 auch in regionalen Lymphknoten bis zu 9-fach ansteigen (von 12fg/50g cDNS auf 115fg/50g cDNS)(102). Plasmazellen die auch in chronisch entzündeten Organen detektiert werden können, sind vermutlich in sekundär lymphatischen Organen entstanden und in das chronisch entzündete Gewebe eingewandert sind (4, 6, 128). Es kann daher vermutet werden, dass CXCR3 an der Akkumulation von Plasmablasten in entzündetem Gewebe beteiligt ist (129). Bei den CXCR3-tragenden CD38(++)/CD20(-)-Zellen der Tonsille kann es sich also einerseits um in einem sekundär lymphatischen Organ entstandene Plasmablasten handeln, auf denen die Expression von CXCR3 induziert wurde oder aber um aus der Peripherie in die entzündete Tonsille eingewanderte Plasmablasten. CXCR3-tragende Plasmazellvorläufer des Blutes können potentiell in entzündetes Gewebe einwandern.

Die Häufigkeit CXCR3-tragender CD38(++)/CD20(-)-Zellen im Knochenmark ist mit ca. 8 % gegenüber den anderen untersuchten Organen deutlich niedriger. Plasmazellen des Knochenmarks wurden mittlerweile auch von einer anderen Arbeitsgruppe als CXCR3(-) beschrieben (13). Inwiefern die Expression von CXCR3 auch an der Lokalisation innerhalb lymphatischer Organe sowie der Akkumulation im Knochenmark mitbeteiligt ist, bleibt zu untersuchen. Aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist allerdings bekannt, dass die Akkumulation IgG-sezernierender Zellen im Knochenmark in CXCR3-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Dies spricht gegen eine mögliche Beteiligung von CXCR3 und ist in Übereinstimmung mit der geringen Häufigkeit CXCR3-tragender humaner CD38(++)/CD20(-)-Zellen im Knochenmark.

Im Darm wird CXCR3 von ungefähr 30 % der CD38(++)/CD20(-)-Zellen ausgeprägt. Die wie in der Tonsille gemessene nennenswerte Standardabweichung (Tonsille 19 +/- 7 %, Darm 27 +/- 17 %) kann auch in diesem Organ mit den entzündlichen Veränderungen zusammenhängen, da es sich bei dem untersuchten Material um Darmteile handelt, die aufgrund schwerwiegender Entzündungen oder Tumoren entfernt werden mussten. Die CXCR3-ausprägenden Plasmablasten können dort entstanden oder aus den regionalen Lymphknoten eingewandert sein.

Die Expression von CXCR3 wurde außerdem auf verschiedenen B-Zelltumoren gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass CXCR3 konstitutiv auf B-Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (BCLL) und Marginalzonen-Lymphom der Milz, Tumoren mit einer

Phase im peripheren Blut, exprimiert wird. Die CXCR3-Expression auf anderen B-Zelltumoren, z.B. dem von Plasmazellen ausgehenden Plasmozytom, ist heterogen. Im Chemotaxis-Assay hatten die CXCR3-exprimierenden Tumorzellen die Fähigkeit, gegen die CXCR3-Liganden zu migrieren. CXCR3 könnte möglicherweise an der Ausbreitung der Tumore beteiligt sein (103, 104).

Aus dieser Arbeit ergibt sich, dass CXCR4 von einem Großteil der CD38(++)/CD20(-)-Zellen in der Tonsille (ca. 50 %) sowie im Knochenmark (70 %) ausgeprägt wird. Dies wurde während des Entstehens dieser Arbeit auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (13, 105). Der CXCR4-Ligand CXCL12 wird im Knochenmark von Stromazellen und Osteoblasten synthetisiert (97, 111). CXCL12 wird außerdem in sekundär lymphatischen Organen u.a. um die Keimzentren, in den Marksträngen und in der roten Pulpa der Milz produziert (3, 95), aber auch von Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis (118). Bereits die frühe Akkumulation von Plasmablasten der Milz an der Grenze der T-Zellzone zur roten Pulpa wird über CXCR4 reguliert (3). Entsprechend kann es sich in der Tonsille bei den CXCR4-ausprägenden CD38(++)/CD20(-)-Zellen um Plasmablasten handeln, die möglicherweise vergleichbar mit der Milz in definierten Bereichen der Tonsille akkumulieren (3).

CD38(++)/CD20(-)-Antikörper-sezernierende Zellen können im Blut mit einer Häufigkeit von 0,01-0,1 % detektiert werden (113, 130). Zumindest ein Teil dieser Zellen befindet sich auf dem Weg in ihr Zielorgan, u.a. das Knochenmark. Auf diesen Zellen kann CXCR4 durchflusszytometrisch nicht detektiert werden. Dennoch sind Antikörper-sezernierende Zellen des Blutes in der Lage gegen einen Konzentrationsgradienten von CXCL12 zu migrieren (131). Weitere Experimente ergaben, dass die durchflusszytometrische CXCR4-Darstellung durch den Liganden CXCL12 blockiert werden kann. Die Tatsache, dass CXCL12 in sekundär lymphatischen Organen exprimiert wird und so den Rezeptor CXCR4 der emigrierenden Plasmablasten besetzen könnte, ist eine wahrscheinliche Erklärung für die Blockierung der Markierung. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Umstand, dass CXCR4 auf Plasmablasten nach einer Kulturdauer von 24 Stunden ohne Stimulation durchflusszytometrisch wieder detektierbar wird.

CXCR4(-)-Gedächtnis-B-Zellen wurden sowohl T-Zell-abhängig mit CD40L als auch T-Zell-unabhängig mit CpG 2006 oder *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) zu Plasmablasten stimuliert. Unter allen drei Bedingungen wurde die Expression von CXCR4 hochreguliert. Die somit konstitutive CXCR4-Expression von Antikörper-sezernierenden Zellen spricht ebenfalls dafür, dass die beobachtete geringe Häufigkeit CXCR4(+)-Plasmablasten im Blut auf die Blockade der Markierung zurückzuführen ist.

Im Knochenmark ausreifende Plasmazellen unterscheiden sich von Plasmablasten durch die Expression von Markern wie CD45 und MHC II (56, 113). Mit dem Ausreifen verlieren Plasmazellen ihre Fähigkeit, gegen CXCL12 zu migrieren, exprimieren aber weiterhin diesen Rezeptor (94). In einer neueren Veröffentlichung (2004) wurde eine gleichmäßige Verteilung CXCL12 produzierender Stromazellen im Knochenmark beschrieben. Diese Zellen sind co-lokalisiert mit Plasmazellen (97). Über CXCL12 wird u.a. die Adhäsion zu Fibronektin und dem Integrin Vascular-cell-adhesion-molecule (VCAM)-1 induziert (13). Der Chemokinrezeptor CXCR4 kann also mit Ausreifen der Plasmablasten zur Plasmazelle für Adhäsion an den CXCL12 produzierenden Zellen verantwortlich sein. CXCR4 übernimmt mit dem Ausreifen der Plasmablasten also möglicherweise andere Funktionen, z.B. stimuliert CXCL12 das Überleben von Plasmazellen (12, 66). Da Plasmazellen aus dem Knochenmark das Gen für CXCL12 exprimieren (132), kann spekuliert werden, dass es sich eventuell um eine autokrine Induktion der Adhäsion im Knochenmark handelt. In dieser Studie wurden die Plasmazellen jedoch nur zu 92 % aufgereinigt. Daher müssen genauere Studien abgewartet werden, die klären, ob es sich um eine mögliche Kontamination von Stromazellen handelt, mit denen die Knochenmarksplasmazellen eng co-lokalisiert sind (97).

Ob es sich bei CXCR4(-)-Plasmazellen und ihren Vorläufern in Tonsille und Knochenmark um Zellen handelt, die eventuell auf dem Weg sind das Organ zu verlassen oder deren Rezeptor durch den Liganden CXCL12 blockiert ist, ist unklar. Möglicherweise handelt es sich auch um Antikörper-sezernierende Zellen eines anderen Isotyps, eventuell IgA. So spielen die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 und deren Liganden CCL25 und CCL28 auf IgA-sezernierenden Plasmablasten, nicht aber auf ausgereiften Plasmazellen, eine Rolle für das Homing in den Dünndarm und die anderen Schleimhäute (98, 122). Da die Zahl der B-Zellvorläufer in CCL25-defizienten Mäusen im Knochenmark reduziert ist (124, 133), könnte CCR9 auch an der Akkumulation von IgA-sezernierenden Plasmablasten im Knochenmark mitbeteiligt sein. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörper-sezernierende Zellen aus dem Knochenmark gegen die Liganden von CXCR6 und CCR10 migrieren, die ebenfalls im Knochenmark nachweisbar sind (13). Eine einfache Erklärung wäre aber auch die, dass es sich bei den laut Durchflusszytometrie CXCR4-negativen Zellen um eine Blockierung der Darstellung durch CXCL12 handelt.

Es ist nach wie vor eine unbeantwortete Frage, wie die Lokalisation von Plasmablasten sowohl innerhalb eines sekundär lymphatischen Organs als auch die Akkumulation im Knochenmark über CXCR4 reguliert sein kann. Während der Differenzierung von CXCR4(-)-Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmablasten wird CXCR4 konstitutiv hochreguliert. Die Auswahl,

welche Zellen im Knochenmark akkumulieren, geschieht also vermutlich nicht über diesen Rezeptor. Es konnte kürzlich von Nie et al. (2004) beschrieben werden, dass 90 Tage nach Sekundärimmunisierung die Akkumulation antigenspezifischer Plasmazellen in Mäusen mit CXCR4-defizienten B-Zellen vergleichbar mit der des Wildtyps ist, während sie neun Tage nach Sekundärimmunisierung signifikant reduziert war. Daraus resultiert die Vermutung, dass CXCR4 nur zu Beginn des Knochenmark-Homings von Plasmazellen eine Rolle spielt (11). Diese Daten stützen die Annahme, dass die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark auf eine andere Art und Weise reguliert ist.

Im Darm lässt sich CXCR4 mit $< 10\%$ auf einem verhältnismäßig geringen Teil der CD38(++)/CD20(-)-Zellen nachweisen. Der Ligand CXCL12 wird im Darm sowohl von Epithelzellen vor allem der Krypten als auch von Zellen der Lamina propria exprimiert (100). Bei den Antikörper-sezernierenden Zellen des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes handelt es sich vor allem um IgA-produzierende Zellen, die über die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 dorthin dirigiert werden (98, 122). Es ist jedoch auch bekannt, dass IgA-sezernierende Plasmablasten sowohl gegen Konzentrationsgradienten von CCR9 als auch CXCR4-Liganden migrieren können (122). Ob es sich bei den CXCR4-exprimierenden CD38(++)/CD20(-)-Zellen um IgG-sezernierende Zellen handelt, könnte zukünftig durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung und anschließenden ELISpot geklärt werden.

6.2.3 Stimulation der B-Zellen

In dem hier beschriebenen Stimulationsmodell erfolgte das CD40-Signal in Anlehnung an die Literatur für eine Dauer von drei bis vier Tagen (47, 51, 52). Innerhalb von 15 min. nach Aktivierung kann CD40L auf T-Zellen exprimiert werden (25) und bereits nach sechs bis acht Stunden ist das Molekül auf einem Grossteil der Zellen wieder abwesend (26). Dennoch führte in dieser Arbeit ein Verkürzen des CD40-Signals auf zwei Tage nicht zur Bildung von CD38(++)/CD20(-)-Zellen. Einerseits ist es möglich, dass in diesem Fall das Signal über CD40 nicht ausreicht. Andererseits könnten Zytokine oder Zellkontakte in der Kultur fehlen, die *in vivo* vorhanden sind und ein kürzeres Stimulieren über CD40 möglich machen könnten. Eine andere Erklärung ist die, dass es sich hier um eine Art Schutzmechanismus handelt, der die B-Zelle vor unspezifischer Aktivierung und den Körper so vor einer immunologischen Überreaktion bewahrt. So kann man sich vorstellen, dass eine B-Zelle aufeinanderfolgend von mehreren T-Zellen gleicher Spezifität über CD40 aktiviert werden kann. Das auf diese Weise verlängerte Signal gewährleistet, dass es sich um ein Antigen-spezifisches und nicht um ein zufälliges Signal handelt.

Wurden der Kultur IFN- α und IFN- β zugesetzt, war am Tag 8 eine deutlich erhöhte Häufigkeit an CD38(++)/CD20(-)-Zellen zu beobachten. In einer neueren Publikation (2003) wurde dieses Phänomen genauer beschrieben. Verantwortliche Quelle für die beiden Zytokine scheinen plasmazytoide dendritische Zellen zu sein. Da es sich überwiegend um IgG-sezernierende Zellen handelt, werden unter diesen Kulturbedingungen vermutlich vorrangig Gedächtnis-B-Zellen aktiviert (53). Ebenfalls denkbar wäre jedoch eine Aktivierung von naiven B-Zellen mit gleichzeitigem Klassenwechsel zu IgG.

6.2.4 Regulation der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4

Die Expression von CXCR3 lässt sich während der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmablasten durch IFN- γ induzieren, wenn es vor dem dritten Tag der Stimulation hinzugefügt wird. In unserer Arbeitsgruppe konnte zum Ende dieser Studie gezeigt werden, dass dies auch für aktivierte naive B-Zellen gilt, wenn sie zu Plasmablasten ausdifferenzieren. Die Expression der CXCR3-Liganden wird ebenfalls durch IFN- γ ausgelöst (81). Die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 können jedoch auf verschiedenen Zellen auch von den Zytokinen TNF- α bzw. IFN- α/β induziert werden (119). Auf aktivierten B-Zellen und Plasmablasten konnten weder IFN- α , IFN- β , TNF- α noch andere getestete inflammatorische Zytokine die CXCR3-Expression induzieren.

Während der ersten drei Tage der Aktivierung befinden sich B- und T-Zellen gleicher Spezifität eng co-lokalisiert im Follikel (14). Da die Sekretion von IFN- γ Th1-Zellen gegenüber den IL-4-produzierenden Th2-Zellen definiert (23), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der Induktion von CXCR3 um ein Th1-abhängiges Signal handelt. Bereits die signifikante Assoziation der Co-Expression von IgG1 mit CXCR3 verglichen mit den Isotypen IgG2, IgG3 und IgM gaben den Hinweis auf eine eventuelle Induktion von CXCR3 durch T-Zellen im Zusammenhang mit Antikörperklassenwechsel. Während das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ CXCR3-Expression induzierte, beeinflusste das typische Th2-Zytokin IL-4 die Expression dieses Chemokinrezeptors nicht.

Auf B-Zellen der Maus löst IFN- γ den Antikörperklassenwechsel zu IgG2 aus, wohingegen beim Menschen eine derartige Zuordnung noch kontrovers diskutiert wird (125, 126). Es wurde aber während der Lyme-Borreliose ein Anstieg von IFN- γ in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit beschrieben (134, 135). Der dominierende Isotyp in dieser Th1-Antwort war IgG1 (136). Die hier erzielten Resultate sind vereinbar mit der Möglichkeit, dass IFN- γ bei humanen B-Zellen sowohl Klassenwechsel zu IgG1 als auch die Expression von CXCR3 auslöst.

Nach Stimulation der CXCR3(-)-B-Zellen mit der Basiskultur konnte durchgängig eine CXCR3-Expression auf ca. 20 % der Zellen beobachtet werden. Die konstitutive IFN- γ Sekretion unreifer B-Zellen (137), die sich in der Kultur befinden könnten, wäre eine Erklärung. Möglich und bisher nicht näher untersucht wäre aber auch die Sekretion von IFN- γ durch andere B-Zellpopulationen.

Aus diesen Resultaten und der nachgewiesenen Kapazität, gegen den CXCR3-Liganden CXCL9 zu migrieren, lässt sich folgendes Modell der Plasmazellmigration ableiten:

Es ist bereits bekannt, dass im frühen Stadium einer Entzündung von Makrophagen das Zytokin IL-12 gebildet wird (138, 139). Außerdem wandern Antigen-präsentierende Zellen aus dem entzündeten Gewebe in die regionalen Lymphknoten ein, um dort T-Zellen zu aktivieren (87). Ein Teil der T-Zellen produziert, der Polarisierung durch IL-12 folgend, IFN- γ . Diese IFN- γ -bildenden Th1-Zellen können nun die Expression von CXCR3 auf mit ihnen interagierenden B-Zellen induzieren, welche zu CXCR3-ausprägenden Plasmablasten werden. Die im entzündeten Gewebe gebildeten Liganden von CXCR3 locken die entstandenen CXCR3-exprimierenden Plasmablasten an und führen zur im entzündeten Gewebe beschriebenen Akkumulation von Plasmablasten (4, 6, 128) (Abb.23). Dies könnte einerseits die Bildung von lokal erhöhten Antikörpertitern und somit die bessere Bekämpfung von Keimen ermöglichen. Andererseits könnte es aber während der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zur Verstärkung der Gewebeschädigung kommen. Die Tatsache, dass die Induktion von CXCR3 früh während der B-Zellaktivierung erfolgt, unterstützt die Hypothese wird dadurch gestützt, als dass die Induktion von CXCR3 früh während der B-Zellaktivierung während dem Kontakt zwischen T- und B-Zelle erfolgt (14). Anschließend bilden die B-Zellen Keimzentren oder wandern in die extrafollikuläre Zone aus.

IFN- γ -defiziente Mäuse des NZB/W-Stammes, dem Mausmodell des SLE, entwickeln eine sehr viel milder verlaufende Glomerulonephritis als IFN(+/-)-Tiere desselben Stammes. Diskutiert wird dies mit einem fehlenden Klassenwechsel zu IgG2 und IgG3, die sich in IFN(+/-)-NZB/W-Mäusen verstärkt in den Glomerula ablagern (9). Ein aus der vorliegenden Arbeit ebenfalls denkbares Erklärungsmodell wäre, unabhängig vom Antikörperklassenwechsel, die reduzierte Induktion sowohl der CXCR3-Liganden als auch des Chemokinrezeptors CXCR3 und eine daraus folgende reduzierte Akkumulation von Plasmablasten in der chronisch entzündeten Niere.

CXCR4 kann auf einem Großteil der B-Zellen im Blut detektiert werden. Wurden diese Zellen stimuliert, so stieg die Frequenz CXCR4(+)-B-Zellen und Plasmablasten weiter an. Um zu klären, ob es sich um die Folge einer Hochregulation der CXCR4-Expression auf

zuvor CXCR4(-)-Zellen oder um eine selektive Expansion der CXCR4(+)-Zellen handelte, wurden sortierte CXCR4(-)-B-Zellen stimuliert. Diese Zellen sind zu > 70 % Gedächtnis-B-Zellen. Das Akkumulieren von Plasmazellen im Knochenmark ist ein T-Zell-abhängiges Geschehen (140). Mit CD40L, CpG oder SAC wurden die CXCR4(-)-Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmablasten sowohl T-Zell-abhängig als auch T-Zell-unabhängig aktiviert. Unabhängig von der Art der Stimulation war CXCR4 bereits nach drei Tagen auf > 50 % der aktivierten B-Zellen nachweisbar und steigerte sich zum Tag 8 auf aktivierten B-Zellen und Plasmablasten auf 70 %. CXCR4 wird also konstitutiv mit der Aktivierung hochreguliert und ist kein T-Zell-abhängiges Phänomen.

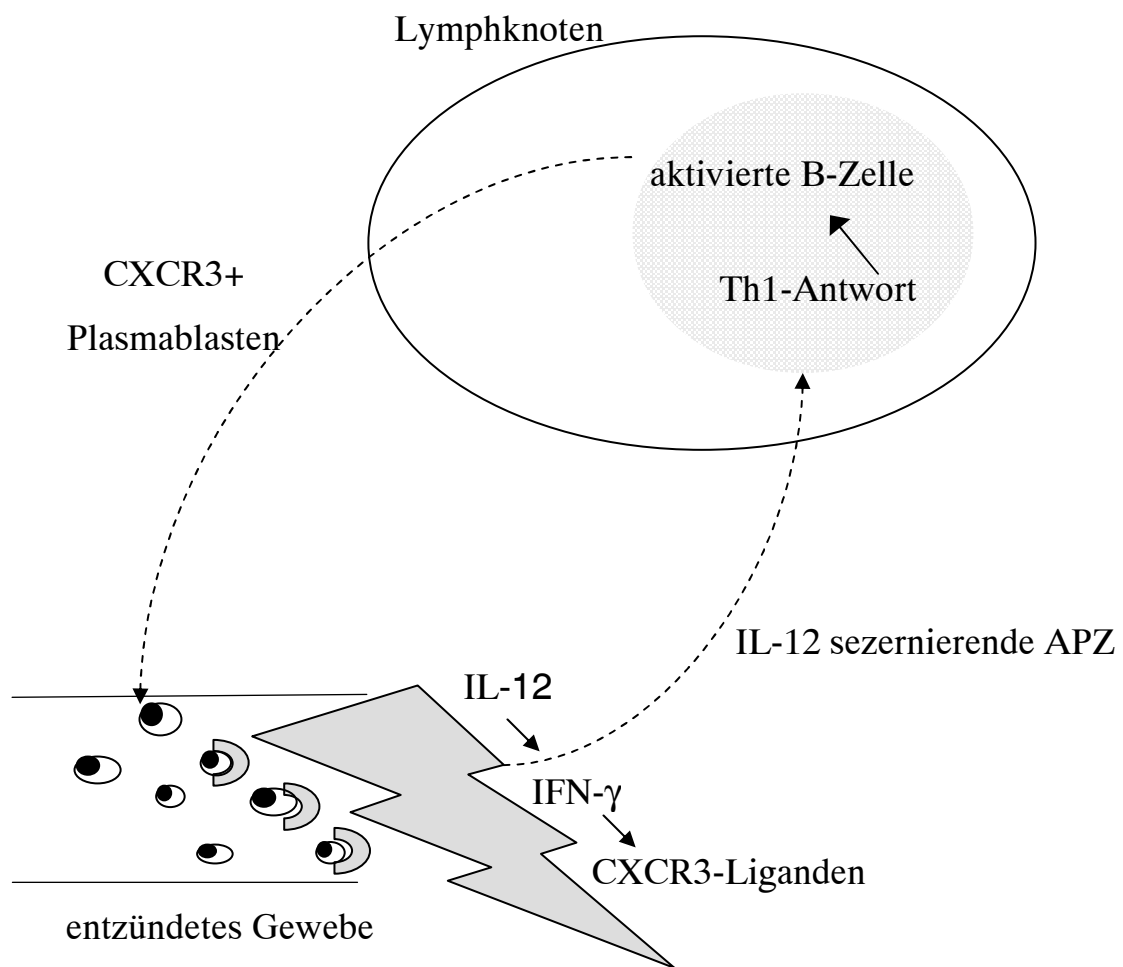


Abb. 23: Schematische Darstellung eines möglichen Modells der Plasmazellmigration in entzündetes Gewebe

Einzelheiten sind im Text erläutert.

In unserer Arbeitsgruppe wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit ebenfalls die Expression von CXCR4 während der Differenzierung naiver B-Zellen zu Plasmablasten untersucht. Mehr als 85 % der naiven B-Zellen exprimierten CXCR4. Die aktivierten naiven B-Zellen sowie die entstehenden Plasmablasten exprimierten den Rezeptor in unveränderter Häufigkeit. Dies weist darauf hin, dass die CXCR4-Expression auf Plasmablasten die Akkumulation im Knochenmark nicht auslöst.

Das unterschiedliche Expressionsmuster von CXCR3 und CXCR4 auf verschiedenen B-Zellpopulationen ließ bereits vermuten, dass diese beiden Chemokinrezeptoren unterschiedlich reguliert werden.

Einen Hinweis für die Beteiligung von Zytokinen an der Migrationsfähigkeit von Gedächtnis-B-Zellen während der Differenzierung aus Keimzentrums-B-Zellen geben bereits Roy et al. (2002): Die Stimulation von CCR7-, CXCR4- und CXCR5-ausprägenden Keimzentrums-B-Zellen mit CD40L, IL-2 und IL-10 ermöglicht den vorher refraktären Keimzentrums-B-Zellen die Migration gegen Konzentrationsgradienten der entsprechenden Liganden (86). Durch die Stimulation differenzieren die Keimzentrums-B-Zellen zu migrationsfähigen Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten. Es scheint sich hier also ebenso wie bei der möglichen Hochregulation der CXCR4-Expression um ein konstitutives Geschehen zu handeln. Durch die Zytokine kommt es vielmehr zum weiteren Differenzieren mit einhergehender Chemokinrezeptorexpression als zur Induktion des entsprechenden Chemokinrezeptors. Im Gegensatz zu CXCR4 ist für die Induktion von CXCR3 ein co-stimulatorisches Signal wie IFN- γ notwendig.

Die Induktion der CXCR3- respektive CXCR4-Expression nach Aktivierung ist unabhängig von den durchlaufenden Zellzyklen. CXCR3 wird bereits zu Beginn der Aktivierung induziert, d.h. vor Durchlaufen eines vollständigen Zellzyklus.

6.3 Diskussion der Methodik

6.3.1 Herkunft der Zellen

Bei der Gewinnung humaner Zellen stößt man aus ethischen Gründen an Grenzen. So handelt es sich bei den verschiedenen hier untersuchten Organen immer um Material unterschiedlicher Spender sowie unterschiedlicher Altersgruppen. Das in dieser Studie am häufigsten verwendete Material ist Blut erwachsener Menschen. Alter und Geschlecht waren den ausgehändigten Proben nicht zuzuordnen. Bei den Tonsillen handelte es sich vorwiegend um Organmaterial von Kindern. Das Knochenmark wurde wiederum von älteren ca. 50- bis 70-jährigen Patienten im Rahmen einer Hüftgelenksprothese gewonnen. Darmteile wurden im

Fall schwerwiegender Entzündungen oder Tumoren entnommen, Alter und Geschlecht waren auch in diesen Fällen nicht bekannt.

Vor allem die entzündlich veränderten Organe wie Tonsille und Darm zeigten in der Häufigkeit der CXCR3-exprimierenden Plasmablasten eine hohe Standardabweichung, die mit den entzündlichen Gewebeveränderungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Bei den Blut- und Knochenmarkspalten handelt es sich um eine eher vergleichbare Gruppe, was in vergleichbaren Ergebnissen mit geringer Standardabweichung resultierte. Der Altersunterschied und der damit einhergehende unterschiedliche Immunstatus beeinträchtigt die Ergebnisse vermutlich nicht.

Aufgrund der Entzündungen in Tonsille und Darm kann keine Aussage über die Expression von CXCR3 und CXCR4 auf Plasmablasten in nicht entzündetem Darm bzw. Tonsille getroffen werden. Unabhängig von dieser Heterogenität der Proben konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CXCR3 und CXCR4 auf verschiedenen humanen B-Zellpopulationen sowie Plasmablasten ausgeprägt werden kann.

6.3.2 FACS

Die durchflusszytometrische Untersuchung bestimmter Zellpopulationen ist eine sensitive Methode, da Zellen auf Einzelzellebene charakterisiert werden können. Die Untersuchung der Zellen am Durchflusszytometer, Typ LSR I, bot die Möglichkeit, neben dem Ausschluss toter Zellen, dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht weitere vier Parameter gleichzeitig zu analysieren. Auf diese Weise konnten entweder Plasmablasten oder Gedächtnis-B-Zellen über bis zu drei Marker definiert und gleichzeitig auf die Expression von CXCR3 und CXCR4 untersucht werden.

Die Analyse von Zellzyklen über die Färbung mit CFDA-SE bietet gegenüber der Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin den Vorteil, dass die durchlaufenen Zellteilungen auf Einzelzellebene untersucht werden können. Bei Messung der Thymidinaufnahme kann nicht unterschieden werden, ob sich eine Zelle mehrfach oder z.B. mehrere Zellen jeweils einmal geteilt haben. Mit der CFDA-SE-Markierung wird ein vollständig durchlaufener Zellzyklus definiert, Zellen, die sich noch in Proliferation befinden, sich aber noch nicht geteilt haben, sind nicht von den ruhenden Zellen zu unterscheiden.

6.3.3 Stimulationsmodelle

Die T-Zell-abhängige Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen über das CD40-Signal ist eine weitverbreitete Methode (35, 47), ebenso der Zusatz von IL-2 als Proliferations- sowie IL-10

als Differenzierungsfaktor (45). Die Dauer des CD40-Signals wie auch die Zugabe weiterer Zytokine kann sich dabei aber unterscheiden (47, 51, 53). In vielen dieser Modelle wird das CD40-Signal nach drei bis vier Tagen unterbrochen und die B-Zellen werden in einer zweiten Kultur in Anwesenheit verschiedener Interleukine weiter kultiviert (45, 52). Damit in Einklang steht auch das in dieser Arbeit etablierte B-Zellstimulationsmodell, das selektiv Gedächtnis-B-Zellen ausdifferenzieren lässt. Die aus einer Gesamtdauer von acht Tagen bestehenden Kultivierung in zwei Schritten resultiert in der Bildung von Zellen mit dem Plasmazellphänotyp CD38(++)/CD20(-). Durch ELISpot wurde nachgewiesen, dass in der Kultur Antikörper-sezernierende Zellen entstehen.

B-Zellen können aber auch nach T-Zell-unabhängiger Aktivierung zu Plasmablasten ausdifferenzieren, z.B. durch Stimulation mit CpG. Mit CpG 2006 werden Gedächtnis-B-Zellen über TLR-9 aktiviert (35). Da sowohl mit CD40L als auch mit CpG präferentiell Gedächtnis-B-Zellen stimuliert werden, können die beiden Stimationsmodelle in Hinblick auf die Induktion von CXCR3 durch IFN- γ verglichen werden.

Die Stimulation von aufgereinigten B-Zellen mit CD40L und den Zytokinen IL-2 und IL-10 imitiert einen Teil eines tatsächlichen *in vivo*-Szenarios. Die Möglichkeit Gedächtnis-B-Zellen unter minimalen Bedingungen zu Plasmazellvorläufern ausdifferenzieren zu lassen, macht es möglich, den Einfluss verschiedener Zytokine auf Differenzierung und Regulation von Chemokinrezeptoren unter definierten Bedingungen zu analysieren.

6.3.4 Migrationsassay und ELISpot

Da die Expression eines Chemokinrezeptors und die Fähigkeit gegen den korrespondierenden Liganden zu migrieren nicht zwingend zusammengehören (86, 94, 122), lag es nahe, den mit IFN- γ induzierten Chemokinerezeptor CXCR3 auf diese Funktionalität hin zu überprüfen. Die Untersuchung der Chemotaxis mittels dem Transwell[®]-System, stellt eine geeignete Methode dar, Zellen auf ihre Migrationsfähigkeit gegen Konzentrationsgradienten ausgewählter Chemokine zu untersuchen. Die migrierten Zellen können nachher auf unterschiedliche Weise quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die Häufigkeit migrierter IgG-sezernierender Zellen mit dem ELISpot bestimmt. Der ELISpot stellt eine sensitive Methode dar, um Antikörper-sezernierende Zellen zu quantifizieren.

Hier wurden IgG-sezernierende Zellen analysiert, da es sich bei den aus einer Gedächtniszellantwort hervorgehenden Plasmablasten vorwiegend um IgG-sezernierende Zellen handelt (141). Für die Fragestellung nach der Migrationsfähigkeit der IgG-sezernierenden Zellen nach der Induktion von CXCR3 stellte das Transwell[®]-System eine

aussagekräftige und zuverlässige Methode dar. Der Test resultierte in einer gesteigerten Migration gegen CXCL9, wenn die Zellen in Anwesenheit von IFN- γ kultiviert wurden.

6.4 Ausblick

CXCR3 kann auf bis zu 70 % der während der *in vitro*-Stimulation entstehenden Plasmablasten durch IFN- γ Zugabe induziert werden. Ebenso wurde CXCR3 ohne die Zugabe von IFN- γ auf bis zu 30 % der aus zuvor CXCR3(-)-B-Zellen entstandenen Plasmablasten detektiert. Ob neben IFN- γ auch andere Faktoren an der Induktion von CXCR3 beteiligt sind, konnte mit dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Ein Experiment, das eventuelle andere Faktoren genauer definieren könnte, wäre die gleichzeitige Zugabe vom Überstand einer PMA/PHA stimulierten T-Zell-/Monozytenkultur und einem neutralisierenden Antikörper gegen IFN- γ . Ebenso ist wenig über die Zytokinsekretion der B-Zellen bekannt. Es liegt nahe zu überprüfen, ob die autokrine IFN- γ Sekretion die CXCR3-Expression der Basiskultur begründet.

Die Bedeutung von IFN- γ für die Induktion der Expression von CXCR3 im IFN- γ defizienten Mausmodell zu studieren, ist schwierig, da eine spezifische CXCR3-Markierung von murinem CXCR3 mit mehreren getesteten Antikörpern noch nicht möglich war. Die drei CXCR3-Liganden werden hauptsächlich durch IFN- γ induziert (119). Es ist demzufolge nicht zu trennen, ob eine reduzierte Akkumulation von Plasmazellen in entzündetem Gewebe durch die reduzierte Expression von CXCR3 oder durch die fehlenden Liganden zustande kommt. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass für die Untersuchungen im Mausmodell eine chronische Entzündung induziert werden muss.

Die Identifikation von IFN- γ als alleinigem Faktor oder möglichen anderen CXCR3-induzierenden Faktoren könnte zu einem besseren Verständnis der Akkumulation von Plasmablasten und Plasmazellen in chronisch entzündetem Gewebe führen. Langfristig könnte diese eventuell medikamentös inhibiert werden und so als Therapie von Autoimmunkrankheiten wie dem systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden.

Diese Arbeit zeigt auch, dass CXCR4 unabhängig von der Stimulation auf sämtlichen generierten Plasmablasten ausgeprägt wird. Es wurde aber noch nicht untersucht, ob alle CXCR4-tragenden Plasmablasten gegen einen Konzentrationsgradienten von CXCL12 migrieren. Um die Rolle von CXCR4 an der Akkumulation genauer zu untersuchen, sollte das Migrationsverhalten T-Zell-abhängig und T-Zell-unabhängig generierter Plasmablasten gegen den CXCR4-Liganden analysiert werden.