

Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin,  
einem Institut der Leibnizgemeinschaft,  
eingereicht über das Institut für Immunologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# Untersuchung der Lebenszeit von Plasmazellen nach der oralen Immunisierung von Mäusen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Anja Lemke**  
Tierärztin  
aus Berlin-Mitte

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3651

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr.med.vet. Anja E. Hauser  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, oral vaccination, immune response, plasma cells, longevity, intestinal mucosa, bone marrow

Tag der Promotion: 14.10.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-405-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner lieben Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem .....	1
1.2	Die humorale Immunantwort .....	2
1.2.1	Struktur und Funktionsweise von Antikörpern .....	2
1.2.2	Aktivierung der B-Zellen und ihre Differenzierung .....	3
1.2.3	Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen.....	5
1.2.4	Das Konzept der Überlebensnische .....	7
1.3	Das mukosale Immunsystem .....	9
1.3.1	Das Darmimmunsystem.....	9
1.4	Mukosale Vakzine .....	17
1.4.1	Oral verabreichte mukosale Vakzine.....	17
1.5	Das Cholera toxin .....	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1	Medien und Puffer.....	22
3.2	Chemikalien und Reagenzien .....	23
3.3	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	23
3.4	Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz .....	24
3.5	Antikörper für ELISpot und ELISA.....	25
3.6	Geräte.....	25
3.7	Versuchstiere und Behandlungen .....	26
3.7.1	Verwendete Mäuse und Tierhaltung .....	26
3.7.2	Die orale Immunisierung mittels Magensonde.....	26
3.7.3	Die Behandlung mit EdU zur Analyse der Zellproliferation .....	26
3.8	Zellpräparationen .....	27
3.8.1	Isolierung von Lymphozyten aus Milz und Knochenmark .....	27
3.8.2	Isolierung der Lymphozyten aus Dünndarm und Lymphknoten .....	27
3.9	Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen .....	28
3.9.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	28
3.9.2	Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen.....	29
3.9.3	Zellfixierung und Fluoreszenzmarkierung von intrazellulären Molekülen .....	30
3.9.4	Fluoreszenzmarkierung von intranukleären EdU.....	30
3.9.5	Zellzahlbestimmung .....	30

3.10	Histologische Untersuchung von Gewebeschnitten.....	31
3.10.1	Einfrieren von Darmgewebe.....	31
3.10.2	Anfertigen von Gewebeschnitten des Darmes und Fixierung.....	31
3.10.3	Fixierung und Einfrieren von Knochen .....	31
3.10.4	Anfertigen von Kryoschnitten des Knochens.....	32
3.10.5	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten.....	32
3.10.6	Prinzip der konfokalen Mikroskopie.....	33
3.11	Quantifizierung der Antigen-spezifischen Plasmazellen .....	34
3.11.1	Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode.....	34
3.11.2	Durchführung des ELISpot Assays .....	34
3.12	Untersuchung serologischer Antikörper .....	35
3.12.1	Prinzip des ELISA.....	35
3.12.2	Durchführung des ELISA .....	35
3.13	Graphische Darstellung und statistische Auswertung.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1	Untersuchung der Plasmazellen nach oraler Immunisierung.....	37
4.1.1	Entwicklung einer oralen Immunisierungsstrategie.....	37
4.1.2	Die durchflusszytometrische Identifikation der mukosalen Plasmazellen ....	39
4.1.3	Anzahl der Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks.....	41
4.1.4	Untersuchung der Isotyp-Expression der Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks.....	43
4.2	Analyse der mukosal induzierten Plasmazellen .....	45
4.2.1	Detektion von OVA-spezifischen ASC nach der oralen Immunisierung.....	45
4.2.2	Anzahl der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark nach der oralen Immunisierung .....	47
4.2.3	Untersuchung der Isotyp-Expression der OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks.....	49
4.2.4	Sowohl OVA als auch CT-spezifische Plasmazellen sind 9 Monate nach Immunisierung in Lamina propria und Knochenmark nachweisbar.....	50
4.2.5	Intestinal induzierte Plasmazellen sezernieren Antigen-spezifische Antikörper und bilden einen stabilen Serumtiter .....	52
4.2.6	Untersuchung der OVA-spezifischen Plasmazellen der Peyer`schen Plaques, der mesenterialen Lymphknoten und der Milz ...	53
4.3	Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Plasmazellen mittels EdU-Einbau in die DNA.....	55
4.3.1	Proliferierende Zellen können effizient mit EdU markiert werden .....	55
4.3.2	Lokalisation der EdU+ OVA-spezifischen Plasmazellen nach der Markierungsphase im Gewebeverband.....	57
4.3.3	Detektion von langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark mittels Durchflusszytometrie.....	59
4.3.4	Untersuchung der mukosal induzierten OVA-spezifischen Plasmazellen auf ihr Potenzial zur Langlebigkeit in Lamina propria und Knochenmark.....	61

4.3.5	Untersuchung der Isotyp-Expression der langlebigen Plasmazellen .....	63
4.3.6	Histologische Untersuchung der langlebigen ASC im Gewebeverband.....	65
<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>72</b>
5.1	Diskussion der Methodik.....	72
5.1.1	Die orale Immunisierung induziert die Bildung spezifischer Plasmazellen...	72
5.1.2	Langlebige Plasmazellen können mit EdU effizient markiert werden.....	73
5.1.3	Mukosale ASC können eindeutig identifiziert werden.....	75
5.2	Diskussion der in den Experimenten erzielten Ergebnisse.....	77
5.2.1	Das Knochenmark beherbergt das größere Lymphozytenreservoir im Vergleich mit der Lamina propria des Dünndarms.....	77
5.2.2	Die Plasmazellkompartimente der Lamina propria und des Knochenmarks unterscheiden sich deutlich in ihrer Isotyp-Zusammensetzung.....	78
5.2.3	Oral induzierte Plasmazellen persistieren in verschiedenen Organen bis zu 9 Monaten nach ihrer Entstehung.....	80
5.2.4	OVA-spezifische ASC exprimieren im Darm überwiegend IgA, während im Knochenmark IgA+ und IgG1+ ASC die Mehrheit bilden.....	83
5.2.5	Oral induzierte persistierende Plasmazellen halten einen stabilen Serumentiter aufrecht .....	84
5.2.6	Plasmazellen der Lamina propria können langlebig werden.....	85
5.2.7	Überlebensnischen in der Lamina propria des Dünndarms.....	88
5.2.8	Das Dünndarmgewebe beherbergt weitere langlebige Zellen .....	90
5.2.9	Intestinal induzierte Plasmazellen tragen zum langlebigen Plasmazellkompartiment des Knochenmarks bei .....	91
5.3	Ausblick .....	95
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>97</b>
<b>7</b>	<b><i>Summary</i></b> .....	<b>98</b>
<b>8</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>99</b>
<b>9</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>115</b>
I.	Abbildungsverzeichnis .....	115
II.	Tabellenverzeichnis .....	117
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	118
IV.	Publikationen und Kongressbeiträge.....	120
V.	Danksagung.....	121
VI.	Erklärung .....	122



# 1 *Einleitung*

## 1.1 **Das Immunsystem**

Das Immunsystem stellt ein komplexes Abwehrsystem des Organismus dar, welches vor einer Vielzahl von infektiösen Pathogenen – Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Parasiten – und Fremdstoffen der Umwelt schützt sowie körpereigene, entartete Zellen erkennt. Die vielfältigen und effektiven Schutzmechanismen des Immunsystems entwickelten sich im Laufe der Evolution bei höher entwickelten Vertebraten und werden in die angeborene und die adaptive Immunität unterteilt. Anatomische und physiologische Barrieren, wie die Epithelien, Zilienbewegungen, niedriger pH-Wert, Enzyme und die normale Mikroflora, verhindern das Eindringen vieler Pathogene an den Kontaktflächen des Organismus zur Außenwelt. Das angeborene Immunsystem erkennt dennoch eindringende Mikroben unspezifisch nach einem System wiederkehrender Strukturmerkmale und bekämpft diese schnell mit Hilfe von zahlreichen phagozytierenden Zellen (z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen), den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dem Komplementsystem. Durch sezernierte Zytokine wird in dem betroffenen Gewebe eine Entzündung hervorgerufen, welche die Abwehr durch eine Erhöhung der Durchblutung sowie der Gefäßpermeabilität mit Rekrutierung zusätzlicher Lymphozyten in das Gewebe unterstützt.

Können die in den Organismus eingedrungenen Pathogene durch das angeborene Immunsystem nicht ausreichend eliminiert werden, wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, Anpassungsfähigkeit und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus und kann in eine zellvermittelte und eine humorale Immunität unterteilt werden. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die T- und B-Lymphozyten, welche mit Hilfe von variablen Oberflächen-Rezeptoren Teile von Pathogenen (Antigene) hochspezifisch binden können. Bei dem Kontakt mit einem Antigen werden nur die spezifischen Lymphozyten aktiviert und nach Proliferation und klonaler Expansion entstehen zahlreiche Antigen-spezifische Effektorzellen, die das Pathogen gezielt eliminieren können.

Im Rahmen der zellvermittelten Immunantwort eliminieren Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen intrazelluläre Erreger wie Viren, Bakterien und Pilze sowie die von ihnen befallenen Körperzellen. Bei der humoralen Immunantwort dagegen steht die Bekämpfung von extrazellulären Erregern, ihren Toxinen sowie Parasiten durch neutralisierende Antikörper der terminal differenzierten Plasmazellen im Vordergrund. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht eine schnellere und effektivere Bekämpfung bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen und schützt den Organismus vor wiederkehrenden Infektionen.

### 1.2 Die humorale Immunantwort

Die humorale Immunität umfasst den Antikörper-vermittelten Schutz des Organismus durch terminal differenzierte B-Zellen, den Plasmazellen. Sezernierte Antikörper gelangen in das Blutserum und die extrazelluläre Flüssigkeit und schützen den Organismus durch Neutralisierung von Erregern im extrazellulären Raum.

#### 1.2.1 Struktur und Funktionsweise von Antikörpern

Antikörper sind heterodimere Proteine aus der Familie der Immunglobuline (Ig). Sie können in membrangebundener und löslicher Form vorkommen. Während B-Zellen membranständige Immunglobuline als B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, liegen die Immunglobuline nach ihrer Differenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen als intrazelluläre lösliche Proteine derselben Spezifität, den Antikörpern, vor. Monomere Immunglobuline besitzen eine „Y“-ähnliche Form und bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Protein-Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Bei der leichten Kette können die kappa ( $\kappa$ ) und lambda ( $\lambda$ ) Ketten unterschieden werden, welche artspezifisch in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen. Während in Mäusen das Vorkommen der kappa-Kette deutlich dominiert (Verhältnis  $\kappa$  zu  $\lambda$  ist 20:1), liegt das Verhältnis beim Menschen  $\kappa$  zu  $\lambda$  bei nur 2:1. Bei Kühen dagegen überwiegt die lambda-Kette ( $\kappa$  zu  $\lambda$  ist 1:20) (1).

Die Immunglobuline können funktionell in eine variable und eine konstante Region unterteilt werden. Die variable Domäne wird sowohl von der leichten als auch der schweren Kette gebildet und dient der spezifischen Erkennung eines Antigens. Jedes Antikörper-Molekül verfügt über zwei identische Antigen-Bindungsstellen einer einzigartigen Spezifität. Während der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark entsteht diese individuelle Spezifität durch den Prozess der somatischen Rekombination (2). Bei diesem Vorgang werden Gensegmente der leichten Kette mit Gensegmenten der schweren Kette kombiniert, wobei aus relativ geringen genetisch festgelegten Sequenzen eine enorme Diversität der Antikörper resultiert. Im Rahmen der weiteren Entwicklung und Differenzierung erfolgen nach der Aktivierung der B-Zellen weitere Änderungen der Spezifität durch somatische Hypermutationen während der Affinitätsreifung (Kap.1.2.2).

Die konstante Domäne bestimmt dagegen die Immunglobulinklasse, die eine Reihe von Effektorfunktionen der Antikörper vermittelt. Immunglobuline können basierend auf dieser konstanten Region in 5 verschiedene Klassen (Isotypen) unterteilt werden: IgA ( $\alpha$ ), IgD ( $\delta$ ), IgE ( $\epsilon$ ), IgM ( $\mu$ ) und IgG ( $\gamma$ ) (1). IgG kann beim Menschen weiterhin in 4 Subklassen unterteilt werden, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub>, die sich jeweils in den biologischen Eigenschaften unterscheiden. Bei der Maus wird IgG in IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub> eingeteilt.

Weitere Unterschiede existieren unter anderem bei den Antikörpern des Isotyps IgA, welche bei der Maus nicht weiter unterteilt, beim Menschen jedoch in IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub> differenziert werden. Ein Wechsel der Immunglobulinklasse führt zu Veränderungen der Effektor-eigenschaften, wobei die Spezifität davon nicht beeinflusst wird (1).

Die meisten Antikörper kommen als Monomere vor, wobei die Antikörper des Isotyps IgM im Serum als Pentamere zirkulieren und sezernierte Antikörper des Isotyps IgA überwiegend Monomere oder Dimere bilden. Diese polymeren Antikörper besitzen an ihrer konstanten Region einen besonderen Anhang von 18 Aminosäuren mit enthaltenden Cystein-Resten, welche durch eine weitere Polypeptidkette, der sogenannten J-Kette (*joining*), miteinander verbunden werden. Diese J-Kette spielt insbesondere eine wichtige Rolle beim Transport von IgA-Dimeren aber auch einigen IgM-Pentameren durch das Darmepithel in das Darmlumen. Dieser Vorgang der Polymerisation von Antikörpern geht mit einer Erhöhung von Antigen-Bindungsstellen einher.

Die Antikörper-vermittelte Immunabwehr übernimmt im Organismus wichtige Funktionen zum Schutz vor Infektionen und Krankheiten. Die Halbwertszeit der Antikörper im Serum beträgt höchstens 2–3 Wochen (3–5). Daher werden ständig große Mengen von Antikörpern sezerniert, welche in der Gewebeflüssigkeit vorliegen bzw. im Blut- und Lymphsystem durch den Körper zirkulieren. Extrazelluläre Bakterien oder Viren werden durch bindende Antikörper markiert (Opsonierung). Anschließend werden diese Infektionserreger von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als körperfremd erkannt und durch Phagozytose eliminiert. Antikörper können an Toxine binden und diese neutralisieren. Eine Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper führt direkt oder indirekt zur Abwehr der Mikroorganismen mittels Plasmaproteinen.

### **1.2.2 Aktivierung der B-Zellen und ihre Differenzierung**

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzelle über verschiedene Zwischenstadien. Sie besitzen auf ihrer Zelloberfläche membranständige Immunglobuline, die als Antigen-Rezeptor für die spezifische Erkennung und Bindung von Antigenen verantwortlich sind. Die Spezifität des B-Zell-Rezeptors entsteht während der frühen Entwicklung der B-Zelle durch den Prozess der somatischen Rekombination (2). Dabei werden die Gensegmente jeder einzelnen B-Zelle zufällig kombiniert, woraus die einzigartige Spezifität einer jeden B-Zelle entsteht.

Noch im Knochenmark unterliegen die B-Zellen einer strengen Selektion, wodurch diejenigen B-Zellen, deren Spezifität sich gegen körpereigene Strukturen richtet, eliminiert werden. Selbst-tolerante B-Zellen verlassen das Knochenmark und gelangen über die Blutzirkulation in die sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und Lymphknoten. Dort können sie auf ein passendes Antigen treffen, welches sie mit ihrem B-Zell-Rezeptor spezifisch binden.

Durch die Bindung des Antigens, erhält die B-Zelle ein erstes Signal. Das Antigen wird endozytotisch internalisiert und durch Proteasen in seine Peptide zerlegt. Diese Peptidfragmente werden über Moleküle des Histokompatibilitätskomplexes II (MHC II – *major histocompatibility complex II*) wieder an der Zelloberfläche präsentiert. Für die vollständige Aktivierung sind B-Zellen sowohl im Falle von thymusabhängigen (TD – *thymus-dependent*) als auch bei thymus-unabhängigen (TI – *thymus-independent*) Antigenen auf ein zweites Signal angewiesen.

Nach Bindung von TD-Antigenen z.B. Proteinen, stammt dieses zweite Signal von aktivierten CD4+ T-Helfer-(T<sub>H</sub>)-Zellen (CD – *cluster of differentiation*). Diese T-Zellen wurden zuvor durch Antigen-präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, aktiviert. In einer dynamischen Interaktion erkennt eine aktivierte spezifische T<sub>H</sub>-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor den Peptid:MHC-II-Komplex der B-Zelle. Die B-Zelle erhält ein zweites Signal über den CD40-Ligand (CD40L bzw. CD154), der an CD40 der B-Zelle bindet. Dies induziert eine Sekretion von Zytokinen z.B. Interleukin (IL) 4, IL-5, IL-6 und IL-10 durch die T-Zelle. Daraufhin beginnen die B-Zellen zu proliferieren und differenzieren anschließend entweder zu Gedächtniszellen oder hochaffinen Antikörper-sezernierenden Zellen (ASC), den Plasmazellen.

Bei der Differenzierung einer B-Zelle in eine Plasmazelle kommt es zu zahlreichen Umgestaltungen der Zellstruktur. Aus den kleinen B-Zellen entstehen zunächst die Plasmablasten, welche sich anschließend in die deutlich größeren, oval geformten Plasmazellen weiterentwickeln. Plasmazellen besitzen wesentlich mehr Zytoplasma, einen ausgeprägten Golgi Apparat sowie Immunglobulin-gefüllte Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Ein weiteres Merkmal ist, dass ASC keine membrangebundene Immunglobuline mehr aufweisen, stattdessen aber intrazellulär die Immunglobuline derselben Spezifität in ungebundener Form akkumulieren und sezernieren. Mit der Produktion an enormen Mengen Antikörper gewährleisten ASC eine langanhaltende humorale Immunität gegen Pathogene.

Die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen resultiert aus zahlreichen Veränderungen von Genexpressionen. Dabei werden Transkriptionsfaktoren der B-Zellen, z.B. Pax-5 (*Paired box protein 5*), unterdrückt, während Gene, die den Differenzierungsprozess regulieren, zunehmend exprimiert werden. Für die terminale Differenzierung zu Plasmazellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) essentiell, der daher als „Master-Regulator der Plasmazelldifferenzierung“ bezeichnet wird (6, 7). Weitere phänotypische Veränderungen der Plasmazellen bestehen in der geringen bzw. fehlenden Expression von MHC-Klasse II, B220, CD19 sowie weiteren Oberflächenmolekülen (8).

Plasmazellen können innerhalb weniger Tage aus proliferierenden und differenzierenden B-Zellen der Primärfoci bzw. etwas zeitverzögert aus Keimzentrums-B-Zellen hervorgehen.

Weiterhin entstehen ASC aus den peritonealen B1-Zellen der Bauchhöhle sowie B-Zellen der marginalen Zone der Milz.

Die Bildung von Keimzentren erfolgt nach Einwanderung aktivierter B-Zellen in die primären Follikel des Lymphgewebes. Innerhalb eines Keimzentrums finden die somatische Hypermutation und der Wechsel der Immunglobulinklasse statt, für deren Ablauf das Enzym AID (*activation-induced cytidine deaminase*) benötigt wird (9). Bei der somatischen Hypermutation werden durch Punktmutationen die variablen Regionen der B-Zell-Rezeptoren verändert, wobei B-Zellen mit verbesserten Bindungseigenschaften zum spezifischen Antigen positiv selektiert werden, während weniger bindungsstarke B-Zellen apoptotisch sterben (Affinitätsreifung). Am Ende der Keimzentrumsreaktion entstehen Antikörper-spezifische Plasmablasten und Gedächtniszellen, welche das Keimzentrum verlassen.

Bei Gedächtniszellen handelt es sich um langlebige zirkulierende Zellen, die reaktiv für einen erneuten sekundären Kontakt mit dem gleichen Antigen zur Verfügung stehen. Gedächtniszellen behalten ihre Immunglobuline als membranständige Moleküle auf der Zelloberfläche und bilden keine Antikörper. Sie führen bei einer Reinfektion mit dem Antigen durch Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort als bei der primären Reaktion. Daraus resultiert eine schnelle, schützende Abwehr mit Eliminierung des Antigens und einhergehender Milderung der Symptomatik des Infektionsgeschehens.

B-Zellen können weiterhin durch TI-Antigene unabhängig von einer Hilfe durch T-Zellen stimuliert werden. Zu den TI-Antigenen zählen z.B. bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide. Immunantworten auf diese nicht-proteinogenen Antigene führen ohne den Prozess der Affinitätsreifung zu der Bildung von ASC hauptsächlich des Isotyps IgM, von denen die meisten kurzlebig sind. Gedächtniszellen werden nicht gebildet.

### **1.2.3 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen**

Plasmazellen unterscheiden sich je nach ihrem Entwicklungsweg sowie in Abhängigkeit der Antigeneigenschaften in ihrer Lebensdauer, Lokalisation und der Immunglobulinsekretion sowie weiteren Charakteristiken.

Die meisten Antigene führen innerhalb weniger Tage zur Ausbildung von extrafollikulären Foci in den sekundären lymphatischen Organen. Im Rahmen dieser frühen Immunantwort entstehen nach zahlreichen Proliferationen aus Antigen-aktivierten B-Zellen überwiegend kurzlebige, nicht-migratorische Plasmazellen, die in der roten Milzpulpa sowie in den Marksträngen der Lymphknoten zu finden sind (10). In der Regel sind diese ASC jedoch kurzlebig und sterben apoptotisch ab (11).

Neben einer extrafollikulären Antwort entstehen bei Kontakt mit TD-Antigenen Keimzentren, aus denen Gedächtniszellen sowie hochaffine Plasmazellen hervorgehen. Ein Teil der gebil-

deten ASC stirbt durch Apoptose. Die meisten spezifischen ASC migrieren nach einer systemischen sekundären Immunantwort z.B. mit dem Protein Ovalbumin (OVA) bereits innerhalb einer Woche über die Blutzirkulation in das Knochenmark (12, 13). Nach der Einwanderung zahlreicher spezifischer ASC sinkt ihre Zahl zunächst, wobei ab ca. 10 Tagen ihre absolute Anzahl konstant bleibt (12). Untersuchungen ergaben, dass diese Antigen-spezifischen Plasmazellen über Monate bis Jahre im Knochenmark persistieren und über einen langen Zeitraum enorme Mengen Antigen-spezifischer Antikörper sezernieren, welche im Serum einen langfristigen stabilen Titer aufrecht erhalten (14–18). Damit bilden sie einen wichtigen Teil der humoralen Immunität.

Natürliche Infektionen sowie Vakzin-induzierte Immunreaktionen z.B. gegen Masern und Tetanus induzieren die Bildung von langanhaltenden protektiven Antikörpern im Serum (19). Da die Halbwertszeit der sezernierten Immunglobuline weniger als 3 Wochen beträgt, müssen die spezifischen Antikörper zur Aufrechterhaltung eines stabilen Seruntiters ständig neu gebildet werden (3–5). Wie ein stabiler Seruntiter und eine damit verbundene persistierende Antigen-spezifische Plasmazellpopulation über einen langen Zeitraum konstant aufrecht erhalten bleiben können, führte zu verschiedenen Thesen, die sich mit der Lebenszeit dieser Plasmazellen beschäftigten.

Nach der Theorie der kontinuierlichen Regeneration, sind die ASC kurzlebig. Nach konstanter Aktivierung von Gedächtniszellen durch persistierende Antigene bzw. durch polyklonale Aktivierung entstehen neue Antigen-spezifische ASC (20–22). Diese und weitere Studien führten zu der Annahme, dass Plasmazellen generell kurzlebig sind (23, 24).

Die heute weitestgehend akzeptierte Theorie geht davon aus, dass einige der Plasmazellen langlebig werden können, welche als nicht-proliferierende Zellen lange Zeit vor allem im Knochenmark persistieren (14, 25–28). Manz et al. zeigten, dass nach einer systemischen Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin die Mehrheit der induzierten OVA-spezifischen ASC im Knochenmark über einen Zeitraum von 90 Tagen nicht proliferierten (12, 14). Dass persistierende ASC nicht kontinuierlich aus Gedächtniszellen neu generiert werden, geht aus Untersuchungen hervor, welche nach Depletion der Gedächtniszellen im murinen Knochenmark über ein Jahr Virus-spezifische Plasmazellen detektierten (15). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass langlebige, nicht-proliferative Plasmazellen unabhängig vom Antigen über einen langen Zeitraum im Knochenmark persistieren (12).

Insgesamt wird angenommen, dass vermutlich zwischen 10 – 20% der aus der Keimzentrumsreaktion resultierenden ASC tatsächlich langlebig werden (29). Die meisten langlebigen ASC sind nach dem sekundären Antigen-Kontakt im Knochenmark lokalisiert, wobei einige wenige von ihnen auch in der Milz persistieren (14, 30).

Die Mehrheit der gesamten Plasmazellen eines Organismus befindet sich jedoch in der Lamina propria des Darmgewebes, welche als Teil der verschiedenen Schleimhäute über

80% aller Plasmazellen des Körpers beherbergt (31). Diese mukosalen ASC sezernieren überwiegend Immunglobuline des Isotyps IgA, welche nach dem Transport in das Darmlumen eine erste Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen, Toxine sowie den Kommensalen der Darmflora bieten. Auf ihre Entwicklung und Lebensdauer wird im Kapitel 1.3.1.5 differenziert eingegangen.

Weiterhin werden ASC im Rahmen von Autoimmunerkrankungen sowie Entzündungsprozessen gebildet, welche in das Knochenmark bzw. in das entzündete Gewebe migrieren können. In den Nieren bei einigen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematosus oder im Fall der Rheumatoiden Arthritis in der Synovia der Gelenke (32, 33) können ASC akkumulieren. Auch bei chronischen Entzündungen der Lunge bei asthmatischen bzw. allergischen Prozessen werden persistierende ASC beobachtet (34, 35). Die Plasmablasten, welche aus einer Keimzentrumsreaktion hervorgehen, sind migrationsfähig und können durch Regulation ihrer Oberflächenrezeptoren über die Blutzirkulation in verschiedene Gewebe wandern. Die Gewebe produzieren spezifische Chemokine, von denen die Plasmablasten mit den korrespondierenden Rezeptoren chemotaktisch angezogen werden. Für die Migration der Plasmablasten aus sekundären Lymphorganen in das Knochenmark ist der Chemokin-Rezeptor CXCR4 von großer Bedeutung (36). Der CXCR4-Ligand ist CXCL12 (SDF-1 – *stromal cell-derived factor 1*), welcher von Endothelzellen sowie Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird (36, 37). Des Weiteren migrieren Plasmablasten in entzündetes Gewebe und können dort nach ihrer Entwicklung zu Plasmazellen zur Abwehr von Pathogenen mittels Antikörpersekretion beitragen. Diese Migration erfolgt gegen die Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11, welche die CXCR3-exprimierenden ASC anlocken (36). Das Migrationsverhalten der intestinalen Plasmablasten basiert auf der Expression von CCR9 und CCR10, deren Liganden von Zellen des Darmgewebes gebildet werden (38–40). Darauf wird in Kap. 1.3.1.4 näher eingegangen.

#### **1.2.4 Das Konzept der Überlebensnische**

Eine kleine Fraktion der Plasmazellen im Knochenmark kann langlebig werden, ohne Zellproliferation über Jahre hinweg überleben und Antikörper sezernieren (15, 41). Während isolierte Plasmazellen in Kultur binnen weniger Tage absterben, können sie im Gewebeverband bzw. unter Zugabe bestimmter Faktoren oder anderen Zellen länger überleben.

Man nimmt an, dass die Langlebigkeit der Plasmazellen im Knochenmark in speziellen Überlebensnischen möglich ist und weniger aus intrinsischen Eigenschaften der Plasmazellen resultiert (25, 27, 42). Diese Nischen stellen eine spezielle Umgebung verschiedener Zellen dar, welche durch Bildung von Überlebensfaktoren und Adhäsionsmolekülen eine Plasmazelle ohne Zellproliferation über einen langen Zeitraum hinweg am Leben erhalten. Allerdings sind bis heute noch nicht alle Faktoren und Zellen der Nische bekannt.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass unter anderem retikuläre Stromazellen, eosinophile Granulozyten und Megakaryozyten an der Ausbildung einer Überlebensnische beteiligt sind (43–45). Verschiedene Studien identifizierten bisher die Zytokine IL-5, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF-)  $\alpha$  sowie die Liganden BAFF (*B cell activating factor*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) bzw. CXCL12 als Faktoren, welche zu einer Verlängerung der Lebenszeit von Plasmazellen beitragen (46–48).

Insbesondere eine Subpopulation der retikulären Stromazellen des Knochenmarks ist regulierend an der Entwicklung der Überlebensnischen, ihrer Aufrechterhaltung in einer limitierten Anzahl aber auch an der Migration der Plasmazellen in diese Nischen beteiligt (43). Diese CXCL12-bildenden Stromazellen exprimieren den Ligand VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule-1*, CD106), durch welchen die Plasmazellen mit ihrem Integrin VLA-4 (*very late antigen-4*, Integrin  $\alpha 4\beta 1$ ) Kontakt zur Stromazelle eingehen (49). BAFF und APRIL, Zytokine der TNF-Familie, sind für die Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung sowie das Überleben von B-Zellen von Bedeutung. Beide Zytokine binden an die Rezeptoren BCMA (*B cell maturation antigen*) und TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*), wobei BAFF zusätzlich vom BAFF-Rezeptor erkannt wird. Plasmazellen exprimieren BCMA und TACI, wohingegen der BAFF-Rezeptor kaum detektierbar ist. Es gibt Hinweise, dass besonders die Funktion des Rezeptors BCMA bzw. die Anwesenheit von APRIL für das langfristige Überleben von Plasmazellen von Bedeutung sind, denn BCMA<sup>-/-</sup> bzw. APRIL-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Überlebensrate der langlebigen Plasmazellen im Knochenmark (48, 50). Weitere Moleküle auf der Zelloberfläche von Plasmazellen konnten mit einer verlängerten Überlebensrate in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören u.a. die Adhäsionsmoleküle LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*), CD44 sowie CD28, CD93 und Fc $\gamma$ RIIb (46, 51, 52). All diese extrinsischen Faktoren tragen dazu bei, dass Plasmablasten in das Knochenmark migrieren und innerhalb dieser speziellen Umgebung in Kontakt mit verschiedenen Zelltypen treten, welche mit ihren Signalen das Überleben der Plasmablasten sowie ihre Differenzierung in Plasmazellen fördern. Plasmablasten, die nach ihrer Einwanderung in das Knochenmark diese Signale nicht erhalten, sterben durch Apoptose (53).

Man geht davon aus, dass die Zahlen der ASC und demnach die Zahl der Überlebensnischen für langlebige Plasmazellen im Knochenmark limitiert sind. Das humane Knochenmark gesunder Individuen enthält 0,1-1% Plasmazellen. Durch den ständigen Kontakt mit neuen Pathogenen aus der Umwelt, entstehen stetig neue Plasmablasten, welche ebenfalls in das Knochenmark migrieren können. Die Theorie der Überlebensnische nimmt an, dass neue einwandernde Plasmablasten die Fähigkeit besitzen mit den bereits sesshaften Plasmazellen um die Nische zu konkurrieren (53). Dabei wird eine Plasmazelle aus einer früheren Immunreaktion von einer Plasmazelle ersetzt, welche die Spezifität gegen

ein aktuelles Antigen aufweist. Dieses Modell ermöglicht eine Anpassung des humoralen Gedächtnisses bei einer limitierten Zahl von Überlebensnischen (13). Plasmazellen, welche aus einer Überlebensnische verdrängt werden und folglich keine Überlebenssignale mehr erhalten, sterben durch Apoptose. Überlebensfaktoren werden unter anderem in entzündeten Geweben produziert und ermöglichen dort eine Akkumulation von langlebigen Plasmazellen, solange die Faktoren im Rahmen des Entzündungsprozesses gebildet werden. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass das Konzept der Überlebensnischen auch auf das mukosale Gewebe Anwendung finden kann, worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

### 1.3 Das mukosale Immunsystem

Haut und Schleimhäute (Mukosae) bilden eine enorme Kontaktfläche des Organismus zu seiner Umwelt und stellen täglich Eintrittspforten für infektiöse Erreger, Toxine, Allergene und Karzinogene dar. Das ausgekleidete Areal der Schleimhäute eines erwachsenen Menschen entspricht mehreren hundert Quadratmetern und ist damit um ein vielfaches größer als die Fläche der Haut (54). Demnach resultiert auch ein Großteil aller Infektionskrankheiten durch ein Eindringen von Pathogenen über den mukosalen Weg (55–57).

Das mukosale Immunsystem wird in organisierte Strukturen unterteilt, in denen eine Immunreaktion eingeleitet wird (Induktionsort), und in diffuse Effektor-Kompartimente, in welchen vor allem durch Effektorzellen eine Immunabwehr stattfindet. Die induktiven Strukturen der verschiedenen Schleimhäute des Körpers werden als Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe (MALT – *mucosa-associated lymphoid tissue*) zusammengefasst. Den größten Anteil des MALT bildet das Darm-assoziierte Lymphgewebe (GALT – *gut-associated lymphoid tissue*). Weitere Komponenten sind das NALT (*nasopharynx-associated lymphoid tissue*), BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*) und das TALT (*tear-duct-associated lymphoid tissue*).

#### 1.3.1 Das Darmimmunsystem

Der Darm wird anatomisch in den Dünndarm, mit den Abschnitten Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum), sowie dem Dickdarm, mit den Abschnitten Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rectum), untergliedert. Die primäre Funktion des Dünndarms besteht in der Resorption von Nahrungsbestandteilen, daher ist seine Oberfläche durch Darmausstülpungen (Villi), Einsenkungen (Krypten) sowie einem Bürstensaum der Enterozyten um ein vielfaches vergrößert. Das Colon ist insbesondere für die Rückresorption von Wasser sowie Elektrolyten verantwortlich, seine Zotten bilden sich nach der Geburt zurück.

Das Darmgewebe wird zum Lumen hin von einem einschichtigen Zylinderepithel (*Lamina epithelialis mucosae*) bedeckt. Die darunterliegende Lamina propria (*Lamina propria mucosae*)

enthält zahlreiche Lymphozyten sowie u.a. dendritische Zellen, die diffus verteilt oder als Lymphfollikel zusammengelagert sind. Weitere Schichten sind die Submukosa (*Tunica submucosa*) mit enthaltenden Blutgefäßen, Nerven und Drüsen, gefolgt von glatter Muskulatur (*Tunica muscularis*) mit Lymph- und Blutgefäßen. Eine Serosa (*Tunica serosa*) grenzt den Darm zur Bauchhöhle ab, mit Ausnahme eines außerhalb der Peritonealhöhle gelegenen Mastdarmabschnittes, der eine Adventitia (*Tunica adventitia*) besitzt.

Das Darmepithel bildet mit seiner bedeckenden Muzinschicht sowie den in das Darmlumen sezernierten (s)IgA-Antikörpern eine erste Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen. Gegen Antigene, die diese Barriere dennoch überwinden, wird eine gezielte Immunreaktion des Darmimmunsystems eingeleitet. Das Immunsystem des Darms setzt sich einerseits aus dem organisierten GALT, mit den Peyer'schen Plaques, den isolierten Follikeln (ILF – *isolated lymphoid follicle*) sowie dem Blinddarm, und andererseits den diffus verteilten Immunzellen der Lamina propria und des Epithels zusammen. Die mesenterialen Lymphknoten stellen ebenso Induktionsorte des intestinalen Immunsystems dar. Sie werden dennoch nicht dem GALT zugeordnet (58).

Die Funktion des Darmimmunsystems besteht im Schutz vor mukosalen Erregern und ihren Toxinen. Gleichzeitig hält der Organismus in einer feinen Balance eine mutualistische Wechselbeziehung mit den kommensalen Bakterien der Mikroflora aufrecht. Dabei entwickelt sich gegen die Kommensalen sowie die Vielzahl von Nahrungsmittelantigenen eine Toleranz (59). Gerät diese Homöostase aus dem Gleichgewicht, droht die Entstehung von chronischen Darmentzündungen wie z.B. Inflammatory Bowel Disease und Allergien (60).

### 1.3.1.1 Die biologische Bedeutung von IgA im Darm

Der Magen-Darm-Trakt wird durch die Besiedlung mit kommensalen Bakterien sowie durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln ständig zahlreichen Antigenen ausgesetzt. Die Bezeichnung „Kommensalen“ leitet sich vom lateinischen *cum mensa* („mit am Tisch“) ab. In einer Wechselbeziehung profitieren die Bakterien der Mikroflora einerseits vom Nahrungsangebot im Magen-Darm-Trakt des Wirts, ohne diesem dabei Schaden zuzufügen. Andererseits wirken die Bakterien an dem Verdau mit, verhindern eine Vermehrung und Ausbreitung invasiver Pathogene durch Verdrängung und wirken stimulatorisch auf das Darmimmunsystem. Das Darmimmunsystem kann dabei zwischen den harmlosen Antigenen der kommensalen Bakterien sowie Nahrungsbestandteile und möglichen Pathogenen und Toxinen im Falle einer Infektion differenzieren. Dafür entwickelte der Wirtsorganismus gegen avirulente Antigene ein komplexes suppressorisches System, die orale Toleranz (61, 62). Vor allem sIgA-Antikörper sowie suppressorische T-Zellen unterdrücken bei diesem Vorgang eine spezifische Immunantwort, wodurch Entzündungsreaktionen inhibiert werden und die Darmschleimhaut vor Zerstörung geschützt wird.

Die Produktion und Sekretion von enormen Mengen an IgA-Antikörpern spielen demnach sowohl während der Homöostase als auch im Falle einer Infektion eine wichtige Rolle. Sezernierte IgA-Dimere, aber auch IgM-Pentamere, können über ihre J-Kette mit dem pIgR (*polymeric Ig receptor*) interagieren. Dabei handelt es sich um einen Antikörper-Transporter, der an der basolateralen Seite des Darmepithels exprimiert wird (63). Die polymeren Antikörper werden zur apikalen Seite des Epithels transportiert und in das Darmlumen sezerniert. Sie bestehen aus dem jeweiligen Dimer sowie einer sekretorischen Komponente des pIgR (54). Die sIgA-Antikörper sind gegen bakterielle Proteasen relativ resistent, dennoch ist ihre Halbwertszeit mit 4 – 7 Tagen kürzer als die von IgG. Im humanen Intestinaltrakt kommt überwiegend die Proteasen-resistentere Subklasse IgA<sub>2</sub> vor (64).

Die Sekretion von lokal produzierten IgG-Antikörpern erfolgt passiv durch Zwischenräume der Epithelzellen, wo sie im Lumen ebenfalls Pathogene neutralisieren können. Allerdings werden IgG-Antikörper relativ schnell durch Proteasen abgebaut. Darüber hinaus bringt IgG aufgrund der pro-inflammatorischen Wirkung die epitheliale Integrität in Gefahr (65).

Die sIgA-Antikörper wirken dagegen anti-inflammatorisch und binden im Lumen an die Kommensalen sowie invasiven Pathogene, Nahrungsantigene und Toxine im Rahmen einer Neutralisierung bzw. Markierung. Man geht davon aus, dass hochaffines IgA vornehmlich der Neutralisierung von Pathogenen dient, während sIgA mit niedriger Affinität den Eintritt kommensaler Bakterien verhindert (66). Im Darmlumen wird durch die IgA-Bindung ein Eintritt der IgA-Antigen-Komplexe in das Darmgewebe unterbunden (*surface immune exclusion*) und luminal Toxine werden unwirksam gemacht. Gleichzeitig wird eine kontrollierte Aufnahme markierter Antigene über die M-Zellen ermöglicht (67, 68). Darüber hinaus können IgA-Antikörper intrazelluläre Viren (z.B. Rotaviren, HIV) oder LPS neutralisieren und folglich die Darmepithelzellen vor einer Infektion durch die Pathogene sowie vor Schäden resultierend aus einer Entzündungsreaktion schützen (69, 70).

Bei einer IgA-Defizienz, einer weit verbreiteten primären Immundefizienz des Menschen, fehlen die IgA-Antikörper. Durch die Produktion von Antikörpern der Isotypen IgM erfolgt eine relativ gute Kompensation. Zwei Drittel der Betroffenen sind frei von Symptomen, während ein Drittel an widerkehrenden Infektionen, Autoimmunität oder Allergien leidet (58).

### **1.3.1.2 Entwicklung und Aufbau der Darm-assoziierten Lymphgewebe**

Bei Mensch und Nager sind die Peyer'schen Plaques hauptsächlich im Ileum sowie in geringerer Anzahl im Jejunum lokalisiert. Peyer'sche Plaques sind der anatomischen Struktur von Lymphknoten sehr ähnlich, allerdings verfügen sie weder über afferente Lymphbahnen noch über eine umhüllende Kapsel. Sie setzen sich aus einem Stromalen Grundgerüst mit mehreren B-Zellfollikeln sowie interfollikulären T-Zellbereichen und zahlreichen Antigen-präsentierenden Zellen zusammen. Bedeckt werden sie von einem speziellen Follikel-assoziierten

Epithel mit enthaltenen M-Zellen (*membrane* oder *microfold*). M-Zellen gelten als Haupteintrittspforte für intestinale Antigene und stellen daher einen besonderen Verbindungsbereich zwischen Darmlumen und dem intestinalen Immunsystem dar. Bei Wiederkäuern, Schweinen und Hunden bestehen die Peyer'schen Plaques im Ileum aus kontinuierlichen bis zu 2 Meter langen Lymphstrukturen. Die Entwicklung der Peyer'schen Plaques erfolgt bereits pränatal, wobei Keimzentren erst nach der Geburt im Zusammenhang mit der Besiedlung der Darmschleimhaut mit den kommensalen Bakterien ausgebildet werden.

Die ILFs kommen sowohl im Dünndarm- als auch im Dickdarmgewebe vor, wobei ihre Anzahl zunehmend nach distal steigt. Im Gegensatz zu den Peyer'schen Plaques enthalten die ILFs nur einen B-Zellfollikel mit vereinzelt T-Zellen und ihre Entwicklung erfolgt erst postnatal. Größe und Anzahl der ILFs werden von der bakteriellen Besiedlung des Darmes beeinflusst. Bei Mäusen gibt es zusätzlich Plaques im Bereich der Krypten. Diese werden bereits während der fötalen Entwicklung gebildet und können zu den ILFs heranreifen.

### 1.3.1.3 Aktivierung der intestinalen B-Zellen

An der Entstehung von Plasmazellen des Darms sind die Lymphozyten der Peyer'schen Plaques (71) und der ILFs (72) sowie der mesenterialen Lymphknoten als drainierende Lymphknoten des Darmgewebes beteiligt. Eine weitere Quelle von mukosalen B-Zellen bei der Maus bilden Milzzellen der Marginalzone und die B1-Zellen der Peritonealhöhle (66, 73). B1-Zellen sezernieren natürliche Antikörper des Isotyps IgM sowie polyreaktive IgA-Antikörper, welche zur Abwehr der kommensalen Bakterien von Bedeutung sind (74). Sie entwickeln sich in Abhängigkeit von IL-5 aus Progenitorzellen der Peritonealhöhle (75), wobei für ihre Entwicklung bzw. Migration in den Darm die Stimulation durch die Darmflora eine Rolle spielt (76). B1-Zellen reagieren polyreaktiv ohne T-Zellhilfe auf z.B. Polysaccharide der Kommensalen und tragen bis zu 50% der murinen intestinalen Plasmazellen bei (74, 76–78). Mit einem abweichenden Rezeptor-Repertoire der B2-Zellen (79) produzieren Plasmazellen der B1-Linie IgA-Antikörper mit geringerer Affinität und breiter Spezifität (80), deren Sekretion zur Aufrechterhaltung der Darmhomöostase bedeutend scheint. Ob B1-Zellen auch beim Menschen zum Plasmazellkompartiment des Darmes beitragen, ist nicht bekannt. Auch inwiefern diese verschiedenen Zellen quantitativ zur Generierung der intestinalen Plasmazellen beitragen, ist bisher unstimmgig (66).

Die M-Zellen der Peyer'schen Plaques und ILFs nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf und transportieren diese in die Follikel (81). Auch im murinen Epithel der Darmvilli wurden M-Zellen entdeckt (82). Ein Großteil der aufgenommenen Antigene wird von subepithelialen Makrophagen eliminiert. Nicht-phagozytierte Antigene können die in den M-Zelltaschen lokalisierten T- und B-Gedächtniszellen aktivieren bzw. von den zahlreichen dendritischen Zellen nahe der M-Zellen aufgenommen werden (82).

Die dendritischen Zellen sind sowohl bei den Vorgängen einer protektiven Immunantwort als auch bei der Ausbildung der oralen Toleranz von großer Bedeutung. Im Darm und den drainierenden mesenterialen Lymphknoten können diverse Subpopulationen der dendritischen Zellen unterschieden werden. Ihre Einteilung erfolgt anhand ihrer Herkunft bzw. Lokalisation, ihrer Migrationsfähigkeit, der Expression von Oberflächenmolekülen (z.B. CD11b, CD11c, CD103) und/oder von Chemokin-Rezeptoren (CX3CR1, CCR6). Diese Subpopulationen weisen funktionelle Unterschiede auf (60). Eine besondere Subpopulation der Lamina propria sind CX3CR1+, nicht-migratorische dendritische Zellen, welche in der Lage sind, durch Ausbildung von transepithelialen Fortsätzen Antigene direkt aus dem Darmlumen aufzunehmen (83). Migratorische CD103+ (auch  $\alpha_E$ -Integrin) dendritische Zellen interagieren nach ihrer Antigen-Aufnahme mit B- und T-Zellen der Peyer'schen Plaques und der mesenterialen Lymphknoten. Dort initiieren sie die Bildung von FOXP3+ (*forkhead box P3*) regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ),  $T_H2$ -Zellen, ferner  $T_H1$ - oder  $T_H17$ -Zellen und von IgA+ B-Zellen (60).

Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt durch TI- oder TD-Antigene, welche sich innerhalb der Immunantworten gegen Kommensalen (TI) bzw. gegen Pathogene (TD) nicht eindeutig zuordnen lassen (84). Funktionell dienen die Peyer'schen Plaques der TD- und der TI-Immunantwort zur Abwehr von Pathogenen, während die ILFs überwiegend unabhängig von  $T_H$ -Zellen eine Kontrollfunktion über die Kommensalen ausüben (31).

Im Gegensatz zur systemischen Immunantwort, in welcher Keimzentren nur nach einer Immunisierung zu beobachten sind, sind in den Peyer'schen Plaques des Darms ständig Keimzentren ausgeprägt. Die aktivierten B-Zellen proliferieren im Keimzentrum, wobei B-Zellen mit erhöhten Antigen-Bindungseigenschaften positiv selektiert werden. Mukosale B-Zellen können auch unabhängig ihrer Spezifität durch Interaktion von bakteriellen Komponenten mit den TLRs (*Toll-like receptors*) aktiviert werden und vermutlich zur Keimzentrumsreaktion beitragen (85).

Sowohl bei T-Zellabhängigen als auch -unabhängigen Signalwegen kommt es zum Wechsel der Immunglobulin-Klasse, meist zu IgA. Zahlreiche metabolische Produkte und Zytokine von Zellen des intestinalen Gewebes formen ein einzigartiges Milieu und tragen dazu bei, dass nahezu alle B-Zellen IgA exprimieren (84). TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*) ist ein essentielles Zytokin für die Induktion von IgA (31, 86), welches von diversen Zellen, unter anderem dendritischen Zellen, follikulären dendritischen Zellen, Epithelzellen bzw. T-Zellen, gebildet wird. Dieses Zytokin liegt in inaktiver Form in einer Komplexverbindung vor, wobei z.B. Matrix-Metalloproteinasen bei der Zerlegung des Komplexes sowie der Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 eine Rolle spielen (87).

Im Gegensatz zu Milz, Lymphknoten oder Peyer'schen Plaques exprimieren die dendritischen Zellen der Lamina propria in großen Mengen TNF- $\alpha$ . Die Faktoren TNF- $\alpha$  bzw.

iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) haben einen positiven Effekt auf TGF- $\beta$ . TNF- $\alpha$  fördert TGF- $\beta$ -aktivierende Faktoren, während iNOS die Expression von TGF- $\beta$ -Rezeptoren auf den B-Zellen erhöht. Verschiedene Interleukine wie z.B. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-15 und IL-21 fördern ebenfalls den Wechsel zu IgA bzw. die Differenzierung zu IgA<sup>+</sup> Plasmablasten (59). Zwei weitere Faktoren, BAFF und APRIL, tragen zum IgA-Klassenwechsel bei. Ihre Produktion erfolgt durch dendritische Zellen sowie plasmazytoide dendritische Zellen und das Epithel (88). APRIL-defiziente Mäuse weisen nach einer oralen Immunisierung mit einem TD-Antigen eine reduzierte Reaktion der mukosalen Immunantwort sowie eine deutlich verminderte Gesamtzahl der IgA<sup>+</sup> Plasmazellen in der Lamina propria des Dünndarms auf (89). Neben BAFF und APRIL produzieren die Epithelzellen TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), welches die Bildung von BAFF und APRIL in den dendritischen Zellen hochreguliert (90). Weiterhin bilden sie RA (*retinoic acid*), ein metabolisches Produkt von Vitamin A, sowie das Neuropeptid VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*) und unterstützen mit diesen Faktoren die Bildung von IgA<sup>+</sup> B-Zellen. RA ist insbesondere für die Induktion des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  von Bedeutung (91), das für die spätere Migration in den Darm wichtig ist. Dabei unterstützt RA im Zusammenhang mit anderen Faktoren dendritischer Zellen synergistisch die Produktion von IgA (92). VIP induziert zusätzlich die Expression von GIP (*IgA-inducing protein*) in den dendritischen Zellen (93), das ebenfalls einen Wechsel zu IgA fördert.

Wann dieser Klassenwechsel erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Lycke et al. vermuten, dass die B-Zellen bereits als IgA<sup>+</sup> Zellen in die Keimzentren einwandern, gefolgt von Proliferationen mit Affinitätsreifung und anschließender Migration in die Lamina propria (59). Zusätzlich wird ein Klassenwechsel und folglich die Entstehung von IgA<sup>+</sup> B-Zellen direkt in der Lamina propria kontrovers diskutiert (94–96).

ROR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse besitzen durch das Fehlen des Faktors ROR $\gamma$  weder Lymphknoten noch Darm-assoziierte Lymphstrukturen. Dennoch weisen sie im Darm IgA<sup>+</sup> ASC auf und geben Hinweise auf eine mögliche Entstehung von ASC in der Lamina propria in situ (72, 97). Neben IgA können je nach Zytokinproduktion der beteiligten Zellen auch IgM<sup>+</sup> Plasmazellen entstehen sowie einige Plasmazellen der Isotypen IgG bzw. IgE.

### 1.3.1.4 Migration und Differenzierung der aktivierten intestinalen B-Zellen

Die meist IgA<sup>+</sup> B-Zellen verlassen die Peyer'schen Plaques bzw. ILFs über fenestrierte Lymphbahnen, welche als afferente Lymphgefäße zu den mesenterialen Lymphknoten führen. Nach weiteren Proliferationen differenzieren sie zu Plasmablasten und verlassen anschließend den Lymphknoten über efferente Lymphbahnen und gelangen über den Ductus thoracicus über den linken Venenwinkel der V. subclavia und V. jugularis interna in die Blutzirkulation. Diese Plasmablasten migrieren vorzugsweise in Effektorregionen, welche unmittelbar im Zusammenhang stehen mit den Induktionsorten, aus denen sie ursprünglich

hervorgingen (31). Dementsprechend migrieren die intestinal induzierten Plasmablasten nach ihrer Zirkulation durch den Organismus zielgerichtet in die Effektor-kompartimente des Darms. Die Migration wird durch Chemokine und ihre Rezeptoren sowie durch Adhäsionsmoleküle gesteuert und erfolgt Antigen-unabhängig. Dennoch kann luminales Antigen sowohl die Anzahl als auch die Verteilung der einwandernden Plasmablasten innerhalb der Darmabschnitte beeinflussen (98). Eine Migration der im Darm induzierten Plasmablasten in andere Schleimhautkompartimente z.B. den Bronchialtrakt, den Urogenitaltrakt oder das laktierende Brustdrüsengewebe ist in einem geringen Umfang möglich (55, 99).

Eine selektive Migration der Chemokinrezeptor CCR9-exprimierenden Plasmablasten in das diffuse Dünndarmgewebe wird durch die Bildung des Chemokins CCL25 (TECK – *thymus-expressed chemokine*) gesteuert (38). CCL25 wird von Epithelien der Darmkrypten (39) produziert sowie den Endothelzellen des Dünndarms (100). Die Bedeutung dieser Interaktion für die Migration der ASC in das Darmgewebe ist anhand von CCR9-defizienten Mäusen ersichtlich, welche im Dünndarm eine verminderte Plasmazellzahl aufweisen und auf oral applizierte Antigene mit einer reduzierten Immunantwort reagieren (101). Eine Migration in das diffuse Dickdarmgewebe wird dagegen durch das Chemokin CCL28 (MEC – *mucosae-associated chemokine*) dirigiert, welches mit dem Rezeptor CCR10 der IgA<sup>+</sup> Plasmablasten interagiert (38, 40). Im Dünndarm wird CCL28 in nur sehr geringen Mengen gebildet.

Die Migration der ASC in die mukosalen Gewebe wird außerdem durch Mukosa-spezifische Adhäsionsmoleküle gesteuert. Im Gegensatz zu systemisch induzierten Plasmablasten exprimieren zirkulierende intestinal induzierte Plasmablasten auf ihrer Zelloberfläche das Integrin  $\alpha 4\beta 7$ , mit dem sie an MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) des Gefäßendothels der Lamina propria binden können (102). Weiterhin wird eine direkte Migration der intestinalen Lymphozyten vom Ort ihrer Entstehung, den Peyer'schen Plaques bzw. den ILFs, in die Lamina propria vermutet. In der Lamina propria erfolgt die terminale Differenzierung der Plasmablasten zu Plasmazellen, welche enorme Mengen von Antikörpern sezernieren (beim Menschen 40–60 mg pro kg und pro Tag) (103).

Verschiedene Zytokine, Chemokine sowie ihre Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle fördern das Überleben der Plasmablasten und ihre Differenzierung in Plasmazellen. Insbesondere stromale Zellen der Lamina propria sowie IL-5, IL-6 und IL-10 sind dabei bedeutend (31). Quantitativ enthält die Lamina propria mehr als 80% aller Plasmazellen des gesamten Organismus. Bei der Maus exprimieren diese nahezu alle den Isotyp IgA (104).

### **1.3.1.5 Lebensspanne der intestinalen Plasmazellen**

Trotz des quantitativ deutlich überlegenen Vorkommens von Plasmazellen in der Mukosa im Vergleich zum Knochenmark, ist bisher nur sehr wenig über ihr Proliferationsverhalten und ihre Lebensspanne bekannt (88, 105).

Gowans und Knight konnten kontinuierlich Lymphoblasten unabhängig von einer Immunisierung in der Lymphbahn des Ductus thoracicus der Ratte detektieren, was auf eine kontinuierliche Bildung intestinaler Plasmazellen hinweist (106). Weitere frühere Studien berichteten von einer hohen Proliferationsrate der mehrheitlichen Plasmazellen des Darmes und schlussfolgerten daraus ihre Kurzlebigkeit von durchschnittlich 5 Tagen mit einer maximaler Lebensspanne von 6 Wochen (107). Eine kontinuierliche Markierung proliferierender Zellen der Ratte über 10 Tage ergab, dass der Großteil der intestinalen Plasmazellen proliferativ ist, wobei dennoch eine kleine nicht-proliferierende Population in der Lamina propria detektiert werden konnte (30). Im Blut des Menschen sind konstitutiv Antikörper-sezernierende Zellen detektierbar, deren Mehrheit Antikörper des Isotyps IgA produziert und CCR10 sowie das Integrin  $\beta 7$  exprimiert. Dies weist auf ihre mukosale Herkunft hin (108). Diese Resultate deuten auf eine hohe Bildungsrate der intestinalen Plasmazellen hin, sowohl mit als auch ohne Immunisierung.

Studien von Zellen der nasalen Schleimhäute zeigten, dass mukosale Plasmazellen nach viraler Infektion der Maus mit Influenzaviren bzw. inaktivierten respiratorischen Synzytialviren Virus-spezifische Plasmazellen lebenslang detektiert werden konnten (109, 110). Virus-spezifische Plasmazellen persistierten dabei in den diffusen Gewebe des NALT und produzierten langanhaltend protektive Antikörper (109). Erst kürzlich zeigten Experimente zur Überlebensfähigkeit von humanen Plasmazellen des intestinalen Gewebes, dass das umliegende Darmgewebe ähnlich wie im Knochenmark auf das Überleben der Plasmazellen einen bedeutenden Einfluss hat (111). Eine weitere Studie zeigte, dass Antigen-spezifische Plasmazellen nach Eliminierung des Antigens in der Lamina propria persistieren können und über mehr als 3 Monate spezifische Antikörper sezernieren (112). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass zumindest eine Subpopulation der intestinalen Plasmazellen über das Potenzial verfügt, über einen längeren Zeitraum zu überleben und Antikörper zu sezernieren. Die Betrachtung der bisher identifizierten Überlebensfaktoren des Knochenmarks und deren Vorkommen in der Lamina propria lässt vermuten, dass potenziell die Möglichkeit einer Überlebensnische für Plasmazellen im diffusen Darmgewebe vorhanden ist. Die Faktoren BAFF und APRIL werden im Dünndarm von diversen Zellen, wie dendritischen Zellen, plasmazytoiden dendritischen Zellen sowie von Epithelzellen, sezerniert. Das Epithel fördert durch seine TSLP-Sekretion die Produktion von BAFF und APRIL der dendritischen Zellen (88). Darüber hinaus produzieren Epithelzellen zusätzlich IL-6 und exprimieren CXCL12 (113, 114).

## 1.4 Mukosale Vakzine

Die meisten Pathogene gelangen über die Schleimhäute in den Organismus (55–57). Daher ist die Entwicklung effektiver Vakzine, die eine schützende Abwehr induzieren, weltweit von großer Bedeutung. Mukosale Vakzine werden meist oral und nasal verabreicht, seltener werden sie rektal, vaginal, transkutan und sublingual appliziert. Im Vergleich zu systemischen Immunisierungen bringen sie zahlreiche Vorteile mit sich. Beispielsweise ist ein geringerer Reinigungsgrad des Impfstoffes durchaus akzeptabel, es besteht kein Risiko von Kontaminationen durch Injektion und sie sind durch die einfache Verabreichung für Massenimmunisierungen praktikabel (55, 56).

Natürliche Infektionen und mukosale Vakzine führen zur Bildung von Antigen-spezifischen Plasmazellen, deren sIgA-Antikörper im Darm bei erneuten Kontakt mit dem Antigen durch Bindung der Pathogene und ihrer Toxine die Symptome deutlich mildern bzw. komplett unterbinden können. Oft werden neben den Antigen-spezifischen intestinalen ASC auch im Serum langanhaltende Titer mit spezifischen IgA- und IgG-Antikörpern beobachtet. Es wird vermutet, dass sIgA-Antikörper einer lokalen Abwehr dienen, während systemisch zirkulierende Antikörper unter anderem Virus-Replikationen eindämmen und vor einer klinischen Manifestation schützen (115, 116).

In den letzten Jahren konnten umfangreiche Kenntnisse und Zusammenhänge des mukosalen Immunsystems erworben werden. Dabei wird die Verbesserung und Entwicklung von mukosalen Impfstoffen zunehmend angestrebt (117). Die Induktion einer lokalen Immunität durch Impfstoffe benötigt meist eine direkte mukosale Antigen-Exposition, wobei die Bildung von protektiven Antikörpern in der Mukosa und im Serum sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses erzielt werden (56, 116). Als mukosale Impfstoffe stehen attenuierte Lebend-Impfstoffe sowie Tot-Impfstoffe zur Verfügung, wobei für letzteres ein effektives Adjuvans benötigt wird.

### 1.4.1 Oral verabreichte mukosale Vakzine

Die Entwicklung von oralen Impfstoffen gestaltet sich aufgrund der intestinalen Gegebenheiten als besonders schwierig. Dabei sind im Darm insbesondere der Zerfall der Epitope löslicher Antigene sowie die Ausbildung der oralen Toleranz verantwortlich (56).

Orale Vakzine werden in der Humanmedizin sowohl in Entwicklungsländern als auch in höher entwickelten Ländern erfolgreich eingesetzt. Die immunogene Wirksamkeit der Impfstoffe wird dabei von zahlreichen regionalen Unterschieden, wie z.B. Mikroflora und Ernährung eines Menschen, beeinflusst (56, 118). Für das Erreichen einer effektiven mukosalen Immunität spielen weiterhin die gewählte Antigenosis, die Art des Impfstoffes und das Zeitintervall der Wiederholungsimmunisierung eine wichtige Rolle.

Einen Überblick über derzeit in Deutschland lizenzierte orale Vakzine der Humanmedizin gibt die folgende Tabelle. Diese Schluckimpfungen werden zumeist 2 bis 3-mal verabreicht und bewirken in der Regel einen über mehrere Jahre wirksamen Infektionsschutz gegen den jeweiligen Erreger bzw. das Toxin.

Tab. 1: Lizenzierte orale Impfstoffe der Humanmedizin (Stand: Feb. 2013 PEI, Deutschland).

Vakzin	Marktname (Hersteller)	Impfstoffart
<b>Rotavirus</b>	<i>RotaTeq (Sanofi Pasteur MSD); Rotarix (GlaxoSmithKline)</i>	<i>Monovalenter, attenuierter Lebendimpfstoff</i>
<b>Poliovirus</b>	<i>diverse Polio-Sabin S (GlaxoSmithKline)</i>	<i>attenuierter Lebendimpfstoff</i>
<b>Salmonella typhi</b>	<i>Typhoral-L Kapseln (Novartis)</i>	<i>Monovalenter, attenuierter Lebendimpfstoff</i>
<b>Cholera</b>	<i>Dukoral (SBL Vaccin AB)</i>	<i>Inaktivierte <i>Vibrio cholerae</i> Bakterien (Serotyp O1 mit CT-B)</i>

In der vorliegenden Arbeit wird zur Stimulation des Darmimmunsystems der Mäuse unter anderem das Toxin der Bakterien der *Vibrio cholerae* verwendet.

Cholera kann neben einer meist milden Symptomatik beim Menschen auch zu starkem Erbrechen und schweren, reiswasserartigem Durchfall führen. Aufgrund des großen Flüssigkeits- und Elektrolytverlust kommt es schnell zu einer Exsikkose. Eine Übertragung des Erregers erfolgt hauptsächlich über fäkalienerunreinigtes Trinkwasser, was insbesondere in Ländern ohne hygienisch getrennten Wasser- und Abwassersystemen wie z.B. in Afrika und Südamerika eine Infektionsgefahr darstellt. Seit dem 19. Jahrhundert traten weltweit immer wieder Cholera-Epidemien mit zahlreichen Todesfällen auf.

Der Cholera-Impfstoff, ein Gemisch aus abgetöteten Bakterien der *Vibrio cholerae* und dem Cholera-toxinbestandteil B, bietet einen lokalen Schutz für ca. 6–9 Monate in der Darmschleimhaut. Induzierte Gedächtniszellen sowie ein stabiler Serumtiter können jedoch über mehrere Jahre bestehen und den Organismus schützen (56).

Auf den Aufbau und die Wirkung des Holotoxins sowie dessen etablierter Einsatz im Rahmen der tierexperimentellen Grundlagenforschung wird im folgenden Kapitel näher eingegangen (Kap. 1.5).

Auch in der Veterinärmedizin werden diverse orale Impfstoffe z.B. als Impfkapsel im Köder mit enthaltenden Lockstoffen (Fuchs / Wildschweine) oder über das Trinkwasser (Geflügel) verabreicht bzw. als Tauchvakzine bei Fischen eingesetzt. Darüber hinaus werden bestandsspezifische Impfstoffe eingesetzt, die z.B. bei Vorliegen von Mischinfektionen nach Analyse von Probenmaterial eines Bestandes spezifisch hergestellt werden.

Damit sind effektive orale Immunisierungen insbesondere zur systematischen Bekämpfung von Tierseuchen von Bedeutung und dienen dem Infektionsschutz von Tier und Mensch. In der nachfolgenden Tabelle ist der Einsatz von oralen Vakzinen bei den verschiedenen Tierarten und Krankheiten dokumentiert.

**Tab. 2: Orale Impfstoffe der Veterinärmedizin**

<b>Tierart</b>	<b>Erkrankung</b>
<b>Wildtiere (Füchse, Wildschweine)</b>	<i>Tollwut; Klassische Schweinepest</i>
<b>Hühner</b>	<i>Infektiöse Laryngotracheitis; Salmonellosen; Aviäre Encephalomyelitis; Infektiöse Bronchitis; Newcastle Disease; Infektiöse Bursitis; Kokzidiosen; Pocken</i>
<b>Puten</b>	<i>Aviäre Rhinotracheitis; Hämorrhagische Enteritis; Newcastle Disease</i>
<b>Gänse und Enten</b>	<i>Salmonellosen</i>
<b>Rinder inkl. Kälber; Schweine</b>	<i>Samonellosen</i>
<b>Fische</b>	<i>Virale Hämorrhagische Septikämie; Rotmaulseuche</i>

### 1.5 Das Cholera toxin

Das Cholera toxin (CT) wird von den stäbchenförmigen gram- Bakterien *Vibrio cholerae* produziert. Robert Koch entdeckte das Toxin bereits 1886. Das toxische Protein besteht aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe, welche einzeln keine toxischen Eigenschaften besitzen (119). Die Untereinheit A (CT-A) ist ein Heterodimer und besteht aus den zwei Fragmenten CT-A1 und CT-A2, welche über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. CT-A ist in ein Homopentamer aus fünf identischen B-Untereinheiten (CT-B) eingelagert. Das Fragment CT-A2 verbindet die A- und die B-Untereinheit miteinander.

Das Toxin bindet im Darmlumen mit seiner CT-B-Untereinheit hochaffin an den Gangliosid-Rezeptor GM1 der Darmepithelzellen (120, 121). Anschließend erfolgen die Internalisierung sowie ein retrograder Transport des Toxins in das endoplasmatische Retikulum, wo es in seine beiden Untereinheiten dissoziiert (122). CT-A1 gelangt in das Zytosol der Zelle und induziert dort durch eine ADP-Ribosylierungsreaktion (ADP – *Adenosindiphosphat*) die permanente Aktivierung des G<sub>s</sub>-Proteins mit folgender dauerhafter Stimulation der Adenylatcyclase (123). Dies führt zu einem Anstieg von intrazellulären cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), woraus eine Imbalance des Elektrolythaushalts der Zelle mit nachfolgendem Wasserverlust in das Darmlumen (Diarrhoe) resultiert (122). Die CT-B-Untereinheit zeigt darüber hinaus immunogene Eigenschaften, wodurch während der Immunreaktion Plasmazellen generiert werden, welche protektive Toxin-spezifische Antikörper bilden.

Es ist bekannt, dass alle nukleären Zellen des Körpers den GM1-Rezeptor aufweisen und folglich CT binden. Daraus resultiert ein physiologisch hoher Hintergrund innerhalb der Zellfärbung, welcher die eindeutige Identifikation CT-spezifischer Plasmazellen erschwert. CT ist jedoch neben seiner potenten Wirkung als Immunogen bei Mensch und Maus (124) bereits in zahlreichen Studien erfolgreich als starkes Adjuvans für diverse ko-verabreichte Antigene beschrieben worden (125). Dabei induziert CT eine spezifische Immunreaktion gegen seine CT-B-Untereinheit sowie gegen das gleichzeitig oral verabreichte Antigen (126).

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften hat sich sein Einsatz für die Erforschung der dynamischen Prozesse des mukosalen Immunsystems etabliert. Neben dem Einsatz von CT zur Induktion einer mukosalen Immunantwort, erfolgt oft die Untersuchung der mukosalen Immunreaktion anhand von ko-Antigen-spezifischen Plasmazellen (127, 128).

CT zählt bis heute zu den stärksten und meist untersuchten Adjuvanzen (116). Die genauen Mechanismen der Adjuvans-Wirkung sind bisher nicht bekannt, wobei verschiedene Ansätze diskutiert werden: Erhöhung der Permeabilität des Darmepithels mit höherer Antigen-Aufnahme, Verbesserung der Antigen-Präsentation, Stimulation des Klassenwechsels zu IgA sowie der Einfluss auf T-Zellen und die Sekretion von Chemokinen (129). Die genaue Applikation von CT in den hier durchgeführten Experimenten wird im Kap. 3.7.2 beschrieben.

## **2 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die im Verlauf einer systemischen Immunantwort in den sekundären Lymphorganen entstehenden Plasmablasten migrieren insbesondere nach einer Sekundärreaktion in das Knochenmark. Nach ihrer terminalen Differenzierung zu Plasmazellen, kann ein Teil von ihnen in speziellen Überlebensnischen langlebig werden und durch die Produktion von Antikörpern einen stabilen, protektiven Serumtiter über mehrere Jahre aufrecht erhalten. Plasmazellen bilden folglich einen wichtigen Teil des humoralen Immunsystems. Obwohl die Lamina propria des Dünndarms einen Großteil aller Plasmazellen des gesamten Körpers beherbergt, liegen dennoch bisher keine Informationen vor, ob diese intestinalen Plasmazellen langlebig werden können. Ebenso ist bisher nicht bekannt, ob mukosal induzierte Plasmazellen ähnlich einer systemischen Immunreaktion im Knochenmark zum langlebigen Plasmazellkompartiment beitragen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten von spezifischen Plasmazellen analysiert, welche im Rahmen einer mukosalen Immunreaktion generiert wurden. Dabei wurde zum einen untersucht, ob Plasmazellen in der Lamina propria, ähnlich wie im Knochenmark, langlebig werden können und demzufolge das Nischenkonzept auf den Darm ausgeweitet werden kann. Zum anderen wurde erstmalig analysiert, ob diese mukosal induzierten spezifischen Plasmazellen im Knochenmark über einen längeren Zeitraum ohne Proliferation überleben können. Weiterhin wurde die Frage adressiert, ob der Isotyp einen Einfluss ausübt auf die Lebensspanne der Plasmazellen im Knochenmark.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der mukosalen Wirkung von Antigenen sowie der Möglichkeit eines stabilen Langzeitschutzes über den oralen Weg leisten und helfen zu verstehen, wie das systemische und mukosale Immunsystem miteinander interagieren. Die Bildung von langlebigen Plasmazellen nach einer mukosalen Immunreaktion ist für die zukünftige Entwicklung von oralen Vakzinen und Impfstrategien, sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin, aber auch für therapeutische Ansätze zur Behandlung von autoimmunen Erkrankungen von erheblicher Bedeutung.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Medien und Puffer

Tab. 3: Medien und Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Bezugsquelle
PBS pH 7,2 (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck Merck Merck Merck
PBS/BSA pH 7,2 (bovine serum albumin)	PBS 0,5% BSA	PAA Laboratories
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640 Medium 10% FCS (fetal calf serum)	Life Technologies Sigma-Aldrich
Erythrozyten-Lysis-Puffer pH 7,2	140 mM NH <sub>4</sub> Cl 17 mM Tris	Merck Roth
ELISpot- Blockierungspuffer	RPMI 1640 Medium 10% FCS (fetal calf serum)	Life Technologies Sigma-Aldrich
ELISpot-Waschpuffer	PBS 0,01% Tween-20	Sigma-Aldrich
Gewebe-Fixierlösung Formaldehyd 4% bzw. 1%	10 ml Formaldehyd (20%) 40 ml PBS bzw. 190 ml PBS	Science Services
Saccharose-Lösung 10%, 20% und 30%	100 ml PBS 10 g, 20 g bzw. 30 g Saccharose	Roth
Einbettmedium	OCT-Medium (Optimum cutting temperature)	Sakura
	4% CMC-Medium (Carboxymethylcellulose)	Section Lab
Histologie Wasch- und Färbepuffer	PBS 1% BSA (Darm) bzw. 5%FCS (Knochen) 0,01% Tween	PAA Laboratories Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit		BD

### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 4: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
OVA ( <i>Ovalbumin</i> )	Sigma-Aldrich
CT ( <i>Choleratoxin</i> )	List Biological Laboratories, Inc.
EdU ( <i>Ethynyldeoxyuridin</i> )	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
NaCl ( <i>Natriumchlorid</i> )	Fresenius Kabi
Aceton	Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
2-Methylbutan 95%	Sigma-Aldrich
Hexan	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Kollagenase D	Roche
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich
Prolong Gold antifade reagent	Invitrogen
ALP2-Kit cobas® für ELISA	Roche/Hitachi
AP BCIP/NBT Substrat für ELISpot ( <i>5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate / nitroblue tetrazolium</i> )	Gene Tex

### 3.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Objektträger Superfrost Plus	VWR
Deckgläschen 24 x 60 mm	Roth
Super Pap Pen	Invitrogen
Trockeneis	Linde AG
Einbetttschälchen	Lab Shop

### 3.4 Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Die Antikörper wurden von den angegebenen Herstellern erworben bzw. im DRFZ, Berlin, mittels der Hybridom-Technik hergestellt und Fluorochrom-markiert. Nicht-fluoreszente Antikörper oder Proteine wurden teilweise im DRFZ an ein Fluorochrom gekoppelt.

Tab. 6: Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Klon, Spezies	Fluorochrom	Bezugsquelle
B220	RA3.6B2, Ratte	PE, A594	DRFZ, Berlin
kappa leichte Kette	187.1, Ratte	FITC, Pacific Blue	DRFZ, Berlin
CD45.2	104, Maus	APC	eBioscience
IgA	Polyklonal, Ziege	Pacific Orange, Biotin	Southern Biotech, (gekoppelt im DRFZ)
IgA	11-44-2, Ratte	Pacific Blue	Southern Biotech, (gekoppelt im DRFZ)
OVA		Pacific Blue, A594	Sigma-Aldrich, (gekoppelt im DRFZ)
IgG <sub>1</sub>	A85-1, Ratte	Biotin	BD
Streptavidin		PE, A555, A594	Invitrogen
Streptavidin		PacBlue	Southern Biotech (gekoppelt im DRFZ)
DAPI (4',6-Diamin-2-Phenylindol)			Invitrogen
Sytox Green			Invitrogen
FcγR (CD16/CD32)	2.4G2, Ratte		DRFZ, Berlin
eFluor 780			eBioscience
MBP ( <i>major basic protein</i> )	MT-14.7, Ratte	A546	Laboratory J.J. Lee
APRIL (CD256)	A3D8, armen. Hamster	ungekoppelt	BioLegend
Isotypkontrolle Armen. Hamster	HTK888, armen. Hamster	ungekoppelt	BioLegend
armen. Hamster	Polyklonal, Ziege	DyLight™ A594	BioLegend
Laminin	Polyklonal, Kaninchen		Sigma-Aldrich

Kaninchen IgG	Polyklonal, Ziege	A555, A647	Invitrogen
CD4	GK1.5, Ratte	A546, A594, Cy5	DRFZ, Berlin
Ratten-, Ziegenserum			Invitrogen
Click-iT® EdU Imaging Kit		A647, A555	Invitrogen

### 3.5 Antikörper für ELISpot und ELISA

Tab. 7: Antikörper für ELISpot und ELISA

Spezifität	Klon, Spezies	Fluorochrom	Bezugsquelle
IgA	Polyklonal, Ziege	Biotin	Southern Biotech
IgG	Polyklonal, Ziege	Biotin	Southern Biotech
IgM	Polyklonal, Ziege	Biotin	Southern Biotech
SA-AP ( <i>Streptavidin- Alkalische Phosphatase</i> )			Sigma-Aldrich

### 3.6 Geräte

Tab. 8: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Sterile Werkbank (Laborabzug)	Heraeus
Zentrifuge	Heraeus
Brutschrank	Heraeus
Kryostat Microm HM 560	Thermo Scientific
Durchflusszytometer MACS Quant	Miltenyi Biotech
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Bioscience
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop 710	Zeiss
ELISA Reader Spectra max Plus	Molecular Devices
ELISpot Reader AID	AID GmbH

### 3.7 Versuchstiere und Behandlungen

#### 3.7.1 Verwendete Mäuse und Tierhaltung

Die Aufzucht und Haltung der Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 erfolgte im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin-Marienfelde unter pathogenfreien Bedingungen (SPF – *specific pathogen free*). Darüber hinaus wurden Mäuse dieses Stammes von der Firma Charles River bezogen. Auch wurden einige Blimp-1<sup>gfp/-</sup>-Reportermause (C57BL/6 Hintergrund) verwendet. Während der Experimente erfolgte die Haltung der Tiere in der Versuchstierhaltung des DRFZ Berlin. Es wurden gesunde, männliche und weibliche Mäusen im Alter von 7 bis 13 Wochen verwendet. Eiweißfreies, autoklaviertes Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

#### 3.7.2 Die orale Immunisierung mittels Magensonde

Zur Stimulation des mukosalen Immunsystems wurden die Mäuse oral immunisiert. Die verwendeten Lösungen wurden dabei mit einer metallischen, gebogenen Knopfkanüle und einer 1 ml-Spritze vorsichtig über die Speiseröhre direkt in den Magen platziert. Als erstes erfolgte eine Neutralisierung der Magensäure durch die Verabreichung einer 50%- gesättigten Natriumbikarbonat-Lösung, um eine pH-bedingte Zerstörung der verwendeten Substanzen zu vermeiden. Nach 15 min wurde die Antigenlösung gleichermaßen appliziert. Zur Immunisierung wurden 100 mg Ovalbumin (OVA) und 10 µg Cholera toxin (CT) allein oder als Gemisch in 200 µl sterilem PBS verwendet.

#### 3.7.3 Die Behandlung mit EdU zur Analyse der Zellproliferation

Die Analyse der Proliferation von Plasmazellen erfolgte durch den Einbau von EdU (*Ethynyldeoxyuridin*) in die DNA. EdU ist ein Analogon des Nucleosides Thymidin und wird während der S-Phase der Mitose in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Nach einer chemischen Kupfer(I)-katalysierten Reaktion zwischen Fluorochrom und EdU fluoreszieren EdU-haltige Zellkerne in der jeweiligen Wellenlänge des gebundenen Farbstoffes. Die Detektion ist mittels der Durchflusszytometrie sowie immunhistologisch möglich.

Die Verabreichung von EdU erfolgte oral kontinuierlich über einen Zeitraum von 12 Tagen. Die Tagesdosis betrug pro Tier zwischen 1,5 und 2,5 mg und wurde täglich frisch in Form einer Agaroseportion in den Käfig gegeben. Die orale Aufnahme wurde täglich kontrolliert. Für die Herstellung dieser Agaroseportionen wurde eine 0,8%-ige Agaroselösung (Agarose in NaCl) nach kurzem Aufkochen auf 38 °C abgekühlt und in noch flüssiger Form in ca. 5 ml portioniert. Jeder Portion wurde eine Tagesdosis EdU beigemischt und bei 4 °C erhärtet. Zur besseren Aufnahme wurde der Agarose 4% Glukose beigefügt.

## 3.8 Zellpräparationen

### 3.8.1 Isolierung von Lymphozyten aus Milz und Knochenmark

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Lymphozyten der Milz wurden durch Zerkleinerung und Homogenisierung durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gewonnen. Zur Gewinnung der Lymphozyten aus dem Knochenmark wurde nach Abtrennung der Knochenenden von Tibia und Femur das Mark mit PBS/BSA heraus gespült. Eine Einzelzellsuspension wurde in PBS/BSA mit Hilfe eines Zellsiebes (Porengröße 70 µm) hergestellt.

Die Zellsuspensionen beider Organe wurden mit 4 °C kaltem PBS/BSA gewaschen und zentrifugiert (8 min, 300 x g, 4 °C). Eine Entfernung der Erythrozyten erfolgte durch eine Inkubation mit dem Erythrozyten-Lyse-Puffer (4 min, 4 ml, bei Raumtemperatur). Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS/BSA abgestoppt. Nach einer weiteren Zentrifugation, wurden die Zellen in PBS/BSA aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

### 3.8.2 Isolierung der Lymphozyten aus Dünndarm und Lymphknoten

Der Dünndarm wurde ca. 0,5 cm nach dem Magenausgang bis zum Übergang zum Blinddarm entnommen. Die mesenterialen Lymphknoten sowie die Peyer`schen Plaques wurden entnommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Nach Ausstreichen des Darminhaltes wurde das Darmrohr der Länge nach eröffnet und in ca. 5 cm lange Stücke zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in 40 ml RPMI für 30 min bei 37 °C durch kontinuierliches Rühren bzw. Schütteln gewaschen und somit von Mukus befreit. Nach Herausschütteln der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) wurde das Darmgewebe mit RPMI gewaschen. Die Gewebestücke wurden weiter zerkleinert und anschließend enzymatisch behandelt. Der Verdau erfolgte mit den Kollagenasen D (0,12 U/ml) und VIII (206 U/ml) in RPMI für 2 x 15 min bei 37 °C und unter ständigem Rühren. Dieser Prozess diente der Zersetzung von Bindegewebe und folglich Freisetzung der mukosalen Zellen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 °C kaltem RPMI bzw. EDTA abgestoppt. Nach jedem enzymatischen Schritt wurden die gewonnenen Zellen zentrifugiert und in enzymfreien RPMI aufgenommen. Anschließend wurden die Zellfraktionen eines Tieres zusammengeführt und nach Eliminierung grober Partikel mit Hilfe eines Zellsiebes (Porengröße 70 µm) unter Kühlung auf Eis bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Da eine Dichtezentrifugation zu einem hohen Verlust der Plasmazellen führt (130, 131), wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet.

Die Lymphozyten aus den Peyer`schen Plaques sowie den mesenterialen Lymphknoten wurden mit Hilfe eines Zellsiebes (Porengröße 70 µm) gewonnen und nach Zentrifugation (8 min, 300 x g, 4 °C) der Einzelzellsuspensionen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

### 3.9 Durchflusszytometrische Analyse der Plasmazellen

#### 3.9.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Analyse sowie molekulare Charakterisierung von Einzelzellen anhand ihrer Größe, Granularität sowie Fluoreszenz. Die Zellen werden hierfür i.d.R. mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt und durchlaufen in einem Flüssigkeitsstrom verschiedene Laser. Während dieser Passage führt der Laserstrahl zu einer Streuung von Licht durch jede einzelne Zelle und zum anderen zu einer Anregung der spezifisch gebundenen Fluorochrome. Die daraus resultierenden multiparametrischen Daten werden als Streu- und Fluoreszenzsignale über Photomultiplier (PMT) detektiert, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Anschließend werden die elektrischen Signale digitalisiert und gespeichert.

Beim Streulicht werden das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) wird in einem engen Winkel zum auftreffenden Laserlicht gemessen und ist ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) entspricht der bei 90° detektierten Lichtstreuung und wird von der Granularität der Zellen beeinflusst. Durch die unterschiedliche Lichtstreuung können verschiedene Zellpopulationen voneinander differenziert werden. Der Laserstrahl führt darüber hinaus zu einer Anregung der zellgebundenen Fluorochrome, deren Fluoreszenz in einem rechten Winkel detektiert wird. Zellen können im Rahmen eines Färbeprozesses mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder Proteinen behandelt werden, welche sie spezifisch binden (Kap. 4.1.2). Die Emissionsspektren der angeregten Farbstoffe werden durch Band- bzw. Langpassfilter optisch voneinander getrennt und nach Detektion durch die PMT in elektrische Signale umgewandelt und digitalisiert. Die Anzahl der simultan messbaren Merkmale der Zellen wird durch die Anzahl der Laser unterschiedlicher Wellenlängen und die Detektionsfilter des Durchflusszytometers limitiert.

In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer Canto II (Becton Dickinson) verwendet, welches über 3 Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen verfügt: 488nm (blau), 633nm (rot) und 405nm (violett). Dieses Gerät detektiert Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie 9 Fluoreszenzen. Ein Überblick über die verwendeten Fluorochrome sowie Laser und Filterkonfigurationen des FACS Canto II werden in der Tab. 9 dargestellt. Für die Auswertung der Daten wurde die FlowJo Tree Star Software verwendet.

Tab. 9: FACS Canto II: Filterkonfigurationen und verwendete Fluorochrome

Laser	Detektor	Langpass	Bandpass	Fluorochrom
blauer Laser (488nm)	F	-	488/10	SSC
	E	502	530/30	FITC, A488
	D	556	585/42	PE
	C	610	-	-
	B	655	670LP	-
	A	735	780/60	-
roter Laser (633nm)	C	-	660/20	APC, Cy5, A647
	B	685	-	-
	A	735	780/60	eFluor780
violetter Laser (405nm)	B	-	450/50	Pacific Blue
	A	502	510/50	Pacific Orange

### 3.9.2 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen

Für die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmolekülen wurden die lebenden Zellen mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten in 4 °C kaltem PBS/BSA auf Eis und lichtgeschützt gefärbt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit ungekoppelten anti-Fc $\gamma$ -Antikörper inkubiert (15 min, 4 °C). Nach Entfernung der überschüssigen Antikörper durch Zentrifugation und Waschen mit PBS/BSA wurde das Zellpellet je nach Organ in 50 – 250  $\mu$ l Färbelösung mit den Farbstoff-markierten Antikörpern aufgenommen und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die geeignete Konzentration der Antikörper wurde im Rahmen von Vorexperimenten getestet. Durch weiteres Waschen mit PBS/BSA wurden die überschüssigen Antikörper entfernt. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 300 – 500  $\mu$ l PBS/BSA aufgenommen. Es wurden in dieser Arbeit für die Färbung von Oberflächenmolekülen nur direkt Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, wodurch ein zweiter Färbeschritt mit sekundären Antikörpern nicht notwendig war.

Für die Markierung von toten Zellen wurden entweder DAPI (*4',6-Diamin-2-Phenylindol*) oder der fixierbare Farbstoff eFluor 780 verwendet. Beide Farbstoffe können über die geschädigte Membran in die toten Zellen eindringen und diese somit markieren. Dadurch können tote Zellen spezifisch von der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen werden.

Dafür wurde DAPI unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung in die Zellsuspensionen hinzugegeben. Zu fixierende Zellen wurden für 15 min bei 4 °C mit dem fixierbaren eFluor 780 (2  $\mu$ l/ml) inkubiert und nach einem Waschschrift fixiert.

### 3.9.3 Zellfixierung und Fluoreszenzmarkierung von intrazellulären Molekülen

Für die Färbung der intrazellulär akkumulierten Immunglobuline der Plasmazellen wurden die Zellen fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Zellfixierung erfolgte durch eine Inkubation mit einer 4 %-igen Formaldehydlösung (20 min, 4 °C). Nach Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen durch Inkubation in einer Saponin-Lösung permeabilisiert. Saponine führen durch Einlagerung in die Phospholipiddoppelschicht zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran, wodurch die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper in die Zelle diffundieren und an intrazelluläre Immunglobuline binden können. Da der Vorgang reversibel ist, wurden die nachfolgenden Wasch- und Färbeschritte in dieser Saponinlösung durchgeführt. Ähnlich der Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen (Kap.3.9.2) wurden die Zellen mit den primären Antikörperlösungen sowie dem Fluorochrom-gekoppelten OVA inkubiert (10 – 15 min, 4 °C) und anschließend gewaschen. Bei dem Einsatz von biotinylierten Antikörpern folgte eine weitere Inkubation mit dem sekundären Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat. Die erneut gewaschenen Zellen wurden für die durchflusszytometrische Untersuchung in 300 – 500 µl PBS/BSA aufgenommen.

### 3.9.4 Fluoreszenzmarkierung von intranukleären EdU

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen auf ihre EdU-Inkorporation in die DNA, wurden die Zellen nach Herstellerangaben im Rahmen einer Kupfer(I)-katalysierten chemischen Reaktionslösung behandelt. Vorab wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend organabhängig in 100 – 500 µl dieser Färbelösung aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Eine enzymatische Vorbehandlung der Zellen für die Aufspaltung der DNA in ihre Einzelstränge ist für den Ablauf der chemischen Reaktion mit dem eingebauten EdU nicht notwendig. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen.

Die Markierung des intranukleären EdU erfolgte nach den intrazellulären Färbungen, wobei Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) aufgrund von Kompatibilitätsstörungen mit der EdU-Reaktionslösung erst nach der EdU-Färbung eingesetzt wurde.

### 3.9.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl der lebenden Lymphozyten erfolgte durchflusszytometrisch durch den MACS Quant. Die Zellen wurden auf die Expression des membranständigen Lymphozytenmarkers CD45.2 sowie durch Zugabe von DAPI gefärbt (Kap.3.9.2). Die durchflusszytometrische Analyse eines bekannten Volumens ermöglichte die Ermittlung der Zahl der isolierten, lebenden Lymphozyten.

### 3.10 Histologische Untersuchung von Gewebeschnitten

Aufgrund gewebespezifischer Unterschiede in den Eigenschaften von Darm und Knochen unterscheidet sich das Vorgehen beim Fixieren, Einfrieren sowie Anfertigen der Gewebeschnitte.

#### 3.10.1 Einfrieren von Darmgewebe

Bei der Entnahme des Dünndarmes aus der Bauchhöhle wurde mit einer Pinzette das Gekröse inklusive des Fettgewebes sorgfältig entfernt. Für die histologischen Untersuchungen wurden ca. 1,5 cm des duodenalen bzw. jejunalen Darmrohres möglichst mit enthaltenem Peyer'schen Plaque herausgeschnitten. Kotreste sowie Mukus und Enzyme wurden durch Ausstreichen mittels einer abgerundeten Pinzette und Spülen des Darmlumens mit 4 °C kaltem RPMI entfernt. Anschließend wurde das einzufrierende Darmstück äußerlich mit einem Tuch gründlich abgetrocknet. Mit Hilfe einer 5 ml-Spritze wurde das Darmlumen mit OCT-Einbettmedium aufgefüllt und anschließend das gesamte Gewebestück in ein Gewebeschälchen in OCT-Medium eingebettet. Das Einfrieren des Schälchens mit dem enthaltenen Gewebestück erfolgt in einem Kunststoffbecher mit 2-Methylbutan auf Trockeneis, wobei ein vollständiges Eintauchen vermieden wurde. Auf das Trockeneis wurde für die Temperaturübertragung 95%-iges Ethanol gegeben. Nach ca. 5 min konnte anhand einer vollständigen Weißfärbung des Mediums der abgeschlossene Gefrierprozess festgestellt werden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die eingefrorenen Gewebestücke in Frischhaltefolie sowie Alufolie eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 bzw. -80 °C gelagert.

#### 3.10.2 Anfertigen von Gewebeschnitten des Darmes und Fixierung

Von dem Darmgewebe wurde bei -17 °C an einem Kryostat 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Nach der Aufnahme auf Objektträger (SuperFrost Plus) trocknete das Gewebe kurz und wurde anschließend für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Nach erneuter Lufttrocknung wurden die Objektträger lichtgeschützt in Objektträgerboxen bis zu weiteren Verwendung bei -20 bzw. -80 °C gelagert.

#### 3.10.3 Fixierung und Einfrieren von Knochen

Für die histologische Untersuchung des Knochenmarks wurde pro Tier ein Femur entnommen. Nach seiner Entnahme wurde dieser mit einem trockenen Tuch gründlich gesäubert und für 4-6 Stunden in einer 4%-igen PFA-Lösung fixiert. Im Anschluss wurde der Knochen zur Entwässerung in Saccharose-Lösungen mit aufsteigender Konzentration (10%, 20% und 30% in PBS) für jeweils 24 Stunden aufbewahrt. Der sorgfältig abgetrocknete Femur wurde ohne vorherige Dekalzifizierung in Anlehnung an die Methode nach Kawamoto eingefroren

(132). Als Einfriersystem diente ein Kunststoffbecher mit kaltem Hexan, welcher zur Kälteübertragung in eine mit Trockeneis und Aceton gefüllte Schale gestellt wurde.

Ein kleiner Metallcontainer in Form eines Löffels wurde mit 4%-igem CMC befüllt und darin der einzufrierende Knochen mit einer Pinzette mittig platziert. Anschließend wurde der Probencontainer zum Gefrieren für ca. 30 sek zunächst unvollständig in das Hexan eingetaucht, wobei der Gefrierprozess anhand einer weißlichen Trübung des CMCs am Rand des Blocks bis zu 1-2 mm abgewartet wurde. Erst dann erfolgte ein vollständiges Eintauchen und Gefrieren für ca. 2 min. Mittels eines Gummihammers wurde der gefrorenen Gewebblock aus dem Probencontainer gelöst und nach Umhüllung mit Frischhaltefolie und Alufolie bei -20 bzw. -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.10.4 Anfertigen von Kryoschnitten des Knochens**

Auch das Anfertigen der Gewebeschnitte der Knochen erfolgte nach der Methode nach Kawamoto. Dabei wurden spezielle adhäsive Folien verwendet, welche für hartes Gewebe, wie Knochen ohne vorherige Dekalzifizierung oder z.B. Zähnen, geeignet sind und für Immunfluoreszenzfärbungen eine intakte Gewebestruktur erhalten (132). Diese Folien sind farblos, transparent und besitzen keine Eigenfluoreszenz. Der zu schneidende Gewebblock wurde zunächst für ca. 30 min für eine Temperaturangleichung in das auf -20 °C temperierten Kryostat gelegt. Eine Befestigung erfolgte auf der Probenplattform mit CMC. Anschließend wurde ein Stück Folie von geeigneter Größe auf die Schnittfläche des Gewebblocks gelegt und angedrückt. Für das Schneiden wurde ein Messer aus dem Wolframkarbid verwendet, welches insbesondere für harte Gewebe geeignet ist. Langsam und gleichmäßig wurde der Gewebeschnitt durchgeführt und mit der Folie auf einen Objektträger aufgenommen. Nach Lufttrocknen wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20 bzw. -80 °C in Objektträgerboxen gelagert.

### **3.10.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten**

Das Anfärben der Gewebeschnitte von Darm und Knochenmark wurde in einer lichtgeschützten, angefeuchteten Färbekammer durchgeführt. Die Objektträger wurden darin waagrecht aufgebettet und durch Auftragen von Wasch- und Färbelösungen behandelt. Nach kurzem Auftauen bei Raumtemperatur wurde zum Schutz vor Abfließen der Färbelösungen um das Gewebe eine wasserabweisende Grenze mit einem Wachsstift (PAP-Pen) aufgetragen. Nach 10 min Trocknen dieser Wachsumgrenzung wurde das Gewebe durch Umspülen mit PBS für ca. 20 min rehydriert. Aufgrund gewebespezifischer Unterschiede wurden für Darm und Knochen unterschiedliche Wasch- und Färbelösungen verwendet (Darm: 3% BSA, 0,1% Tween in PBS, Knochenmark: 5% FCS, 0,1% Tween in PBS).

Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte mit 10%-igem Serum in gewebespezifischer Waschlösung für 20 min behandelt. Dabei wurden, je nach Herkunft der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, verschiedene Sera tierischer Herkunft verwendet. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in einer durch Titration ermittelten optimalen Konzentration. Jeder Färbeschritt umfasste eine Inkubation für je 45–60 min bei Raumtemperatur, wobei die überschüssigen Antikörper durch dreimaliges Waschen für je 10 min gründlich entfernt wurden. Die farbliche Markierung des intranukleären EdU auf Gewebeschnitten erfolgte durch Inkubation mit einer Kupfer(I)-katalysierten chemischen Reaktionslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Überschüssige Reaktionslösung wurde im Anschluss durch Waschen entfernt.

Bei Bedarf wurden für das Anfärben der Zellkerne die Gewebe mit DAPI bzw. Sytox Green für ca. 5–10 min inkubiert. Zum Abschluss wurden die Objektträger erneut mit der Waschlösung (3 x 10 min) sowie durch Umspülen mit frischem PBS (2 x 10 min) gewaschen. Nach einer kurzen Trocknung wurden auf die Gewebeschnitte ein Tropfen Eindeckmedium (Prolong Gold) gegeben und ein Deckgläschen gelegt. Die Aufbewahrung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte bis zur mikroskopischen Untersuchung in Objektträgermappen lichtgeschützt bei 4 °C.

### **3.10.6 Prinzip der konfokalen Mikroskopie**

Die Aufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte wurden an dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop 710 der Firma Zeiss durchgeführt. Für die Anregung der verwendeten Fluorochrome wurden folgende Laser der verschiedenen Wellenlängen genutzt: 405, 488, 514, 561, 594 und 633 nm. Flexibel einstellbare Bandpass-Filter ermöglichten eine Trennung der Emissionssignale. Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) ermöglicht hauptsächlich die graphische Darstellung von Fluoreszenz-markierten Strukturen eines Gewebes.

Das Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge, dessen Strahl durch eine Linse fokussiert wird, gelangt punktuell auf das zu untersuchende Gewebe und führt zu einer Anregung der Fluorochrome. Die emittierten langwelligen Fluoreszenzsignale werden durch eine zweite Linse gebündelt und durch Vorschaltung einer Lochblende werden nur direkt auftreffende Strahlen von einem PMT detektiert. Durch dieses optische System befinden sich die Foki der Lichtausstrahlung und der Lichtdetektion in einer gemeinsamen Ebene und sind folglich „ko-fokussiert“ („konfokal“). Streulicht bzw. Lichtsignale, welche außerhalb der Fokusebene entstehen, gelangen nicht durch die Lochblende und werden von dem Detektor nicht erfasst. Daraus resultiert im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie eine Einengung des axialen Fokuspunktes mit dadurch deutlicher Verbesserung der axialen Auflösung, d.h. Tiefenschärfe, sowie lateraler Auflösung bei gleichzeitig verminderter Bildunschärfe. Ein bewegliches Spiegelsystem leitet den Laserstrahl rasterartig Punkt-für-Punkt auf die Fokusebene,

wodurch ein optischer Schnitt in Horizontalebene entsteht und eine zweidimensionale Analyse des Gewebes ermöglicht wird. Durch zusätzliche Bewegung des Gewebetisches können mehrere optische Ebenen als Bildstapel zusammengefügt werden, welche Informationen über die dreidimensionale Struktur des Gewebes des untersuchten Ausschnittes geben. Die detektierten Signale unterschiedlicher Helligkeit werden digital als Bildpunkte gespeichert und graphisch dargestellt.

### 3.11 Quantifizierung der Antigen-spezifischen Plasmazellen

#### 3.11.1 Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode

Die OVA- bzw. CT-spezifischen Plasmazellen wurden mittels der ELISpot-Methode (*Enzyme-Linked Immuno-Spot*) quantifiziert. Dieses Verfahren ermöglicht einen sensitiven Nachweis von zellulären Sekretionsprodukten sowie eine genaue Quantifizierung der sezernierenden Zellen. Funktionelle Plasmablasten und Plasmazellen sezernieren Antikörper, welche anhand ihrer Spezifität bzw. ihres Isotyps nach dem Prinzip eines „Sandwich-Komplexes“ durch Detektionsantikörper und enzymatischer Farbreaktion als punktuelle Färbung (Spots) visualisiert und auf Einzelzellbasis ausgezählt werden können.

#### 3.11.2 Durchführung des ELISpot Assays

Die Membran aller 96 Kavitäten der MultiScreen<sub>HTS</sub> Filterplatten (Millipore) wurden zunächst mit 15 µl 35%-igem Ethanol für 1 min vorbehandelt. Während des gesamten Protokolls war ab diesem Schritt eine Feuchthaltung der Membran wichtig. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Antigenbeschichtung der Membran mit 50 µl CT bzw. OVA (je 20 µg/ml in PBS, 4 °C, über Nacht). Ungebundene Antigenmoleküle wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, folgte eine Inkubation mit 200 µl RPMI mit 10% FCS für 2 h bei 37 °C.

Anschließend wurden die Platten mit den isolierten Zellen aus Dünndarm und Knochenmark in absteigender Verdünnung (1:3) inkubiert (2 h im Brutschrank bei 37 °C, unter 5%CO<sub>2</sub>). Während dieser Sekretionsphase sezernierten die Plasmablasten und Plasmazellen unter annähernd physiologischen Bedingungen ihre Antikörper, wobei jeweils CT- bzw. OVA-spezifische Antikörper eine Bindung mit dem Beschichtungsantigen eingingen. Für die Kontrollmessung des unspezifischen Hintergrundsignals wurden einige Kavitäten pro Platte nicht mit Zellen inkubiert, sondern lediglich mit RPMI. Die Zellen sowie ungebundene Antikörper wurden anschließend durch gründliches Waschen mit Tensid-haltigem PBS entfernt. Die nachfolgenden Inkubationen und Waschschrte erfolgten mit Tensid-haltigem PBS. Die gebundenen Antikörper wurden durch Inkubation mit biotinylierten Detektions-Antikörpern

detektiert (2 µg/ml Ziege-anti-Maus-IgA-bio bzw. Ziege-anti-Maus-IgG-bio bzw. Ziege-anti-Maus-IgM-bio, über Nacht bei 4 °C). Nach Entfernung der überschüssigen Antikörper durch Waschen erfolgte eine Inkubation mit dem Enzym-gekoppelten Streptavidin (SA-AP, 1:3000, 30 min bei Raumtemperatur), dessen Überschuss ausgewaschen wurde. Nach Zugabe von 25 µl des Substrates BCIP/NBT wurde eine Farbreaktion eingeleitet, welche einen Farbumschlag bewirkte. Diese Reaktion wurde durch Waschen der Platten unter fließendem Wasser nach 3–5 min abgestoppt und der Kunststoff-Schutz an der Plattenunterseite entfernt. Die fertig entwickelten Platten trockneten für ca. 12 h und wurden anschließend mit einem ELISpot-Lesegerät digitalisiert und mit der Software ImmunoSpot® analysiert.

### 3.12 Untersuchung serologischer Antikörper

#### 3.12.1 Prinzip des ELISA

Während im ELISpot die Anzahl der sezernierenden Zellen mittels einer enzymatischen Farbreaktion einer festen Phase quantifiziert wird, ist das Ziel eines ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) die Messung der Menge der Sekretionsprodukte im flüssigen Milieu, wobei das Prinzip in beiden Methoden im Wesentlichen übereinstimmt.

#### 3.12.2 Durchführung des ELISA

Hochbindende, flachbödige 96-Loch-Platten wurden mit 50 µl OVA (20 µg/ml in PBS) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Überschüssiges OVA wurde durch einen Waschschrift mit PBS entfernt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, folgte eine Inkubation mit PBS/BSA 3% für 1 h bei 37°C. Der Einsatz eines Standards auf jeder Platte ermöglichte eine Vergleichbarkeit zwischen den zu untersuchenden Serumproben. Dieser Standard bestand aus gesammelten Seren OVA-immunisierter Tiere, welche 12 bis 28 Tage nach der sekundären oralen Immunisierung mit OVA und CT entnommen wurden. Nach Entfernung der Blocklösung wurden 50 µl der vorverdünnten Serumproben (1:50 in PBS/BSA) sowie des Standards in einem doppelten Ansatz auf die Platten gegeben, eine Verdünnungsreihe 1:3 angefertigt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Für die Kontrollmessung des unspezifischen Hintergrundsignals einer jeden Platte wurden einige Kavitäten nicht mit Serum inkubiert, sondern lediglich mit PBS/BSA. Nach vollständiger Entfernung des Serums sowie der ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen der Platten mit PBS/BSA erfolgte die Detektion der gebundenen OVA-spezifischen Antikörper durch 50 µl biotinylierter Detektionsantikörper der Isotypen IgA sowie IgG (polyklonal, Ziege, 1 µg/ml in PBS/BSA, 24 h bei 4 °C). Die überschüssigen Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Es folgte eine Inkubation mit 50 µl Streptavidin-gekoppelter alkalischer

Phosphatase (SA-AP, 1:3000, 20 min bei Raumtemperatur), deren Überschuss ausgewaschen wurde. Die enzymatische Entwicklung der Platten wurde durch Zugabe eines sich verfärbenden Substratgemisches von ALP1 und ALP2 (Roche/Hitachi cobas) eingeleitet. Die photometrische Messung der OD-Werte bei einer Wellenlänge von 405 nm erfolgte ohne vorheriges Abstoppen der Reaktion zügig mittels eines ELISA-Lesegerätes.

Für die Analyse wurde eine 4-Parameterkurve des Standards erstellt und anhand dieser wurden die OVA-spezifischen Titer der Isotypen IgA sowie IgG der Einzelproben kalkuliert. Die Daten wurden mittels der Software Softmax-Pro und Excel erstellt.

### **3.13 Graphische Darstellung und statistische Auswertung**

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit der FlowJo Treestar Software ermittelt. Für die Auswertung von ELISpot bzw. ELISA wurden die Software ImmunoSpot<sup>®</sup> bzw. die Software Softmax-Pro und Excel verwendet. Die Graphen mit ihren Medianwerten wurden mit der Software GraphPad Prism 4 erstellt. Weiterhin wurden mit diesem Programm signifikante Unterschiede nach Durchführung des Mann-Whitney-Tests ermittelt. Als signifikant galt, wenn  $p < 0,05$  war.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde mit der ZEN-Software durchgeführt. Weiterhin wurde für das Anfertigen der Abbildungen Adobe Illustrator und Photoshop verwendet.

## 4 Ergebnisse

Die Schleimhäute stellen für den Großteil aller infektiösen Pathogene die Haupteintrittspforte in den Körper dar (55–57). Pathogene sowie oral verabreichte Vakzine gelangen durch das Darmepithel und induzieren eine spezifische Immunantwort in den Darm-assoziierten Lymphgeweben, aus welcher Antigen-spezifische Plasmazellen sowie Gedächtniszellen resultieren. Dabei entsteht in der Regel eine über Monate bis Jahre stabile Immunität, die durch lokal intestinal sezernierte Antikörper sowie spezifische Antikörper im Blutserum gewährleistet wird. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen leiten spezifische Gedächtniszellen eine schnelle Sekundärantwort ein.

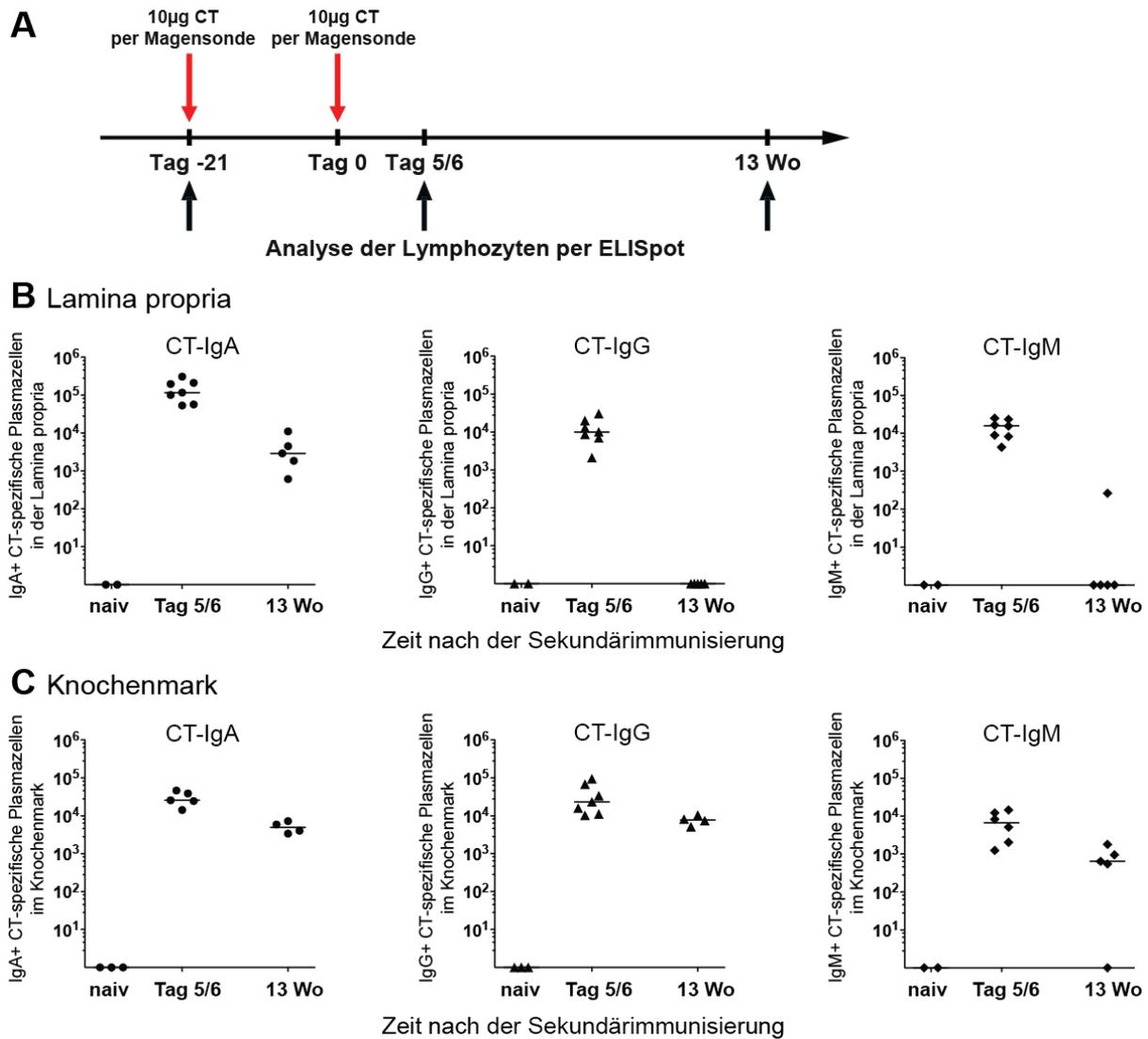
Bereits mehrere tierexperimentelle Studien konnten nach einer oralen Immunisierung sowohl im Darmgewebe als auch im Knochenmark bzw. in der Milz Antigen-spezifische Plasmazellen nachweisen. Dennoch liegen bisher keine Erkenntnisse darüber vor, ob diese ASC langlebig sind oder durch kurzlebige Plasmazellen ständig neu generiert werden. In dieser Arbeit soll daher die Lebensspanne der mukosal induzierten Plasmazellen, welche in den Darm und das Knochenmark migrieren, näher untersucht werden.

### 4.1 Untersuchung der Plasmazellen nach oraler Immunisierung

#### 4.1.1 Entwicklung einer oralen Immunisierungsstrategie

Um zunächst zu ermitteln, ob die mukosal induzierten Plasmazellen durch die angewandte Impfstrategie kurzfristig bzw. auch langfristig in den Plasmazellkompartimenten der Lamina propria und des Knochenmarks vorkommen, wurden C57BL/6 Mäuse, wie im Kap. 3.7.2 beschrieben, zweimalig mit CT im Abstand von 21 Tagen oral mit einer Schlundsonde immunisiert. Einen Überblick über den Versuchsablauf vermittelt die Abb. 1 A.

Die absoluten Zahlen der CT-spezifischen ASC wurden anschließend während des Höhepunkts der sekundären Immunreaktion (Tag 5–6) sowie nach 13 Wochen mittels ELISpot ermittelt und nach den Isotypen IgA, IgG und IgM differenziert dargestellt. Zur Kontrolle der Spezifität wurden nicht-immunisierte (naive) Tiere untersucht. Hier waren sowohl in der Darmmukosa als auch im Knochenmark erwartungsgemäß keine CT-spezifischen Plasmazellen detektierbar (Abb. 1 B, C). Die Ergebnisse zeigen, dass bereits wenige Tage nach der sekundären oralen CT-Applikation sowohl im Darm als auch im Knochenmark CT-spezifische Plasmazellen der drei untersuchten Isotypen detektiert werden konnten.



**Abb. 1: Die orale Immunisierung mit Cholera toxin induziert persistierende CT-spezifische Plasmazellen.** C57BL/6 Mäuse wurden zweimal im Abstand von 21 Tagen mit CT oral immunisiert. Eine schematische Übersicht zeigt den Versuchsaufbau (A). Die absoluten Zahlen der CT-spezifischen Plasmazellen der Isotypen IgA, IgG und IgM wurden in der Lamina propria (B) und im Knochenmark (C) zu den angegebenen Zeitpunkten per ELISpot ermittelt. Als Kontrollgruppe wurden nicht-immunisierte (naive) Tiere untersucht. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Einzeltier. Für jeden Zeitpunkt ist der Median dargestellt.

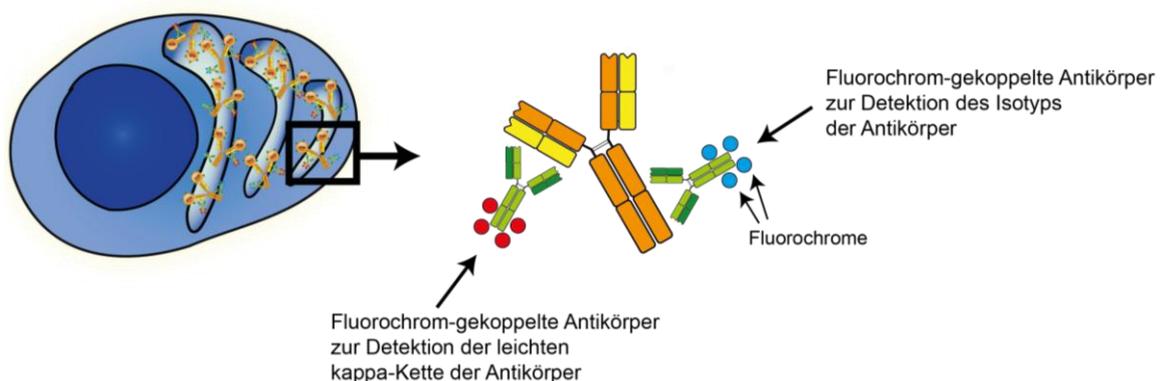
Im Darm (Abb. 1 B) exprimierten die meisten dieser Zellen den Isotyp IgA (Medianwert  $1.2 \times 10^5$ ), deutlich weniger dagegen IgM ( $1.6 \times 10^4$ ) oder IgG ( $1.0 \times 10^4$ ). 13 Wochen nach der Immunisierung dagegen konnten nur IgA+ CT-spezifische ASC detektiert werden, deren Anzahl sich auf  $2,9 \times 10^3$  reduzierte. IgG+ und IgM+ ASC waren nicht mehr nachweisbar.

Im Knochenmark (Abb. 1 C) konnten Tag 5–6 vergleichbare Anteile von IgA+ sowie IgG+ ASC ermittelt werden (Medianwerte IgA:  $2,6 \times 10^4$ ; IgG:  $2,3 \times 10^4$ ) sowie eine kleine Population von IgM+ Plasmazellen. Im Gegensatz zum Darmgewebe waren im Knochenmark auch zum späten Zeitpunkt sowohl IgA+, IgG+ und IgM+ CT-spezifische ASC nachweisbar. Die persistierenden Plasmazellen im Knochenmark exprimierten überwiegend IgG ( $7,7 \times 10^3$ ) bzw. IgA ( $5,0 \times 10^3$ ).

Während im Darm zunächst quantitativ deutlich mehr IgA<sup>+</sup> (4,5-fach) sowie mehr IgM<sup>+</sup> CT-spezifische ASC vorhanden waren, konnten im Knochenmark 2-fach mehr IgG<sup>+</sup> ASC detektiert werden. Über die nachfolgenden Wochen sanken die Zahlen der mukosal induzierten Plasmazellen in der Lamina propria deutlicher als im Knochenmark, sodass das Knochenmark nach 13 Wochen nach der sekundären Immunisierung mehr persistierende ASC enthielt als das Darmgewebe. Zusammenfassend führte das angewendete Immunisierungsschema der CT-Applikation über die Darmschleimhaut zur Bildung von spezifischen Plasmazellen, welche im Knochenmark und im Darmgewebe persistieren können.

#### 4.1.2 Die durchflusszytometrische Identifikation der mukosalen Plasmazellen

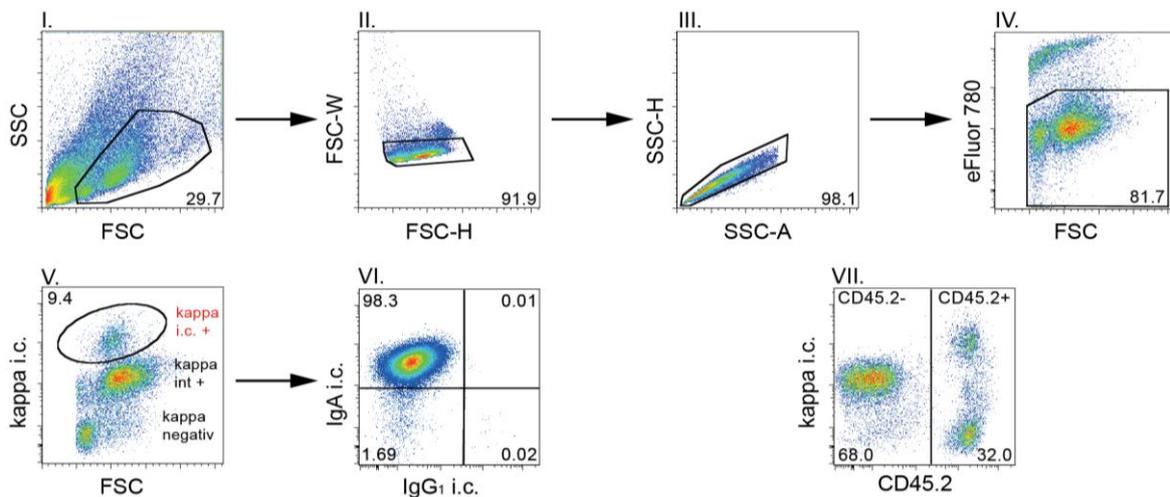
Die durchflusszytometrische Bestimmung von CT-spezifischen ASC ist aufgrund der Bindungseigenschaften von CT nur begrenzt möglich (Kap. 1.5). CT übt auf diverse ko-verabreichte Antigene eine starke Adjuvans-Wirkung aus (125). Dabei wird eine spezifische Immunreaktion gegen seine CT-B-Untereinheit sowie gegen das gleichzeitig oral verabreichte Antigen induziert. Für die folgenden Immunisierungen wurde daher ein Gemisch mit OVA als Immunogen und CT als Adjuvans 2-malig im Abstand von 21 Tagen oral verabreicht. Die intestinalen Lymphozyten wurden aus dem Dünndarm nach Entfernung der Peyer'schen Plaques isoliert (Kap. 3.8.2). Die gewonnene Zellsuspension enthielt aufgrund der fehlenden Dichtezentrifugation eine große Zahl verschiedener Zelltypen inklusive Fettzellen und Epithelzellen. Daher wurde zunächst die eindeutige durchflusszytometrische Identifikation der intestinalen ASC etabliert, um sie anschließend auf ihre Lebensspanne und ihren Isotyp weiter zu analysieren. Nach Fixieren und Permeabilisieren der Zellen erfolgte eine intrazelluläre Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern zur Detektion der ASC anhand ihrer intrazellulär akkumulierten Immunglobuline nach dem folgenden Schema (Abb. 2).



**Abb. 2: Bindung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern an den Immunglobulinen der Plasmazellen.**

Die isolierten Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung mit verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die kappa-spezifischen Antikörper binden an der leichten Kette der Immunglobuline und ermöglichen die Bestimmung der gesamten Plasmazellpopulation des jeweiligen Organs. Die Antikörper gegen IgA bzw. IgG<sub>1</sub> dagegen binden an dem konstanten Teil und definieren den Isotyp einer Plasmazelle.

Abb. 3 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der isolierten intestinalen Zellen. Ein erstes Analysefenster definiert die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität (I.). Anschließend wurden Dubletten diskriminiert (II. und III.). Bei Dubletten handelt es sich um aneinander haftende Zellen, die sich in der Pulsweite und -fläche von Einzelzellen unterscheiden. Nach dem Ausschluss der toten Zellen durch Aufnahme des fixierbaren eFluor 780 (IV.), konnten durch die Färbung der leichten kappa-Kette drei Populationen identifiziert werden (V.): 1. kappa-negative Zellen, 2. eine kappa-intermediäre Population und 3. kappa i.c.+ Plasmazellen (i.c. – *intracellular*). Voruntersuchungen mit dem Lymphozytenmarker CD45.2 (VII.) jedoch zeigten, dass nur rund ein Drittel der lebenden Zellen als CD45.2+ Lymphozyten identifiziert werden konnten, während ein Großteil der kappa-intermediären Zellen als CD45.2- Zellen nicht den Lymphozyten zugehörig waren. Diese Population besteht vermutlich aus Epithelzellen resultierend aufgrund der fehlenden Dichtezentrifugation. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse zeigt, dass die kappa i.c.+ ASC eindeutig identifiziert werden konnten (V.). Diese ASC wurden im Folgenden mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen die schwere Kette der Immunglobuline auf die Expression der Isotypen IgA und IgG<sub>1</sub> untersucht. Dieses Färbeverfahren ermöglichte die eindeutige Identifikation der Plasmazellen sowie die Bestimmung ihres Isotyps und bildeten die Grundlage für die durchflusszytometrischen Untersuchungen weiterer Eigenschaften.



**Abb. 3: Durchflusszytometrische Identifikation und Isotypbestimmung der intestinalen Plasmazellen.**

Die Lymphozyten wurden aus dem Dünndarm nach Entfernung der Peyer'schen Plaques isoliert und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse intestinaler Zellen für die Identifikation der ASC. (I.) Definition der Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität. (II. und III.) Definition der Einzelzellen nach Ausschluss der Dubletten. (IV.) Detektion der lebenden Zellen unter Ausschluss der toten. (V.) Identifizierung der kappa i.c.+ ASC (rot) unter Ausschluss von kappa-intermediären und kappa-negativen Zellen. (VI.) Fluoreszente Antikörpern gegen IgA bzw. IgG<sub>1</sub> ermöglichten Angaben über den Isotyp der ASC. (VII.) Durch eine Oberflächenfärbung mit dem Lymphozytenmarker CD45.2 wurde weiterhin ermittelt, dass die Mehrheit der kappa-intermediären Zellen aufgrund der fehlenden Expression von CD45.2 nicht den Lymphozyten zugehörig war. Diese Zellen konnten jedoch eindeutig von der Analyse der Plasmazellen ausgeschlossen werden (Analysefenster in V.).

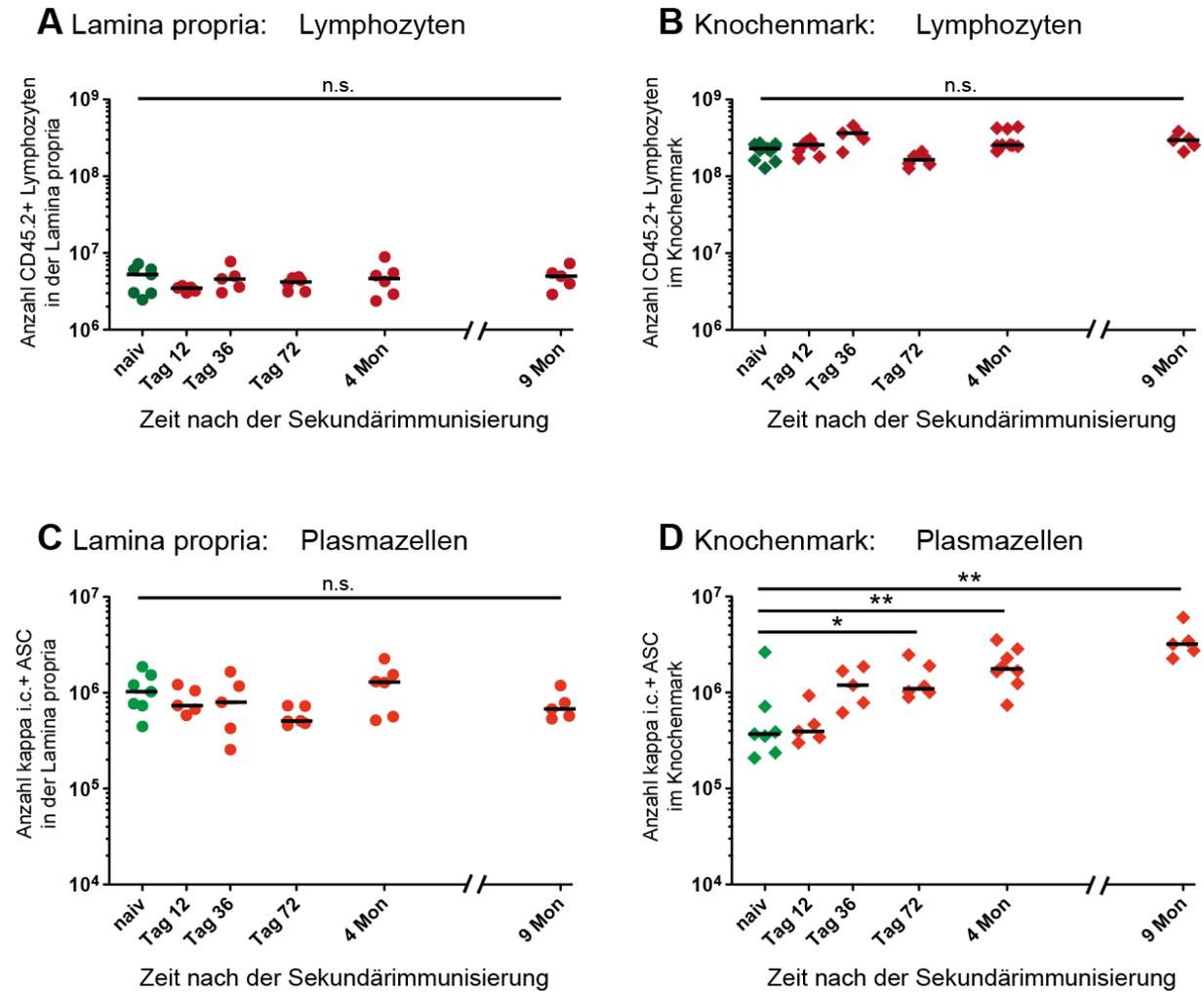
### 4.1.3 Anzahl der Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks

Im Rahmen der Untersuchung der Plasmazellkompartimente der Lamina propria und des Knochenmarks wurden zunächst die absoluten Zahlen der Lymphozyten sowie der ASC, unabhängig ihrer Spezifität, ermittelt. Nach einer zweimaligen oralen Immunisierung mit OVA und CT wurden die Zahlen der Lymphozyten mittels Expression des membranständigen CD45.2 und die Zahlen der ASC durch die intrazelluläre Färbung der leichten kappa Kette der Antikörper von beiden Organen zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4). Für jeden Zeitpunkt nach der Immunisierung wurde der Medianwert ermittelt und mit dem Medianwert der nicht-immunisierten Tiere durch den Mann-Whitney-Test analysiert.

Die Zahlen der CD45.2+ Lymphozyten von Darm und Knochenmark wiesen dabei innerhalb der beiden einzelnen Organe keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 4 A, B). Im Knochenmark, dem wichtigsten blutbildenden Organ, lagen die Medianwerte der Lymphozyten in einem Bereich von  $1,6$  bis  $3,6 \times 10^8$  deutlich höher als in der Lamina propria (Medianwerte von  $3,5$  bis  $5,3 \times 10^6$ ).

Die absolute Zahl der kappa i.c.+ ASC im Dünndarm lag im naiven Zustand sowie bis zu 9 Monate nach oraler Immunisierung relativ konstant in einem Bereich von  $4,7 \times 10^5$  bis  $1,3 \times 10^6$  (Abb. 4 C). Im Knochenmark dagegen stieg die Anzahl der ASC mit zunehmender Zeit nach der oralen Immunisierung kontinuierlich an (Abb. 4 D). Während nicht-immunisierte Tiere im Knochenmark im Median nur  $3,7 \times 10^5$  Plasmazellen enthielten, konnten 9 Monate nach dem Boost fast 10-fach mehr ASC detektiert werden.

Ein Vergleich der Plasmazellkompartimente beider Organe zeigt weiterhin, dass die Lamina propria des Dünndarmes nicht-immunisierter Tiere 2,7-fach mehr Plasmazellen enthält als das Knochenmark und demnach zunächst das größere Plasmazellkompartiment darstellt (Abb. 4 C, D). Während des Untersuchungszeitraumes über 9 Monate nach der oralen Immunisierung stieg die Zahl der Plasmazellen im Knochenmark jedoch kontinuierlich an, während die der intestinalen Plasmazellen nahezu konstant blieb. Dadurch umfasst das Knochenmark final 2-fach mehr Plasmazellen als das Dünndarmgewebe.



**Abb. 4: Anzahl der CD45.2+ Lymphozyten und der kappa i.c.+ Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks nach der oralen Immunisierung.**

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweifachen oralen Immunisierung mit OVA und CT sowie von nicht-immunisierten Tieren wurden die isolierten Lymphozyten des Dünndarms und des Knochenmarks durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der CD45.2+ Lymphozyten (**A, B**) und der kappa i.c.+ ASC unabhängig ihrer Spezifität (**C, D**) in den beiden Organen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit dem MACS Quant. Jedes Symbol repräsentiert ein Einzeltier, wobei die Werte der naiven Tiere mit grünen und die der immunisierten Tiere mit roten Symbolen dargestellt sind. Für jeden Zeitpunkt wird der Median angezeigt. Mittels des Mann-Whitney-Tests wurde jeder Medianwert der verschiedenen Zeitpunkte nach Immunisierung mit dem Medianwert der zugehörigen naiven Gruppe getestet. Die Daten wurden aus mehreren unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

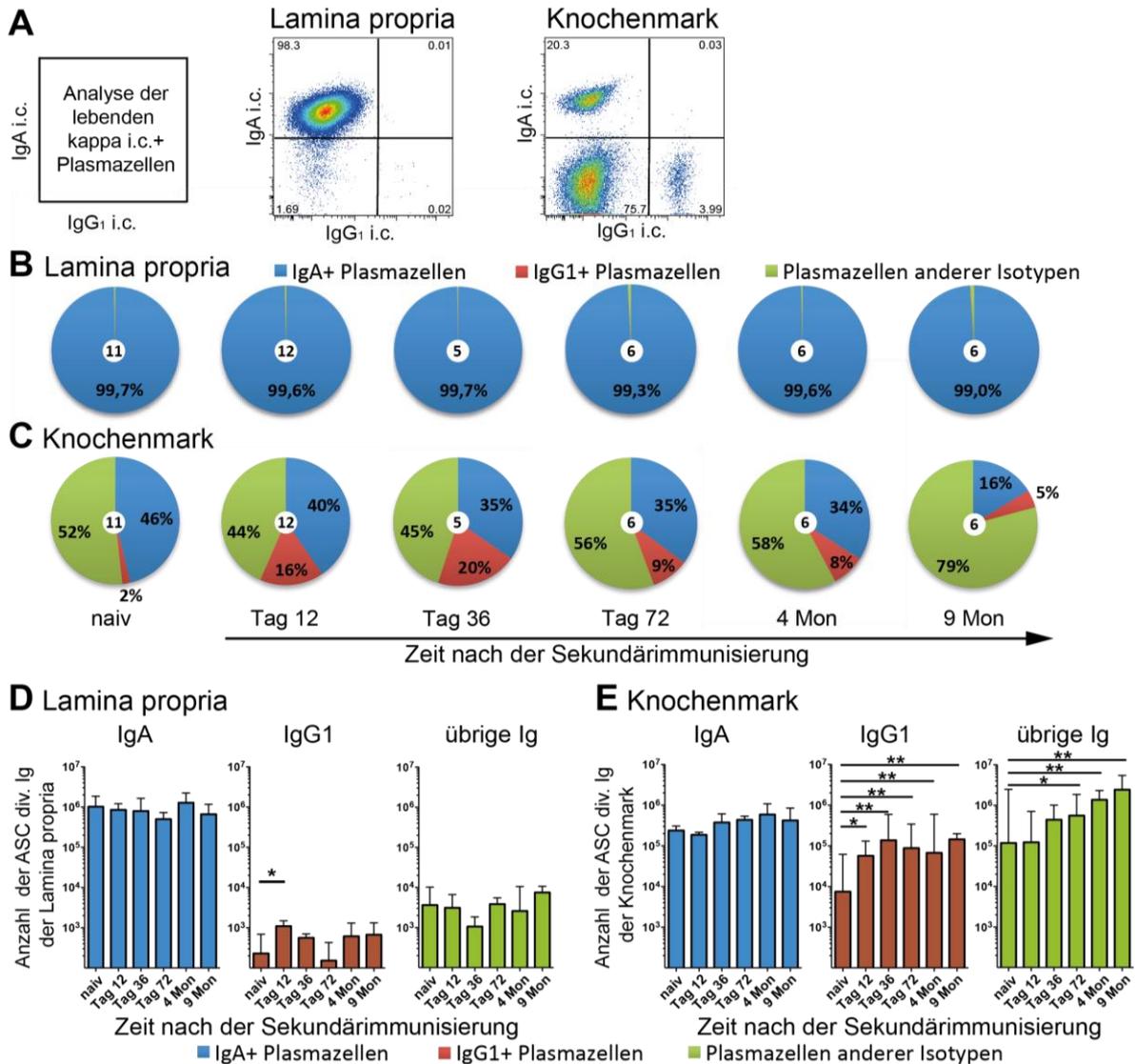
#### 4.1.4 Untersuchung der Isotyp-Expression der Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks

Um zu untersuchen, ob und wie sich die Isotyp-Expression der Plasmazellen beider Kompartimente unabhängig ihrer Spezifität über die Zeit nach der oralen Immunisierung verändert, wurden die kappa i.c.+ ASC durchflusszytometrisch auf die Expression von IgA bzw. IgG<sub>1</sub> analysiert (Abb. 5 A). Plasmazellen, welche weder IgA noch IgG<sub>1</sub> exprimierten, wurden als dritte Gruppe zusammengefasst. Die ermittelten Frequenzen der verschiedenen Isotypen innerhalb der beiden Plasmazellkompartimente wurden für die angegebenen Zeitpunkte nach der Immunisierung in Kreisdiagrammen dargestellt (Abb. 5 B, C). Weiterhin wurden ihre absoluten Zahlen für die Lamina propria und für das Knochenmark ermittelt (Abb. 5 D, E).

Im intestinalen Plasmazellkompartiment von nicht-immunisierten sowie immunisierten Tieren dominierten deutlich Antikörper-sezernierende Zellen des Isotyps IgA (> 99%), während andere Isotypen von weniger als 1 % der Plasmazellen exprimiert wurden (Abb. 5 B). Die ermittelten Zahlen der IgA+ (blau), IgG<sub>1</sub>+ (braun) bzw. IgA- und IgG<sub>1</sub>-negativen (grün) ASC des Darmes zeigen, dass sowohl bei oral immunisierten als auch bei naiven Tieren die Mehrheit der intestinalen Plasmazellen IgA+ ist und ihre absolute Anzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu unverändert bleibt. Ähnlich konstant verhielten sich die Zahlen der IgG<sub>1</sub>+ sowie IgA- IgG<sub>1</sub>-negativen ASC, welche nur einen sehr geringen Anteil bildeten. Nach der Immunisierung stieg in den ersten 12 Tagen zunächst die Zahl der IgG<sub>1</sub>+ ASC um ein 4-faches an (Medianwerte für IgG<sub>1</sub> von 231 auf 1100), wobei die Zahl in den darauffolgenden Wochen (Tag 36 bis 9 Monate) auf die Hälfte sank.

Im Knochenmark war dagegen ein dynamischer Anstieg der Plasmazellzahlen nach der oralen Immunisierung detektierbar (Abb. 5 C, E). In naiven Tieren bestand das Kompartiment durchschnittlich rund zur Hälfte aus IgA+ ASC, deren absolute Zahl im Median  $2,4 \times 10^5$  IgA+ Plasmazellen entsprach. Innerhalb von 36 Tagen nach der oralen Immunisierung stieg die absolute Zahl der IgA+ ASC auf nahezu das 2-fache und blieb die nachfolgenden Wochen mit durchschnittlich  $4,8 \times 10^5$  bis zu 9 Monaten relativ konstant. Aufgrund des in Abb. 4 D gezeigten allgemeinen Anstiegs der Zahl aller ASC bildete der Anteil der IgA+ ASC mehrere Monate nach der Sekundärimmunisierung nur noch 16% des gesamten Kompartiments.

Im Knochenmark stieg die Zahl der IgG<sub>1</sub>+ ASC in den ersten 12 Tagen um ein 8-faches an (Median  $5,7 \times 10^4$ , Abb. 5 E). Bis zum Tag 36 verdoppelte sich ihre Anzahl weiterhin (Median  $1,4 \times 10^5$ ) und blieb anschließend bis 9 Monate nach der oralen Immunisierung weitestgehend konstant. Dabei stieg die Frequenz der IgG<sub>1</sub>+ ASC im Knochenmark auf 20% an, wobei 9 Monate nach der Immunisierung noch 5% aller ASC IgG<sub>1</sub> exprimierten (Abb. 5 C). Der Anteil von kappa i.c.+ IgA- IgG<sub>1</sub>-negativen ASC lag zunächst bei 52%. Ihre Zahl erhöhte sich in 9 Monaten nach der Immunisierung um ein 20-faches (Median  $2,4 \times 10^6$ ) (Abb. 5 E).



**Abb. 5: Analyse der Isotyp-Expression der Plasmazellen von Lamina propria und Knochenmark.**

Die isolierten Lymphozyten der Lamina propria und des Knochenmarks wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch untersucht, wobei der Fokus der Analyse auf den kappa i.c.+ ASC lag. **(A)** Ein repräsentatives Punkt-Wolken-Diagramm zeigt die IgA- bzw. IgG<sub>1</sub>-Expression der ASC beider Organe. **(B+C)** Jedes Kreisdiagramm stellt das vollständige Plasmazellkompartiment der zwei Organe zu den angegebenen Zeitpunkten dar. Die Prozentzahlen geben das arithmetische Mittel der Frequenzen von IgA (blau) und IgG<sub>1</sub> (braun) wieder, wobei eine dritte Gruppe die kappa+ IgA- IgG<sub>1</sub>- ASC (grün) zusammenfasst. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist durch die mittige Zahl angegeben. **(D+E)** Absolute Zahlen der IgA+, IgG<sub>1</sub>+ sowie der kappa+ IgA- IgG<sub>1</sub>-negativen ASC der Lamina propria **(D)** und des Knochenmarks **(E)**. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Medianwerten der immunisierten Tiere und der naiven Gruppe mittels Mann-Whitney-Test ermittelt und dargestellt.

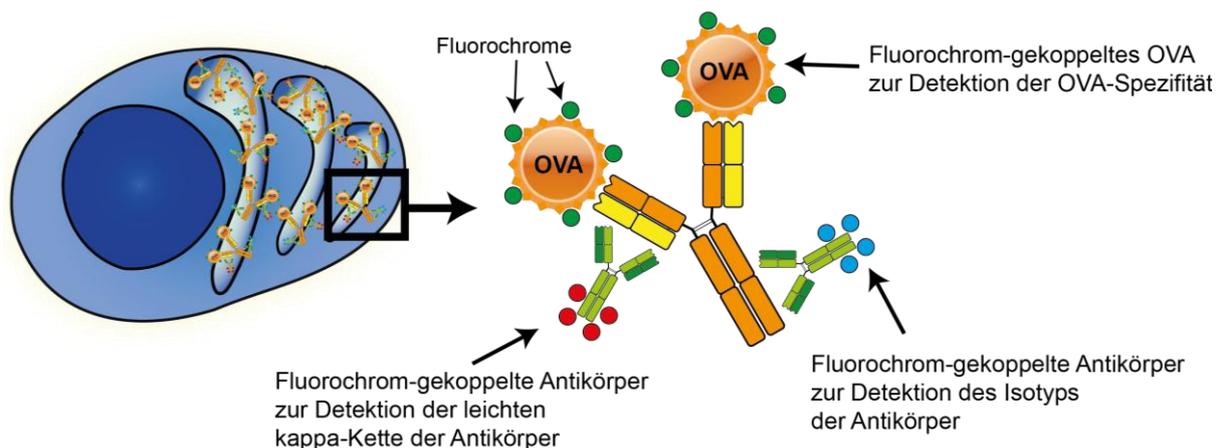
Die Ergebnisse zeigen, dass das Plasmazellkompartiment der Lamina propria aus über 99 % IgA+ Plasmazellen besteht, wobei ihre absolute Zahl in naiven sowie oral immunisierten Tieren innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von mindestens 9 Monaten konstant blieb. Im Knochenmark dagegen stieg vor allem die Zahl der IgG<sub>1</sub>+ ASC sowie der IgA- IgG<sub>1</sub>-negativen ASC dauerhaft an. Inwiefern nach der oralen Immunisierung mukosal induzierte Plasmazellen in den beiden Organen vorhanden sind, soll im nachfolgenden Kapitel im Rahmen einer Analyse der OVA-spezifischen Plasmazellen ermittelt werden.

## 4.2 Analyse der mukosal induzierten Plasmazellen

Die Ergebnisse der ELISpot-Analyse zeigten, dass die orale Immunisierung mit CT persistierende CT-spezifische ASC sowohl in der Lamina propria als auch im Knochenmark induziert. Ob diese jedoch kurzlebig sind und durch Proliferation ständig neu generiert werden oder ob es sich um langlebige nicht-proliferative Plasmazellen handelt, kann im Rahmen der ELISpot-Analyse nicht ermittelt werden. Diese Eigenschaften können mittels durchflusszytometrischer sowie histologischer Nachweisverfahren untersucht werden. Nach der oralen Applikation von CT als Adjuvans und OVA als Immunogen sollen nun die mukosal induzierten OVA-spezifischen Plasmazellen durchflusszytometrisch quantifiziert und auf ihren Isotyp charakterisiert werden.

### 4.2.1 Detektion von OVA-spezifischen ASC nach der oralen Immunisierung

Die ASC wurden wie zuvor beschrieben mittels intrazellulärer Antikörperfärbung gegen die leichte kappa Kette der Antikörper identifiziert. Eine Untersuchung der Isotypen erfolgte durch Anfärbung von IgA bzw. IgG<sub>1</sub>. Für die durchflusszytometrische und histologische Detektion der mukosal induzierten OVA-spezifischen ASC wurde OVA an ein Fluorochrom gekoppelt. Dieses wurde im Färbeverfahren von Zellsuspensionen bzw. Gewebeschnitten von den intrazellulär akkumulierten Antikörpern der OVA-spezifischen ASC gebunden und markierte eindeutig die spezifischen ASC in der jeweiligen Wellenlänge des gekoppelten Fluorochroms farblich. Das Detektionsprinzip ist in der Abb. 6 schematisch dargestellt.



**Abb. 6: Markierung von OVA-spezifischen Plasmazellen mittels Fluorochrom-gekoppelten OVA.**

Die isolierten Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung mit verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die kappa-spezifischen Antikörper binden an der leichten Kette der Immunglobuline und ermöglichen die Bestimmung der gesamten Plasmazellpopulation des jeweiligen Organs. Die Antikörper gegen IgA bzw. IgG<sub>1</sub> dagegen binden an dem konstanten Teil und definieren den Isotyp einer ASC. Um innerhalb der Plasmazellpopulation die OVA-spezifischen ASC eindeutig zu bestimmen, wurde Fluorochrom-gekoppeltes OVA verwendet. Dieses wird nur von Plasmazellen gebunden, deren Antikörper spezifisch gegen OVA gerichtet sind.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der OVA-spezifischen ASC sowie zur Überprüfung der Spezifität insbesondere unter Betrachtung der Verwendung von Kollagenasen bei der Isolation der intestinalen Lymphozyten (Kap. 3.8.2) wurden mehrere Kontrollgruppen geprüft. Dafür wurden zunächst die Lymphozyten der beiden Organe 12 Tage nach der sekundären oralen Immunisierung sowie von nicht-immunisierten Tieren isoliert und nach Fixieren der Zellen intrazellulär nach dem Schema der Abb. 6 gefärbt.

In Abb. 7 sind exemplarische Punkt-Wolken-Diagramme der durchflusszytometrischen Identifikation von OVA-spezifischen ASC sowie verschiedener Kontrollen dargestellt. Dabei konnte in einer Gegenüberstellung der Färbungen der leichten kappa-Kette gegen OVA in der Lamina propria 12 Tage nach der sekundären Immunisierung eine Population von OVA-spezifischen ASC detektiert werden (Abb. 7 A, links). Die Lamina propria der nicht-immunisierten Kontrollgruppe wies dagegen erwartungsgemäß keine OVA-spezifischen ASC aufwies (Abb. 7 A, rechts).

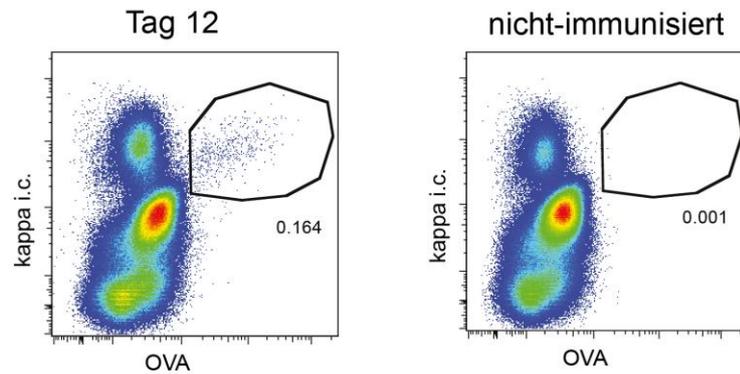
Zusätzlich wurde die Spezifität des Nachweisverfahrens der OVA-spezifischen ASC durch weitere Kontrollgruppen bestätigt (Abb. 7 B). C57BL/6-Mäuse wurden entweder I. nur mit CT oder II. nur mit OVA oral immunisiert und die Lymphozyten der Lamina propria durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von OVA-spezifischen Plasmazellen analysiert. Bei einer weiteren Kontrolle (III.) erfolgte eine normale Immunisierung mit OVA und CT, wobei die Zellsuspensionen mit nicht-fluoreszentem OVA inkubiert wurden (OVA-Block). Anschließend wurde der übliche Färbeschritt mit Fluorochrom-gekoppelten OVA durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten der drei Kontrollgruppen der Lamina propria zeigt, dass nach einer Verabreichung von CT ohne OVA bzw. von OVA ohne CT keine OVA-spezifischen Plasmazellen im Darm detektiert werden konnten (Abb. 7 B, I.+ II.). Weiterhin konnte die farbliche Markierung der OVA-spezifischen Plasmazellen von Tag 12 nach der Standardimmunisierung mittels Fluorochrom-gekoppeltem OVA durch das Inkubieren der Zellsuspensionen mit ungekoppeltem OVA vor dem Färbeschritt spezifisch unterbunden werden (Abb. 7 B, III.).

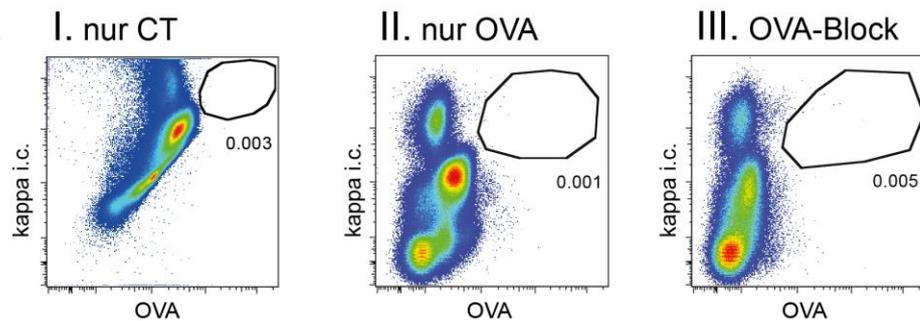
Aus den durchflusszytometrischen Analysen lässt sich ableiten, dass es sich bei der intrazellulären Färbung der isolierten Zellen mittels Farbstoff-gekoppeltem OVA um ein zuverlässiges und spezifisches Nachweisverfahren für die Detektion der OVA-spezifischen ASC handelt und dass die Isolationsmethode unter Verwendung von Kollagenasen keinen negativen Einfluss auf die Identifikation dieser Zellen hat.

**A Lamina propria**

kappa i.c.  
Analyse der  
lebenden  
Zellen der  
Lamina propria  
OVA

**B weitere Kontrollen**

kappa i.c.  
Analyse der  
lebenden  
Zellen der  
Lamina propria  
OVA

**Abb. 7: Detektion von OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria mittels Durchflusszytometrie.**

C57BL/6 Mäuse wurden zweimalig mit OVA und CT oral immunisiert und die Lymphozyten aus der Lamina propria 12 Tage nach der sekundären Immunisierung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden nicht-immunisierte Tiere untersucht. **(A)** Die Darstellung zeigt repräsentative Punkt-Wolken-Diagramme für die durchflusszytometrische Detektion von OVA-spezifischen ASC innerhalb eines gesetzten Analysefensters mit Angabe der Häufigkeit. **(B)** Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden C57BL/6 Mäuse zweimalig nur mit CT (I.) oder OVA (II.) immunisiert und auf das Vorhandensein von OVA-spezifischen Plasmazellen analysiert. Eine dritte Kontrolle erfolgte nach Standardimmunisierung mit OVA und CT, wobei die isolierten Zellsuspensionen mit nicht-fluoreszentem OVA (III. OVA-Block) vor dem intrazellulären Färbeschritt inkubiert wurden.

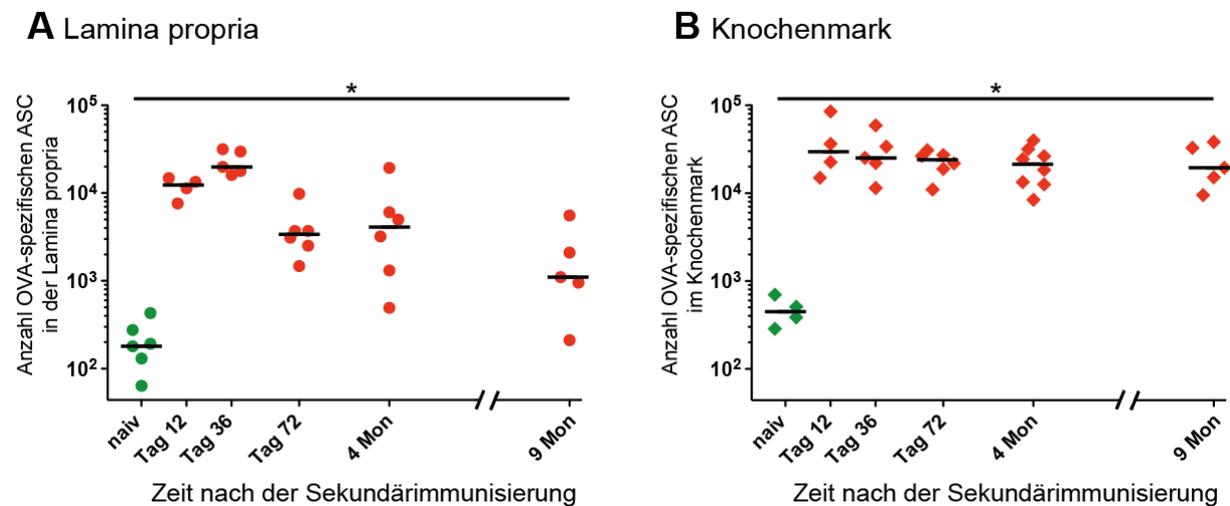
**4.2.2 Anzahl der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark nach der oralen Immunisierung**

In dem folgenden Experiment wurden die absoluten Zahlen der kappa i.c.+ OVA-spezifischen ASC der Lamina propria und des Knochenmarks nach der sekundären oralen Immunisierung mit OVA und CT durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse der Lamina propria (Abb. 8 A) und des Knochenmarks (Abb. 8 B) der immunisierten Tiere werden mit roten Symbolen dargestellt, wobei nicht-immunisierte Tiere in beiden Organen nur wenig OVA-spezifische Plasmazellen enthielten (grüne Symbole).

In der Lamina propria konnten 12 Tage nach der sekundären Immunisierung im Median  $1,2 \times 10^4$  OVA-spezifische Plasmazellen detektiert werden, wobei ihre Zahl zunächst bis Tag 36 auf  $2 \times 10^4$  anstieg und dann über die nachfolgenden Wochen kontinuierlich sank (Abb. 8 A). 9 Monate nach dem Boost konnten noch immer im Median  $1,1 \times 10^3$  OVA-spezifische Plasmazellen in der Lamina propria (rund 5% des Maximums von Tag 36) nachgewiesen werden.

Im Knochenmark lag die maximal ermittelte Zahl der OVA-spezifischen ASC mit  $3 \times 10^4$  (Medianwert) an Tag 12 und verringerte sich geringfügig im Verlauf des Untersuchungszeitraumes (Abb. 8 B). 9 Monate nach dem mukosalen Antigen-Kontakt waren im Median noch  $1,9 \times 10^4$  OVA-spezifische ASC detektierbar (63% des Maximums).

Im quantitativen Vergleich der OVA-spezifischen Plasmazellpopulation zwischen diesen beiden Organen ist ersichtlich, dass während der ersten Wochen nach der Immunisierung im Knochenmark zunächst bis zu 1,3-fach mehr OVA-spezifische ASC vorhanden waren. In beiden Organen sank die Zahl der OVA-spezifischen ASC, wobei dieser Abfall in der Lamina propria in einem stärkeren Ausmaß erfolgte als im Knochenmark. Daraus resultierte, dass 9 Monate nach der Immunisierung im Knochenmark 17-fach mehr OVA-spezifische Plasmazellen detektiert werden konnten als in der Lamina propria.



**Abb. 8: Absolute Anzahl der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark nach der oralen Immunisierung.**

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweifachen oralen Immunisierung mit OVA und CT sowie von nicht-immunisierten Tieren wurden die Lymphozyten der Lamina propria und des Knochenmarks durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der OVA-spezifischen Plasmazellen pro Organ: der Lamina propria (**A**) und des Knochenmarks (**B**). Jedes Symbol repräsentiert ein Einzeltier. Die Medianwerte der verschiedenen Zeitpunkte nach der oralen Immunisierung wurden jeweils mit dem Medianwert der naiven Tiere getestet (Mann-Whitney).

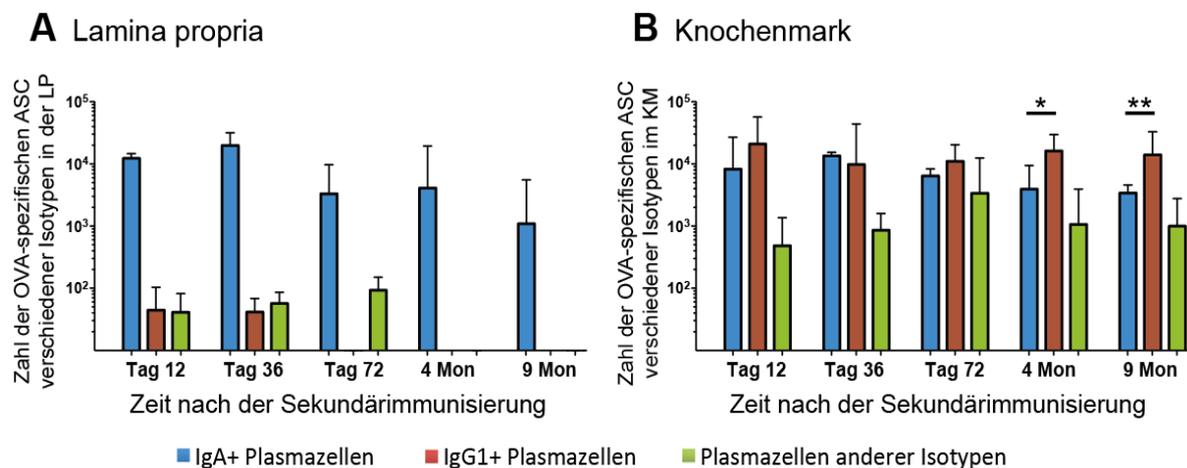
Zusammenfassend zeigt die statistische Analyse, dass nach einer zweimaligen oralen Applikation von OVA mit CT als Adjuvans OVA-spezifische ASC sowohl in der Lamina propria als auch im Knochenmark für mindestens 9 Monaten persistieren können. Beide Kompartimente stellen Migrationsziele der mukosal induzierten Plasmazellen dar, wobei die Population innerhalb des Knochenmarks quantitativ konstanter ist, während die Zahl dieser Zellen im Darm kontinuierlich sinkt. Damit beherbergt das Knochenmark nach 9 Monaten die deutliche Mehrheit der oral induzierten Plasmazellen.

### 4.2.3 Untersuchung der Isotyp-Expression der OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks

Zur weiteren Charakterisierung der OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Expression von IgA und IgG<sub>1</sub>. Abb. 9 zeigt die absoluten Zahlen der IgA<sup>+</sup> (blau) und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (braun) OVA-spezifischen ASC der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B) zu den gegebenen Zeitpunkten nach der oralen Immunisierung. Die Zahl der kappa i.c., IgA- IgG<sub>1</sub>- ASC wurde in einer dritten Gruppe zusammengefasst (grün).

Der größte Anteil (über 97%) der intestinalen OVA-spezifischen ASC exprimierten IgA (blau) (Abb. 9 A), deren Zahl im Verlauf des Untersuchungszeitraums kontinuierlich sank. OVA-spezifische Plasmazellen, welche IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (braun) oder andere, nicht-untersuchte Isotypen (grün) exprimierten, konnten nur von Tag 12 bis Tag 36 bzw. Tag 72 detektiert werden.

Im Knochenmark dagegen bestand die Mehrheit der OVA-spezifischen Plasmazellen aus IgA<sup>+</sup> und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> ASC, wobei anders als im Darmgewebe alle Isotypen bis zu 9 Monate nach der Immunisierung detektiert werden konnten (Abb. 9 B). Die höchste Anzahl der IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> OVA-spezifischer Plasmazellen wurde an Tag 12 detektiert (Median  $2,1 \times 10^4$ ), diese reduzierte sich geringfügig bis zu 9 Monaten auf  $1,4 \times 10^4$ . Das Maximum der IgA<sup>+</sup> Plasmazellen wurde Tag 36 detektiert (Median  $1,3 \times 10^4$ ). Anschließend sank ihre Zahl bis zu 9 Monate nach der Immunisierung kontinuierlich auf  $3,4 \times 10^3$  IgA<sup>+</sup> ASC.



**Abb. 9: Analyse der Isotyp-Expression der OVA+ Plasmazellen aus Lamina propria und Knochenmark.**

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der 2-fachen oralen Immunisierung mit OVA und CT wurden die Lymphozyten der Lamina propria (LP) und des Knochenmarks (KM) durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildungen zeigen die absoluten Zahlen der kappa i.c.+ OVA-spezifischen ASC der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B), wobei die IgA<sup>+</sup> (blau) und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (braun) sowie die zusammengefassten IgA- IgG<sub>1</sub>-negativen ASC (grün) differenziert dargestellt sind. Die Ergebnisse der jeweiligen Zeitpunkte resultieren aus unabhängigen Experimenten, wobei pro Zeitpunkt 4-8 Tiere analysiert wurden. Dargestellt ist jeweils der Median mit Range. Innerhalb eines Zeitpunktes wurden die Medianwerte der IgA<sup>+</sup> mit den IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> mittels Mann-Whitney-Test überprüft.

Das Verhältnis der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark war zwischen IgA<sup>+</sup> und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> in den ersten 2 Monaten annähernd gleich (Abb. 9 B). Die Zahl der intestinal induzierten IgA<sup>+</sup> ASC sank jedoch nach ihrer Einwanderung in das Knochenmark stärker als die des Isotyps IgG<sub>1</sub>. Nach 9 Monaten konnten 4-fach mehr IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> OVA-spezifische Plasmazellen detektiert werden als IgA<sup>+</sup> OVA-spezifische Plasmazellen.

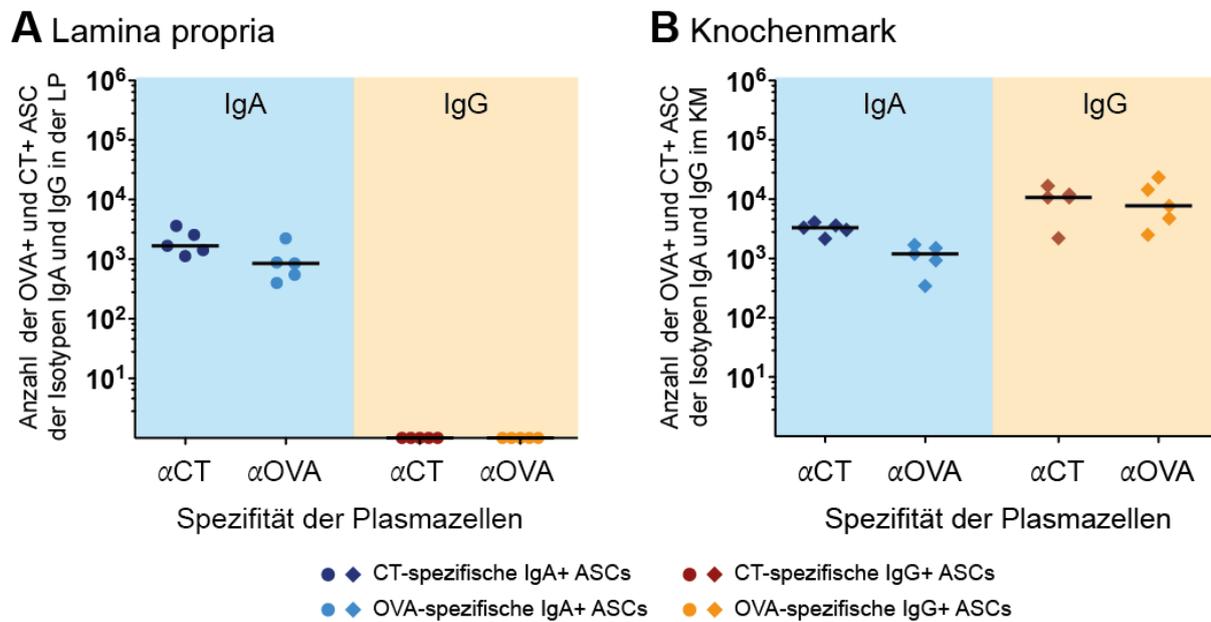
Zusammenfassend ist aus den Untersuchungen ersichtlich, dass die persistierenden intestinal induzierten Plasmazellen in der Lamina propria ausschließlich vom Isotyp IgA sind, während im Knochenmark diese Zellen überwiegend sowohl IgA als auch IgG<sub>1</sub> exprimieren. Weiterhin zeigt die Analyse, dass die in Abb. 8 gezeigte gewebespezifische Abnahme der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark hauptsächlich auf eine Reduktion der IgA<sup>+</sup> Plasmazellen zurückzuführen ist.

#### **4.2.4 Sowohl OVA als auch CT-spezifische Plasmazellen sind 9 Monate nach Immunisierung in Lamina propria und Knochenmark nachweisbar**

Nach dem durchflusszytometrischen Nachweis von persistierenden OVA-spezifischen ASC in Dünndarm und Knochenmark, sollte nun mittels ELISpot das Verhältnis der CT- und OVA-spezifischen Plasmazellen zueinander nach 9 Monaten ermittelt werden. Dafür erfolgte die Isolation der Lymphozyten aus der Lamina propria und des Knochenmarks und mit Hilfe des ELISpots wurden die Zahlen CT- und OVA-spezifischer ASC der Isotypen IgA und IgG für das jeweilige Organ ermittelt.

In der Lamina propria (Abb. 10 A) konnten sowohl OVA- als auch CT-spezifische ASC des Isotyps IgA detektiert werden. Dabei betrug die Zahl der Plasmazellen mit einer Spezifität gegen CT im Median  $1,7 \times 10^3$  Plasmazellen und lag somit um ein 2-faches höher als die Zahl der OVA-spezifischen Zellen (Median  $8,5 \times 10^2$ ). IgG<sup>+</sup> Plasmazellen beider Spezifitäten waren im Dünndarmgewebe nicht detektierbar.

Im Knochenmark (Abb. 10 B) dagegen waren 9 Monate nach der oralen Immunisierung beide Isotypen der CT- und OVA-spezifischen Plasmazellen vorhanden. Dabei konnten ähnlich der durchflusszytometrischen Resultate im Knochenmark (Abb. 9 B) mehr OVA-spezifische Plasmazellen des Isotyps IgG (Median  $7,7 \times 10^3$ ) als des Isotyps IgA (Median  $1,2 \times 10^3$ ) detektiert werden. Der Isotyp dominierte auch bei den Plasmazellen mit einer Spezifität gegen CT. Die Anzahl der IgG<sup>+</sup> CT-spezifischen ASC (Median  $1,1 \times 10^4$ ) war höher als die der CT-spezifischen Zellen, welche IgA exprimierten (Median  $3,3 \times 10^3$ ). Insgesamt konnten im Knochenmark 1,6-fach mehr CT-spezifische Plasmazellen detektiert werden als OVA-spezifische Plasmazellen (Abb. 10 B).



**Abb. 10: Anzahl der CT- und OVA-spezifischen ASC der Lamina propria und des Knochenmarks neun Monate nach der oralen Immunisierung.**

Nach der zweimaligen oralen Immunisierung wurden die Lymphozyten der Lamina propria (**A**) und des Knochenmarks (**B**) isoliert und mittels ELISpot analysiert. Bei der Untersuchung wurden die OVA- bzw. CT-spezifischen Plasmazellen durch die Detektionsantikörper anti-IgA bzw. anti-IgG nach ihrem Isotyp pro Organ quantifiziert. Jedes Symbol stellt ein Individuum dar. Dargestellt ist der Median.

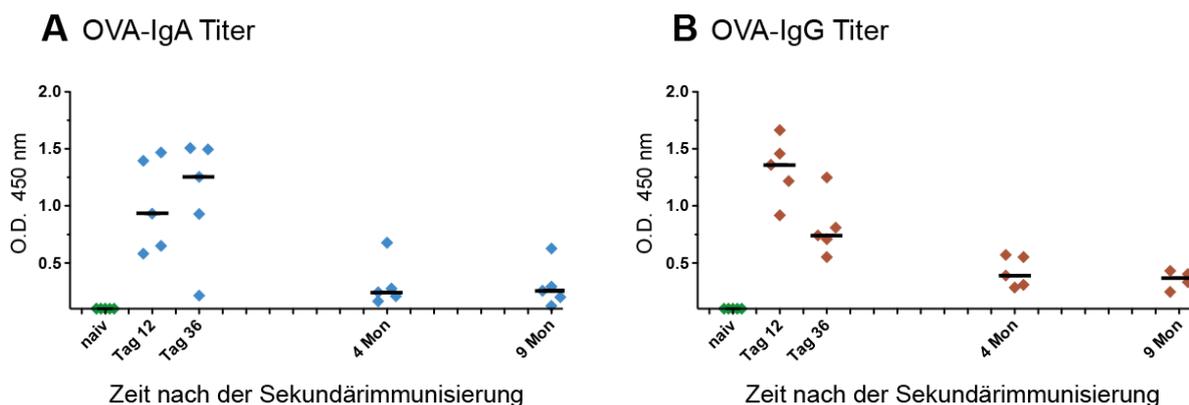
Die ELISpot-Analyse 9 Monate nach der sekundären oralen Immunisierung zeigt, dass sowohl OVA- als auch CT-spezifische persistierende Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark vorhanden waren. In beiden Organen war die Zahl der Plasmazellen, welche ihre Spezifität gegen CT entwickelten, stets 1,5 bis 3-fach höher als jene mit einer Spezifität gegen OVA. Ähnlich der Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden im Darm nur IgA+ ASC detektiert, während weder OVA- noch CT-spezifische ASC des Isotyps IgG nachgewiesen werden konnten. Weiterhin bestätigte die ELISpot-Analyse die durchflusszytometrischen Resultate darin, dass sich nach 9 Monaten nach der oralen Immunisierung die Mehrheit der induzierten Antigen-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark befindet.

#### 4.2.5 Intestinal induzierte Plasmazellen sezernieren Antigen-spezifische Antikörper und bilden einen stabilen Serumtiter

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob die persistierenden OVA-spezifischen ASC spezifische Antikörper in das Blutserum sezernieren und einen stabilen Titer aufrecht erhalten können. Dafür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten von zweimalig oral immunisierten sowie von nicht-immunisierten Tieren Serumproben entnommen und mittels ELISA analysiert. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der gemessenen und normierten Werte für die optische Dichte (O.D.) der ermittelten OVA-spezifischen Antikörper des Isotyps IgA (A, blau) und IgG (B, braun). Eine Normierung der analysierten 96-Lochplatten erfolgte durch die Anwendung eines konstanten Standardserums auf jeder Platte (Kap. 3.12.2).

Während in den Serumproben der nicht-immunisierten Tiere (grüne Symbole) keine OVA-spezifischen Antikörper detektiert werden konnten, waren nach der sekundären oralen Immunisierung mindestens bis zu 9 Monaten spezifische Antikörper gegen OVA von beiden untersuchten Isotypen detektierbar (Abb. 11 A, B). Das Maximum der OVA-spezifischen Antikörper des Isotyps IgA konnte an Tag 36 nachgewiesen werden, während das Maximum der Antikörper des Isotyps IgG bereits 12 Tage nach der Immunisierung gemessen wurde. Beide Titer sanken in dem darauf folgenden Untersuchungszeitraum ab, wobei sich zwischen 4 und 9 Monaten ein Plateau einstellte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die aus dem intestinalen Antigen-Kontakt resultierenden spezifischen ASC Antikörper produzieren, welche im Blutserum mindestens bis zu 9 Monaten nach der Immunisierung einen detektierbaren stabilen Serumtiter bilden.

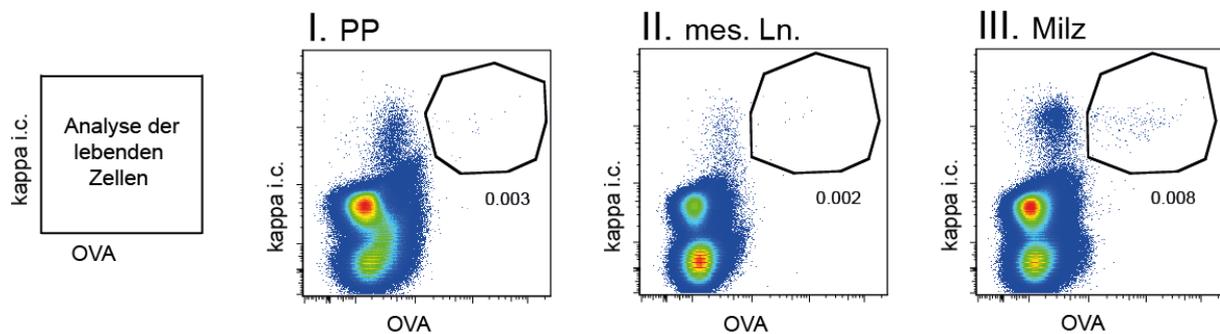


**Abb. 11: Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern im Blutserum mittels ELISA.**

Nach der zweimaligen oralen Immunisierung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten das Blutserum auf das Vorhandensein von OVA-spezifischen Antikörpern des Isotyps IgA (A) sowie IgG (B) mittels ELISA untersucht. Die Serumproben von oral immunisierten sowie nicht-immunisierten Tieren wurden in OVA-beschichteten 96-Lochplatten in doppelten Verdünnungsreihen analysiert. Die Einzelwerte der optischen Dichte wurden anhand eines konstanten Standards normiert. Jedes Symbol stellt ein Individuum dar, wobei innerhalb eines analysierten Zeitpunktes der Median dargestellt ist.

#### 4.2.6 Untersuchung der OVA-spezifischen Plasmazellen der Peyer'schen Plaques, der mesenterialen Lymphknoten und der Milz

Zur Überprüfung, ob weitere Organe OVA-spezifische Plasmazellen enthielten, wurden auch die Zellen der Peyer'schen Plaques, der mesenterialen Lymphknoten sowie der Milz durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnten bereits 12 Tage nach der sekundären oralen Immunisierung in den Peyer'schen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten nur wenige OVA-spezifische Plasmazellen detektiert werden. Daher wurde die Analyse in diesen Organen zu den späteren Zeitpunkten nicht weiter verfolgt. Die Abb. 12 zeigt je ein repräsentatives Punkt-Wolken-Diagramm der Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques (I.), der mesenterialen Lymphknoten (II.) und der Milz (III.), in welchen die Färbungen kappa i.c. und OVA gegenübergestellt wurden. Die Frequenzen der OVA-spezifischen ASC sind unter den Analysefenstern angegeben.



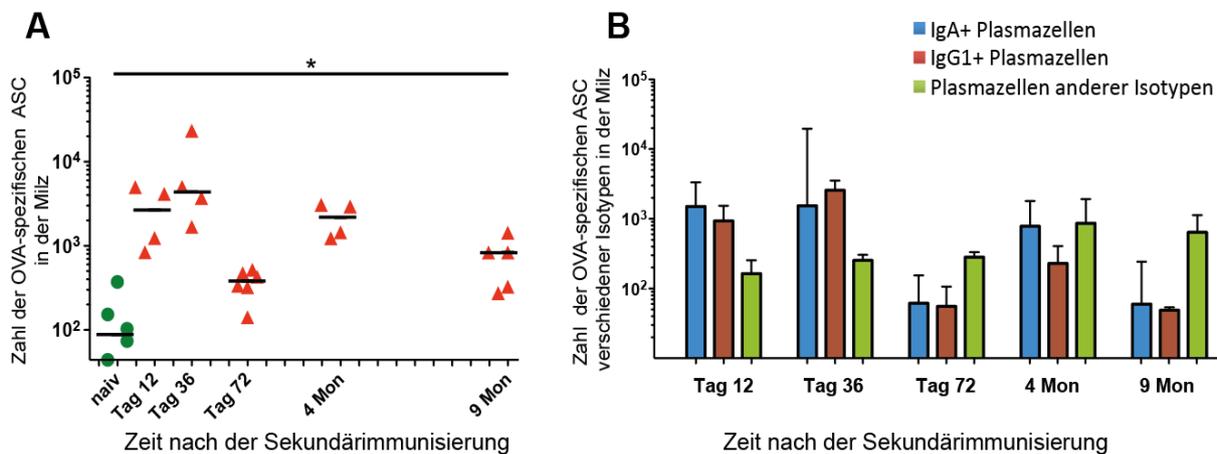
**Abb. 12: OVA-spezifische Plasmazellen in Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten und Milz.**

Die Lymphozyten der Peyer'schen Plaques (I.), den mesenterialen Lymphknoten (II.) und der Milz (III.) wurden 12 Tage nach der sekundären oralen Immunisierung durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von OVA-spezifischen Plasmazellen analysiert. Die Abbildung zeigt für jedes Organ ein repräsentatives Punkt-Wolken-Diagramm, wobei die Färbung der leichten kappa Kette und die Färbung mittels Fluorochrom-gekoppeltem OVA gegenübergestellt wurden. Abkürzungen: Peyer'sche Plaques (PP), mesenteriale Lymphknoten (mes. Ln.)

Die absolute Anzahl der OVA-spezifische ASC der Milz wurde ähnlich wie im Darm- und Knochenmarksgewebe über 9 Monate mittels Durchflusszytometrie ermittelt und wird in der Abb. 13 A zu den gegebenen Zeitpunkten dargestellt. Wie in der Lamina propria stieg die Zahl der OVA-spezifischen ASC in der Milz zunächst bis 36 Tage nach der Immunisierung an und sank in den nachfolgenden Monaten. Dennoch konnten  $8 \times 10^2$  persistierende OVA-spezifische ASC nach 9 Monaten in der Milz noch detektiert werden. Aus einem Vergleich der ermittelten Zahlen der OVA-spezifischen ASC von Darm, Knochenmark (Abb. 8) und Milz (Abb. 13 A) resultiert, dass sich die Mehrheit 9 Monate nach der oralen Immunisierung im Knochenmark befindet.

Auch im Dünndarm sowie der Milz können diese Zellen langfristig detektiert werden, wobei ihre Anzahl deutlich geringer ist. Die Milz enthielt um ein Drittel weniger OVA-spezifische Plasmazellen als der Darm.

Die durchflusszytometrische Analyse der Isotyp-Expression der in der Milz nachweisbaren OVA-spezifischen ASC zu den gegebenen Zeitpunkten nach der oralen Immunisierung ist in der Abb. 13 B dargestellt. Ähnlich wie im Knochenmark exprimierten diese Plasmazellen in den ersten Wochen nach der Immunisierung hauptsächlich IgA und IgG<sub>1</sub>. Während innerhalb des Untersuchungszeitraumes die Anteile der IgA<sup>+</sup> und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> OVA-spezifischen ASC deutlich abnahmen, dominierten in der Milz nach 9 Monaten kappa i.c.+ IgA<sup>-</sup> IgG<sub>1</sub><sup>-</sup>-negative OVA-spezifische Plasmazellen, deren Isotyp nicht bestimmt wurde.



**Abb. 13: Detektion und Analyse der OVA-spezifischen Plasmazellen der Milz nach oraler Immunisierung.**

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweifachen oralen Immunisierung sowie von nicht-immunisierten Kontroll-Tieren wurden die Zellen aus der Milz isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Diese Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der OVA-spezifischen ASC pro Milz. Jedes Symbol repräsentiert ein Einzeltier, wobei die Werte der naiven Tiere mit grünen und die der immunisierten Tiere mit roten Symbolen dargestellt sind. Für jeden Zeitpunkt wird der Median angezeigt. Mittels des Mann-Whitney-Tests wurde jeder Medianwert der verschiedenen Zeitpunkte nach Immunisierung mit dem Medianwert der naiven Gruppe getestet. **(B)** Die OVA-spezifischen Plasmazellen der Milz wurden durchflusszytometrisch auf ihre Isotypexpression analysiert, deren absolute Zahlen pro Milz hier nach IgA<sup>+</sup> (blau) und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (braun) sowie die zusammengefassten IgA<sup>-</sup> IgG<sub>1</sub><sup>-</sup>-negativen Plasmazellen (grün) differenziert dargestellt sind.

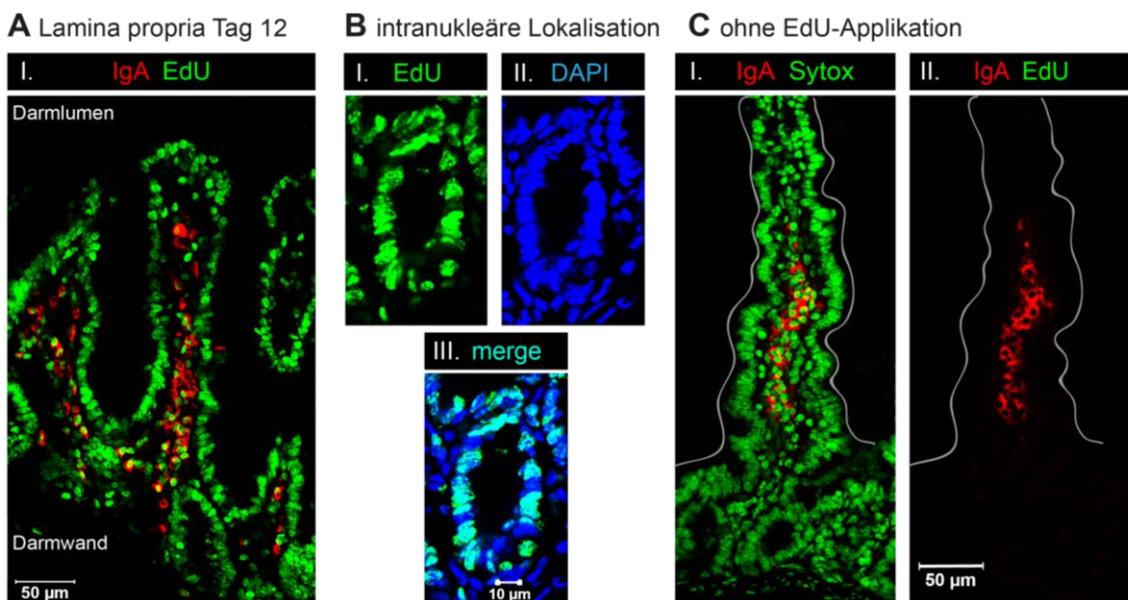
Im Überblick zeigen die bisherigen Ergebnisse (Abb. 8 bis Abb. 13), dass intestinal induzierte Plasmazellen hauptsächlich im Knochenmark sowie im Darm und geringfügig in der Milz persistieren können. Je nach Organ können dabei unterschiedliche Anteile der Isotypen IgA und IgG<sub>1</sub> detektiert werden.

### 4.3 Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Plasmazellen mittels EdU-Einbau in die DNA

#### 4.3.1 Proliferierende Zellen können effizient mit EdU markiert werden

Zur Ermittlung, ob es sich bei den detektierten persistierenden ASC um langlebige nicht-proliferative ASC handelt, wurde mit dem Tag der sekundären oralen Immunisierung (Tag 0) EdU kontinuierlich über 12 Tage verabreicht (Kap. 3.7.3). Diese Markierungsphase wird als „Pulse“ bezeichnet und stellt die Grundlage für die späteren „Pulse-Chase“- Experimente dar, in welchen nach Absetzen der EdU-Verabreichung langlebige, nicht-proliferative ASC anhand ihres inkorporierten EdU „verfolgt“ bzw. identifiziert werden.

Um zunächst das EdU-Signal zu verifizieren, wurden im direkten Anschluss der 12-tägigen Markierung Gewebeschnitte nach Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 3.10.5 und 3.9.4) am konfokalen Mikroskop analysiert. Die Abb. 14 A zeigt Darmzotten mit IgA+ ASC (rot) sowie zahlreichen EdU+ Zellkernen (grün), welche meist dem proliferierenden Epithel angehörten. Die intranukleäre Lokalisation des EdU wurde durch Anfärben der Zellkerne mit DAPI bestätigt, da EdU-Signale mit DAPI ko-lokalisierten (Abb. 14 B III., merge). In Gewebeschnitten von Kontroll-Tieren, welche kein EdU erhielten, wurden die IgA+ ASC (rot) sowie Zellkerne mit Sytox markiert (Abb. 14 C, I.), wobei keine EdU-Signale detektiert wurden (Abb. 14 C, II.).

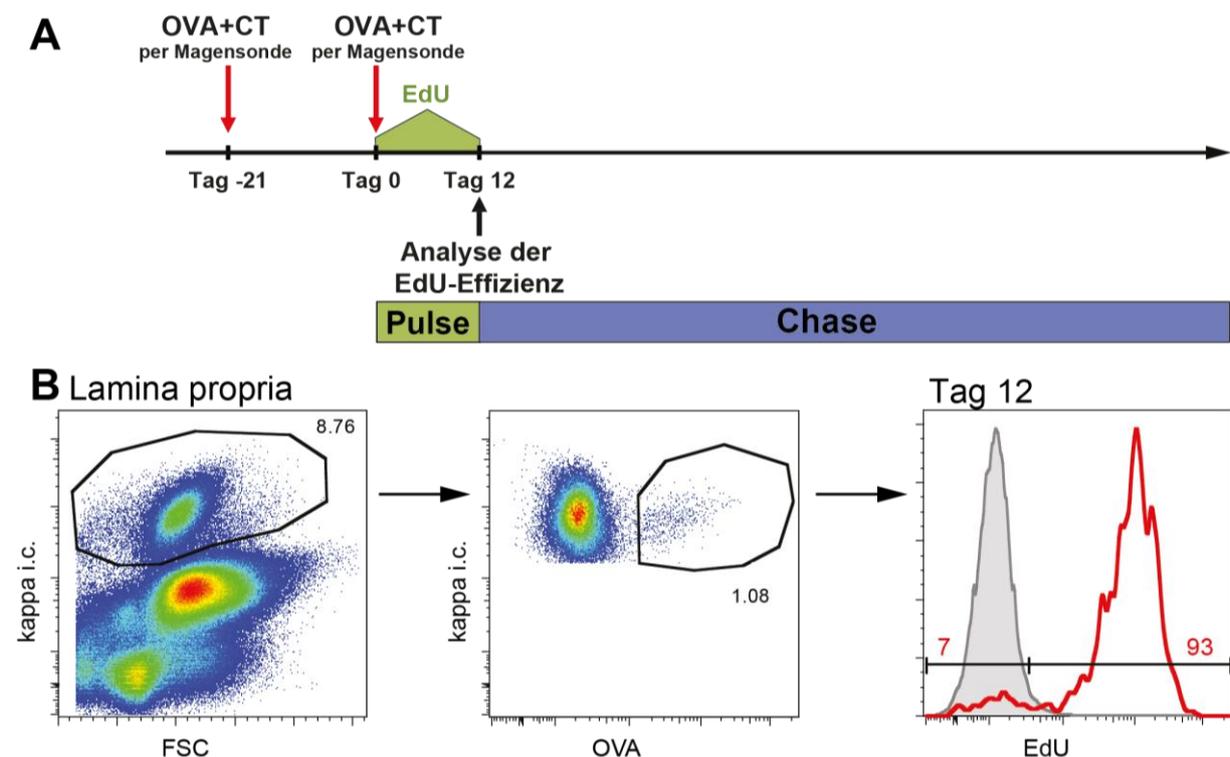


**Abb. 14: Histologischer Nachweis proliferierender Zellen durch den Einbau von EdU in die DNA.**

Mit der Sekundärimmunisierung erfolgte eine 12-tägige kontinuierliche EdU-Verabreichung mit der histologischen Analyse direkt im Anschluss Tag 12. **(A)** Dargestellt sind die EdU+ Zellkerne (grün) und die IgA i.c.+ ASC (rot). **(B)** Zur Ermittlung der intranukleären Lokalisation des EdU (I., grün) wurden die Zellkerne mit DAPI (II., blau) angefärbt und beide Signale simultan (III., merge) dargestellt. **(C)** Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte des Darmes von EdU-unbehandelten Tieren untersucht. Die Plasmazellen wurden mittels IgA (I., rot) identifiziert sowie die Zellkerne mit Sytox (I., grün) angefärbt. Es konnte kein EdU-Signal (II., grün) detektiert werden.

Da der Großteil der Antigen-spezifischen Plasmazellen nach dem Zweitkontakt mit dem Antigen generiert wird, wurde das EdU mit der sekundären Immunisierung über 12 Tage kontinuierlich verabreicht. Ein Überblick über das Immunisierungsschema und die Applikation von EdU gibt die Abb. 15 A. Um die Effizienz des EdU-Einbaus durch die intestinal induzierten ASC zu beurteilen, wurden die OVA-spezifischen ASC der Lamina propria direkt nach den 12 Tagen der EdU-Applikation durchflusszytometrisch auf ihren EdU-Gehalt untersucht. Dabei erfolgte zunächst die Identifikation der intestinalen kappa i.c.+ ASC (Kap. 4.1.2) sowie der OVA-spezifischen Subpopulation (Abb. 15 B). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel für die EdU-Inkorporation der OVA-spezifischen ASC im Darm von Tag 12 (rote Linie). Als Kontrolle wurden intestinale Plasmazellen von Tieren gefärbt und analysiert, welchen kein EdU verabreicht wurde (graue Schattierung).

Das Ergebnis zeigt, dass über 90 % der intestinal induzierten OVA-spezifischen ASC mittels EdU markiert werden konnten, während in der Kontrolle kein EdU detektiert wurde.

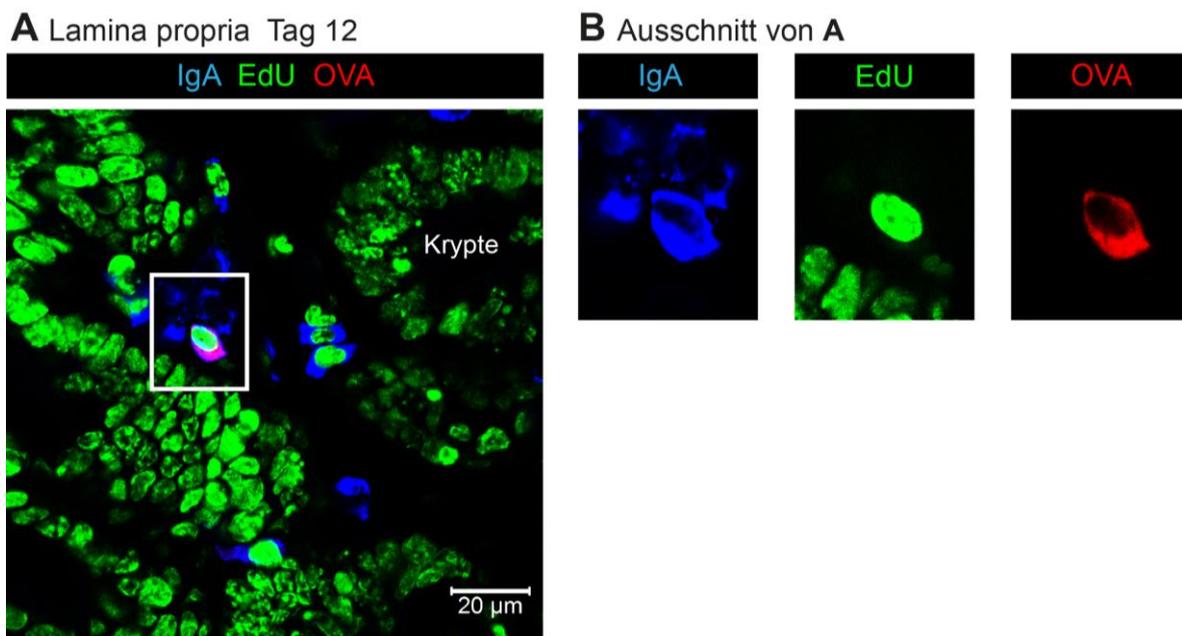


**Abb. 15: Intestinal induzierte Plasmazellen können mit EdU effizient markiert werden.**

(A) Die Übersicht zeigt schematisch die zweimalige orale Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit OVA und CT. Mit dem Tag der sekundären Immunisierung (Tag 0) wurde EdU für 12 Tage kontinuierlich verabreicht. Zur Überprüfung der Effizienz des EdU-Einbaus in die DNA wurden die Lymphozyten der Lamina propria an Tag 12 isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (B) Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der Identifikation kappa i.c.+ ASC (links) sowie der OVA-spezifischen Plasmazellen (Mitte). Zur Beurteilung der EdU-Effizienz wurden die OVA-spezifischen ASC auf ihre EdU-Inkorporation analysiert (rote Linie) und deren Frequenz angegeben. Als Kontrolle dienten mukosale ASC von Tieren, welchen kein EdU verabreicht wurde (grau).

### 4.3.2 Lokalisation der EdU+ OVA-spezifischen Plasmazellen nach der Markierungsphase im Gewebeverband

Um die intestinal induzierten EdU+ OVA-spezifischen Plasmazellen 12 Tage nach der Immunisierung, das heißt direkt im Anschluss an die EdU-Markierungsphase, innerhalb des Gewebes nachzuweisen und zu lokalisieren, wurden Gewebeschnitte der Lamina propria und des Knochenmarks angefertigt und nach Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Die Färbung des Dünndarmgewebes erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen kappa, IgA sowie mit Fluorochrom-gekoppelten OVA, wie im Kap. 4.1.2 beschrieben. Abb. 16 A zeigt das Darmgewebe im Bereich der Krypten. Es ist erkennbar, dass während der Markierungsphase neben den stark proliferierenden Epithelzellen auch zahlreiche IgA+ ASC (blau) das EdU (grün) inkorporierten. OVA-spezifische Plasmazellen (rot) konnten zumeist als IgA+ EdU+ ASC identifiziert werden, welche überwiegend im Bereich der Krypten des Darmgewebes lokalisiert waren (weißer Rahmen). Zur besseren Darstellung wurde dieser Ausschnitt vergrößert und die einzelnen Komponenten getrennt dargestellt (Abb. 16 B).

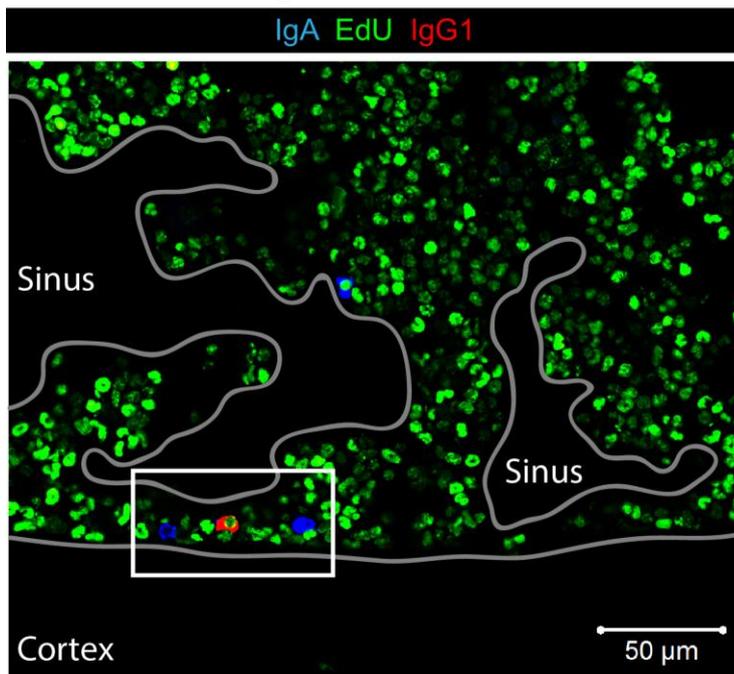


**Abb. 16: Histologische Detektion der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria.**

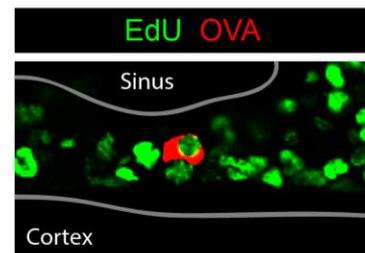
12 Tage nach der sekundären Immunisierung, direkt im Anschluss der EdU-Applikation, wurden vom Dünndarm Gewebeschnitte angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen IgA (blau) sowie mit Fluorochrom-gekoppelten OVA (rot) gefärbt. Nach Fluoreszenzmarkierung des eingebauten EdU (grün) wurden die Gewebeschnitte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. 63 x Vergrößerung nach Aufnahme mit Öl.

Für die Untersuchung des Knochenmarks wurden Gewebsschnitte mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen kappa, IgA, IgG<sub>1</sub> und Laminin sowie mit Fluorochrom-gekoppelten OVA gefärbt. Die EdU-Detektion erfolgte nach dem Protokoll in Kap. 3.9.4. Die Abb. 17 A gibt zunächst einen Überblick über Parenchym und Sinusoide eines kortexnahen Bereiches des Knochens von Tag 12. Als blutbildendes Organ inkorporierten erwartungsgemäß zahlreiche Zellen EdU (grün), wobei die intranukleäre Lokalisation durch eine Ko-Färbung mit DAPI bzw. Sytox stets überprüft wurde (nicht dargestellt). Im Knochenmark konnten IgA<sup>+</sup> sowie IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> OVA-spezifische ASC detektiert werden, wobei die Mehrheit EdU<sup>+</sup> war. Zur besseren Darstellung wurde ein Ausschnitt (weißer Rahmen) einer OVA-spezifischen ASC des Isotyps IgG<sub>1</sub> vergrößert, welche eindeutig EdU im Zellkern aufwies (Abb. 17 B). OVA-spezifische ASC waren zumeist in unmittelbarer Nähe von Gefäßen lokalisiert, wobei dies durch eine Anfärbung von Laminin, einem Glykoprotein der Basallamina zur Darstellung von Gefäßen, bestätigt wurde (Abb. 17 C).

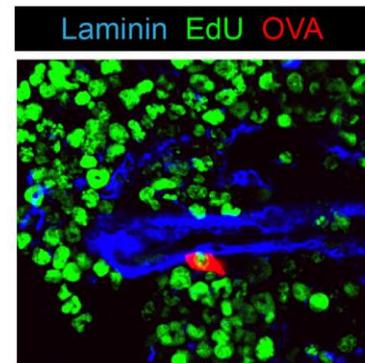
**A** Knochenmark Tag 12



**B** Ausschnitt von A



**C** Knochenmark Tag 12

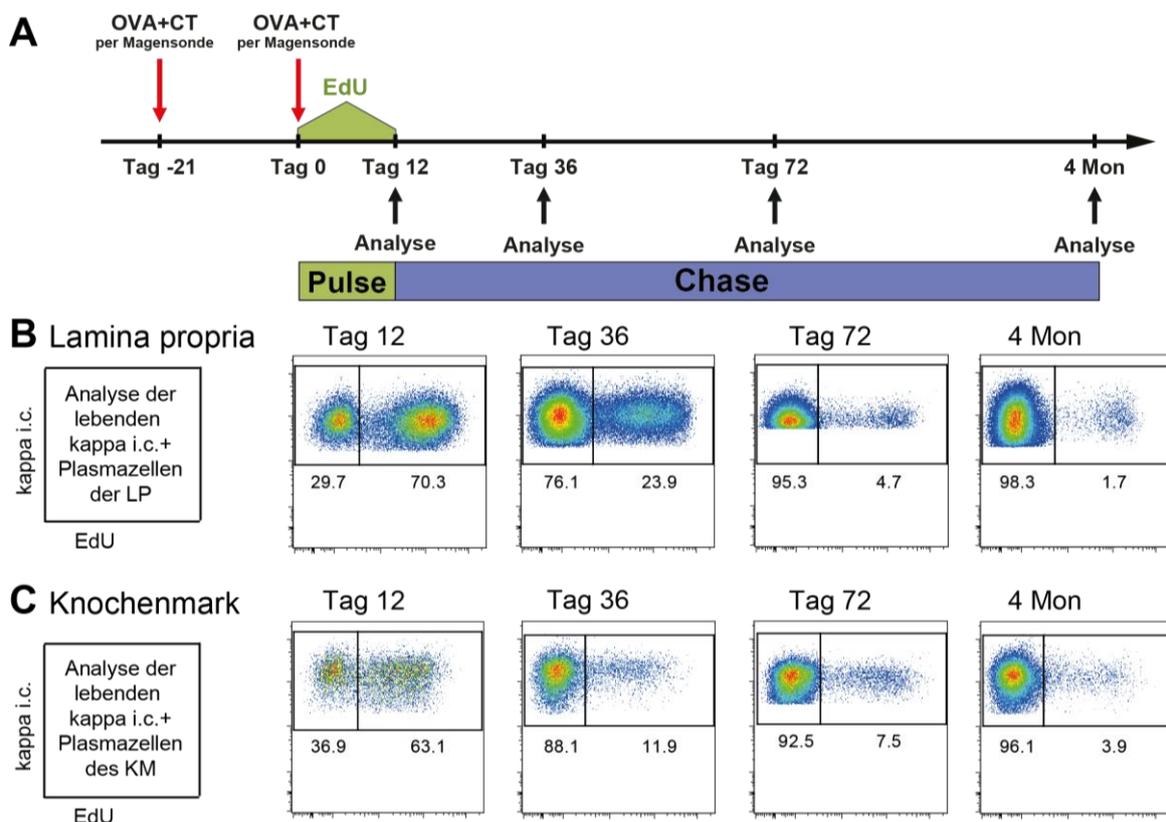


**Abb. 17: Histologische Detektion der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark.**

12 Tage nach der sekundären Immunisierung und EdU-Applikation wurden von Femurknochen Gewebeschritte angefertigt und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IgA, IgG<sub>1</sub>, Laminin sowie mit Fluorochrom-gekoppelten OVA gefärbt. Nach Fluoreszenzmarkierung von EdU wurden die Gewebeschritte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. **(A)** Kortexnaher Bereich des Femur mit schematisch angezeigten Sinusoiden. Dargestellt sind die EdU<sup>+</sup> Zellkerne (grün), IgA<sup>+</sup> (blau) und IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> (rot) Plasmazellen. **(B)** Der Bereich innerhalb des weißen Rahmens von (A) ist vergrößert angezeigt und repräsentiert eine sinusnahe OVA-spezifische Plasmazelle (rot) vom Isotyp IgG<sub>1</sub>, wobei im Zellkern EdU (grün) detektiert werden konnte. **(C)** Mittels Fluoreszenzmarkierung von Laminin (blau) konnten OVA-spezifische ASC (rot) mit intranukleärem EdU (grün) oft in unmittelbarer Nähe zum Laminin nachgewiesen werden. 20 x Vergrößerung.

### 4.3.3 Detektion von langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark mittels Durchflusszytometrie

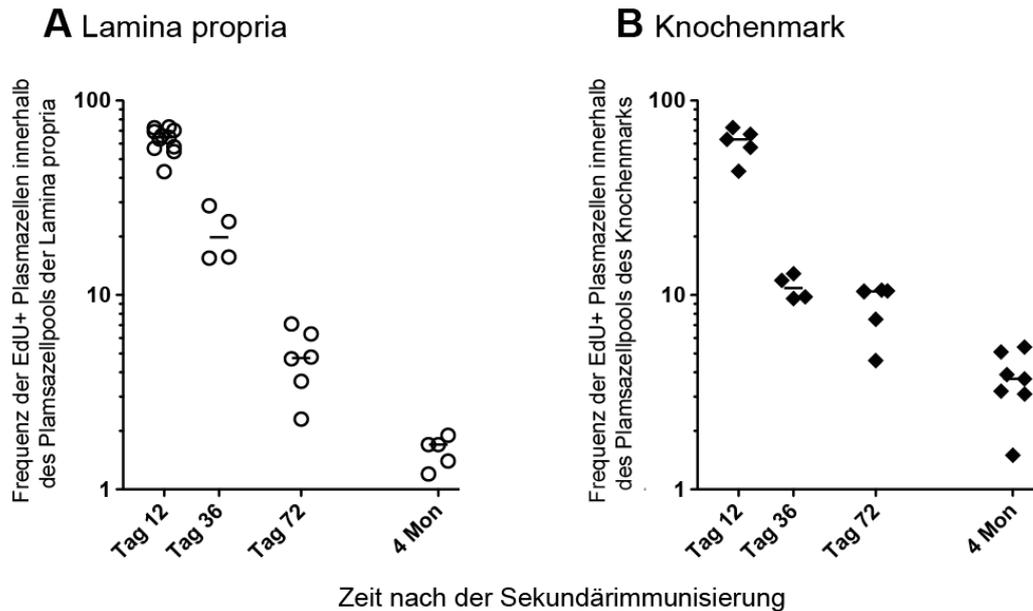
Im Folgenden wurde untersucht, ob die mukosal induzierten Plasmazellen, ähnlich einer systemischen Immunantwort, das Potenzial der Langlebigkeit aufweisen. Dabei wurden die kappa i.c.+ ASC der Lamina propria und des Knochenmarks zunächst unabhängig ihrer Spezifität durchflusszytometrisch auf ihre EdU-Inkorporation analysiert. Die Tiere wurden nach dem Schema in Abb. 18 A zweimalig oral immunisiert und erhielten über 12 Tage kontinuierlich EdU, wobei im Anschluss über mehrere Wochen bis zu 4 Monaten kein EdU mehr verabreicht wurde. Dabei verlieren proliferierende, kurzlebige Zellen das inkorporierte EdU durch die DNA-Synthese, während nicht-proliferative, langlebige Zellen das EdU stabil im Zellkern behalten (Kap. 3.7.3). Demnach weist eine Detektion von EdU während der EdU-fütterungsfreien Phase auf die Langlebigkeit dieser Zellen hin („Chase“). Exemplarische Punkt-Wolken-Diagramme der durchflusszytometrischen Analyse und der ermittelten Frequenzen von EdU+ und EdU- ASC innerhalb des gesamten kappa i.c.+ Plasmazell-kompartiments beider Organe werden in der Abb. 18 B, C dargestellt.



**Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens mittels EdU-Einbau von ASC.**

(A) Schema der oralen Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit OVA und CT mit 12-tägiger EdU-Markierung (Pulse). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die isolierten Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Punkt-Wolken-Diagramme der verschiedenen Zeitpunkte mit den Frequenzen der EdU+ sowie EdU- ASC innerhalb der kappa i.c.+ ASC der Lamina propria (B) sowie des Knochenmarks (C).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass die Mehrheit der Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks EdU innerhalb der 12 Tage inkorporierten (Abb. 18 B, C). In den nachfolgenden Wochen ging der Anteil EdU+ ASC deutlich zurück, wobei in beiden Organen nach 4 Monaten noch immer eindeutig EdU+ ASC durchflusszytometrisch nachweisbar waren. Die vollständige statistische Analyse zeigt die Abb. 19, welche die Frequenz der EdU+ ASC innerhalb des gesamten Plasmazellkompartiments der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B) darstellt.



**Abb. 19: Frequenz der EdU+ ASC innerhalb der Plasmazellkompartimente von Darm und Knochenmark.** Die Lymphozyten der Lamina propria und des Knochenmarks wurden nach zweimaliger oraler Immunisierung sowie einer 12-tägigen Markierungsphase mit EdU zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die statistische Darstellung zeigt die Frequenz der EdU+ Plasmazellen innerhalb der kappa i.c.+ Plasmazellpopulation der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B). Jedes Symbol entspricht einem Individuum, wobei pro Zeitpunkt der Median bei logarithmischer Angaben der Frequenzen dargestellt ist.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der EdU-Inkorporation innerhalb der ASC zeigt, dass nach 12 Tagen rund zwei Drittel der Plasmazellen beider Organe als EdU+ detektiert werden konnten (Median Lamina propria 64,8% bzw. Knochenmark 63,1%) (Abb. 19 A, B). In beiden Organen geht der Anteil der EdU+ ASC zurück, wobei die intestinalen Plasmazellen (Abb. 19 A) im Median zunächst 19,8% (Tag 36) bzw. 4,8% (Tag 72) EdU+ ASC enthalten. 4 Monate nach der sekundären Immunisierung waren im Median noch 1,7% aller intestinalen Plasmazellen als EdU+ detektierbar.

Im Knochenmark (Abb. 19 B) sank der Anteil der EdU+ Plasmazellen ebenfalls, wobei nach 4 Monaten noch 3,7% (Median) der Plasmazellen als EdU+ detektiert werden konnten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass innerhalb einer 12-tägigen Markierungsphase durch EdU die Mehrheit der Plasmazellen (rund zwei Drittel) beider Kompartimente aufgrund ihrer Teilungsaktivität das EdU einbaute. Während der Großteil der Plasmazellen weiterhin proliferierte und folglich das EdU verlor, behielten einige Plasmazellen in beiden Organen das EdU über mindestens 4 Monate stabil eingebaut. Sie stellen nicht-proliferierende langlebige ASC dar. Demzufolge können im Darmgewebe langlebige Plasmazellen nachgewiesen werden. Die Frequenz langlebiger Plasmazellen ist im Knochenmark 2-fach höher als in der Lamina propria, wobei aufgrund des größeren Plasmazellkompartiments des Knochenmarks folglich eine 4-fach höhere Zahl langlebiger EdU+ Plasmazellen resultiert.

#### **4.3.4 Untersuchung der mukosal induzierten OVA-spezifischen Plasmazellen auf ihr Potenzial zur Langlebigkeit in Lamina propria und Knochenmark**

Ob auch intestinal induzierte Plasmazellen in das Knochenmark einwandern und dort ähnlich wie nach einer systemischen Immunantwort langlebig werden können, ist bisher nicht bekannt und soll im Folgenden untersucht werden.

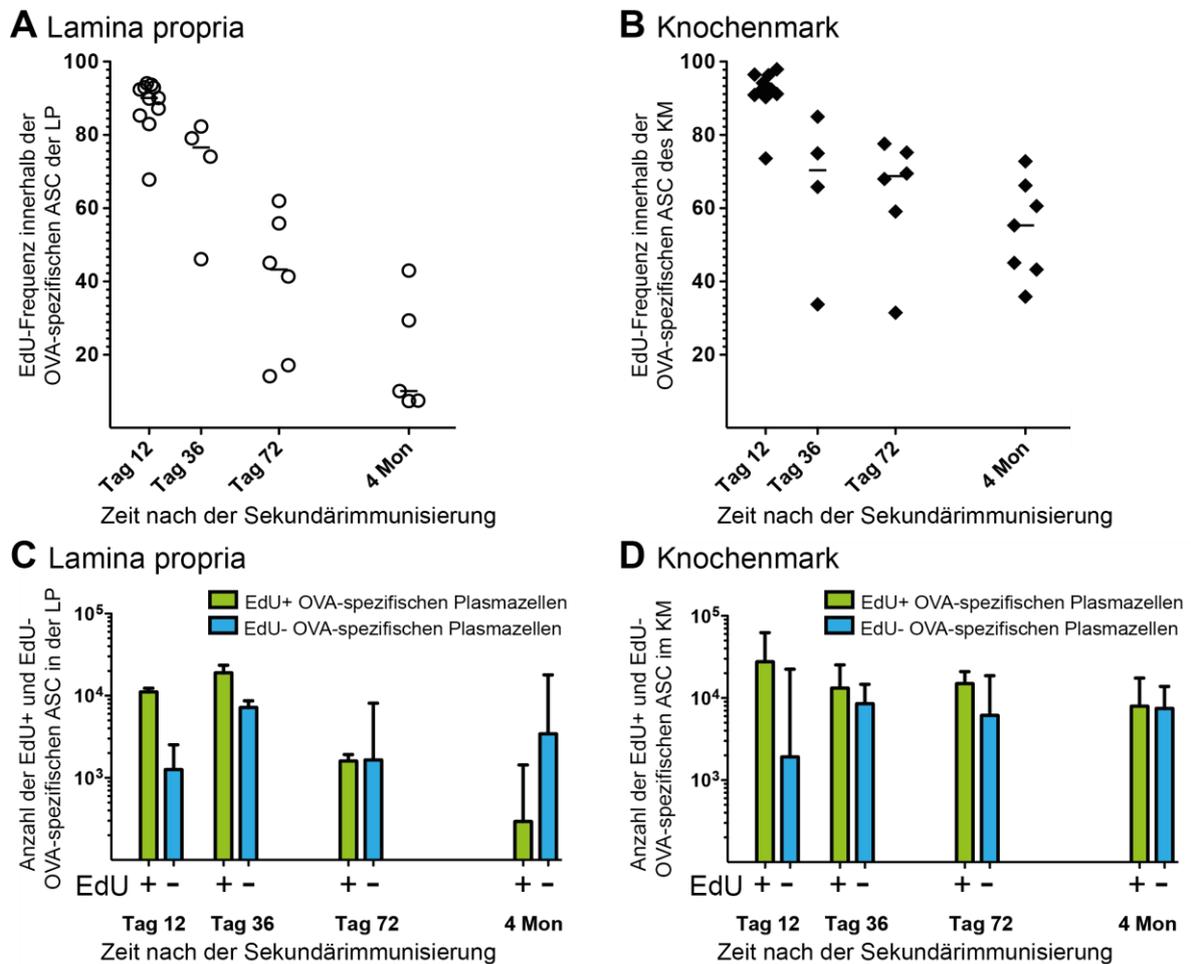
Anhand der OVA-Spezifität konnten die mukosal induzierten Plasmazellen eindeutig identifiziert werden und mittels der Anwendung von EdU ist die Analyse des Proliferationsverhaltens dieser Plasmazellen möglich. Wie bereits in der Effizienzanalyse gezeigt, inkorporierten über 90% der OVA-spezifischen intestinalen Plasmazellen EdU während der Markierungsphase (Abb. 15 B). Wie viele dieser mukosal induzierten Plasmazellen ohne Zellteilung persistieren können, wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Abb. 20 zeigt die statistische Analyse der EdU-Frequenz innerhalb der OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B) über einen Zeitraum bis zu 4 Monaten.

Das Ergebnis zeigt, dass zunächst in beiden Organen der Anteil der EdU+ Plasmazellen über die Zeit abnimmt. Dabei wiesen in der Lamina propria (Abb. 20 A) an Tag 36 im Median 77,6% und an Tag 72 im Median 43,3% der OVA-spezifische ASC ein EdU-Signal auf. Nach 4 Monaten enthielten im Median noch 10% dieser Plasmazellen EdU. Ähnlich der Lamina propria waren über 90% der OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks EdU+ direkt im Anschluss der Markierungsphase Tag 12 (Abb. 20 B). In der nachfolgenden EdU-freien Phase sank dieser Anteil über 70,4 % (Median Tag 36) auf 68,8% (Median Tag 72). 4 Monate nach der sekundären Immunisierung konnten noch bei 55,3% der OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks das EdU nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Teil der mukosal induzierten ASC nach der Migration sowohl in der Lamina propria als auch im Knochenmark ohne weitere Zellteilung über mindestens 4 Monate persistieren kann. Daraus lässt sich folgern, dass mukosal induzierte ASC

innerhalb des Darmgewebes als langlebige Plasmazellen persistieren können und darüber hinaus zum langlebigen Plasmazellkompartiment des Knochenmarks beitragen.

Abb. 20 C und D zeigen die ermittelten absoluten Zahlen der EdU+ (grün) und EdU- (blau) OVA-spezifischen ASC der beiden Organe. Daraus ist ersichtlich, dass die Zahl der persistierenden EdU+ ASC ab Tag 36 gewebespezifisch in beiden Organen abnahm, wobei die Zahl der EdU-negativen Zellen relativ konstant blieb. Das Absinken der EdU+ Plasmazellen erfolgte im Knochenmark in einem deutlich geringeren Ausmaß als in der Lamina propria, daher konnten nach 4 Monaten im Knochenmark 27-fach mehr EdU+ OVA-spezifische ASC detektiert werden als in der Lamina propria.



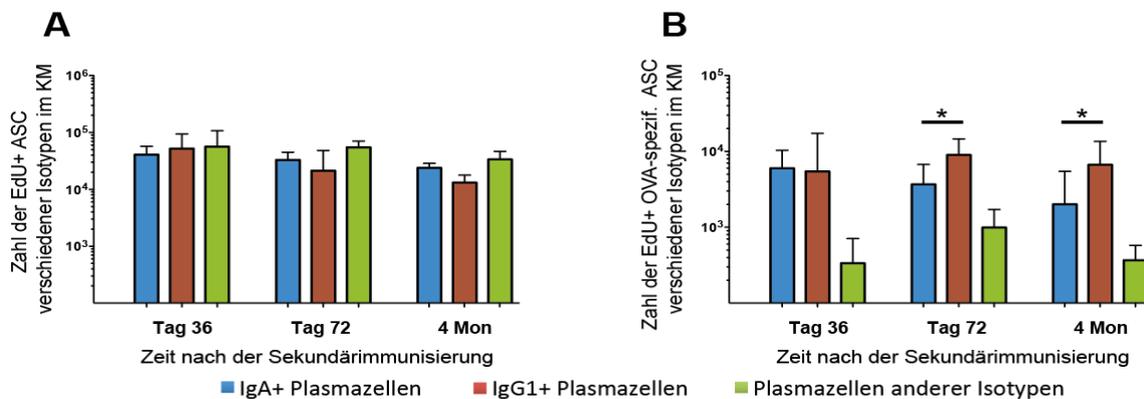
**Abb. 20: Mukosal induzierte EdU+ OVA-spezifische ASC können ohne Zellteilung persistieren.**

Die Lymphozyten der Lamina propria und des Knochenmarks wurden nach zweimaliger oraler Immunisierung sowie einer 12-tägigen EdU-Markierung zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Frequenzen der EdU+ ASC innerhalb der OVA-spezifischen Plasmazellpopulation der Lamina propria (A) und des Knochenmarks (B). Jedes Symbol entspricht einem Individuum, wobei für jeden Zeitpunkt der Median angegeben ist. Die absolute Anzahl der EdU+ (grün) und der EdU- (blau) OVA-spezifischen ASC der Lamina propria (C) und des Knochenmarks (D) wurden bis zu 4 Monate ermittelt und mit dem Range dargestellt.

### 4.3.5 Untersuchung der Isotyp-Expression der langlebigen Plasmazellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten die Isotypverteilung der kappa i.c.+ Plasmazellen des Knochenmarks unabhängig ihrer Spezifität (Abb. 5) sowie die Isotypenverteilung innerhalb der OVA-spezifischen Plasmazellen (Abb. 9).

Eine frühere Studie detektierte mittels 10-tägiger Markierung der Zellen eine verzögerte Proliferationsrate von IgA+ und IgG+ ASC im Vergleich zu IgM+ ASC des Knochenmarks (30). Um zu ermitteln, ob es einen Zusammenhang zwischen der Langlebigkeit und der Isotyp-Expression der Plasmazellen des Knochenmarks gibt, sollten daher im Folgenden ausschließlich die langlebigen EdU+ ASC analysiert werden. Dafür wurden einerseits die langlebigen kappa i.c.+ , EdU+ ASC unabhängig ihrer Spezifität (Abb. 21 A) und andererseits die langlebigen OVA-spezifischen kappa i.c.+ , EdU+ ASC (Abb. 21 B) ab Tag 36 auf ihre Isotypen untersucht.



**Abb. 21: Analyse der Isotypexpression der langlebigen Plasmazellen des Knochenmarks.**

Die Lymphozyten des Knochenmarks wurden nach zweimaliger Immunisierung sowie einer 12-tägigen Markierungsphase mit EdU zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden nur kappa i.c.+ EdU+ Plasmazellen analysiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper nach ihrem Isotyp IgA (blau) und IgG<sub>1</sub> (braun) untersucht, wobei eine dritte Gruppe die kappa+ IgA- IgG<sub>1</sub>- Plasmazellen (grün) zusammenfasst. **(A)** Absoluten Zahlen der einzelnen Isotypen der langlebigen Plasmazellen des Knochenmarks unabhängig ihrer Spezifität. **(B)** Absoluten Zahlen der einzelnen Isotypen der langlebigen OVA-spezifischen Plasmazellen des Knochenmarks. Dargestellt ist der Median mit Range, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen IgA und IgG<sub>1</sub> innerhalb der einzelnen Zeitpunkte durch den Mann-Whitney ermittelt wurde.

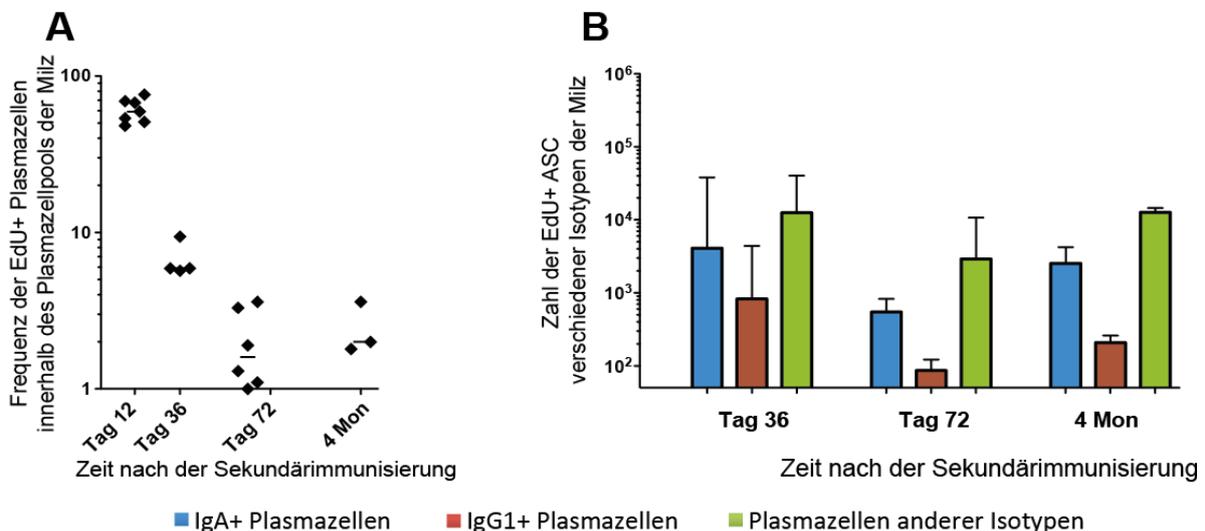
Das Ergebnis zeigt, dass die EdU+ ASC ungeachtet ihrer Spezifität aus ähnlichen Anteilen IgA, IgG<sub>1</sub> sowie zusammengefasste nicht-untersuchte Isotypen zusammensetzen und auch über den Untersuchungszeitraum bis zu 4 Monaten anteilig unverändert bleiben (Abb. 21 A). Diese Resultate weisen keine Unterschiede bzgl. der Lebensspanne und der Isotyp-Expression auf.

Bei der Betrachtung der EdU+ OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks ist jedoch ersichtlich, dass mit zunehmender Lebensspanne der Plasmazellen die Zahl der IgG<sub>1</sub>-exprimierenden Plasmazellen annähernd konstant blieb, während die Zahl der langlebigen IgA+ ASC abnahm (Abb. 21 B).

Daraus resultierte innerhalb der langlebigen OVA-spezifischen Plasmazellen eine signifikante Zunahme des Anteils der IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> im Vergleich zu IgA<sup>+</sup>. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass innerhalb der mukosal induzierten, persistierenden Plasmazellen, welche in das Knochenmark migrieren, IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> ASC eine bessere Überlebenschance bzw. eine längere Überlebensspanne aufweisen als IgA<sup>+</sup> ASC.

Die Untersuchungen der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria, ergaben, dass die intestinalen ASC zu den späten Zeitpunkten nahezu vollständig den Isotyp IgA exprimierten (keine Abbildung). Wie bereits in Abb. 9 gezeigt, konnten nach Tag 72 generell nur noch OVA-spezifische Plasmazellen vom Isotyp IgA detektiert werden, folglich bestand auch die langlebige Population der intestinalen OVA-spezifischen Plasmazellen 4 Monate nach der oralen Immunisierung zu 100% aus IgA<sup>+</sup> Plasmazellen. Das Potenzial zur Langlebigkeit intestinaler ASC zeigen demnach nur Plasmazellen des Isotyps IgA.

Es ist bekannt, dass auch die Milz langlebige Plasmazellen beherbergen kann (14, 30). Die hier durchgeführte durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass im Median 2% der detektierten ASC in der Milz als nicht-proliferierende Zellen persistieren können (Abb. 22 A). Die Analyse der Isotyp-Expression zeigt, dass in der Milz ASC der Isotypen IgA als auch IgG<sub>1</sub> langlebig werden konnten, wobei die Mehrheit der ASC (über 80%) weder IgA noch IgG<sub>1</sub> exprimierte, sondern einem hier nicht-untersuchten Isotyp angehörig war (Abb. 22 B).



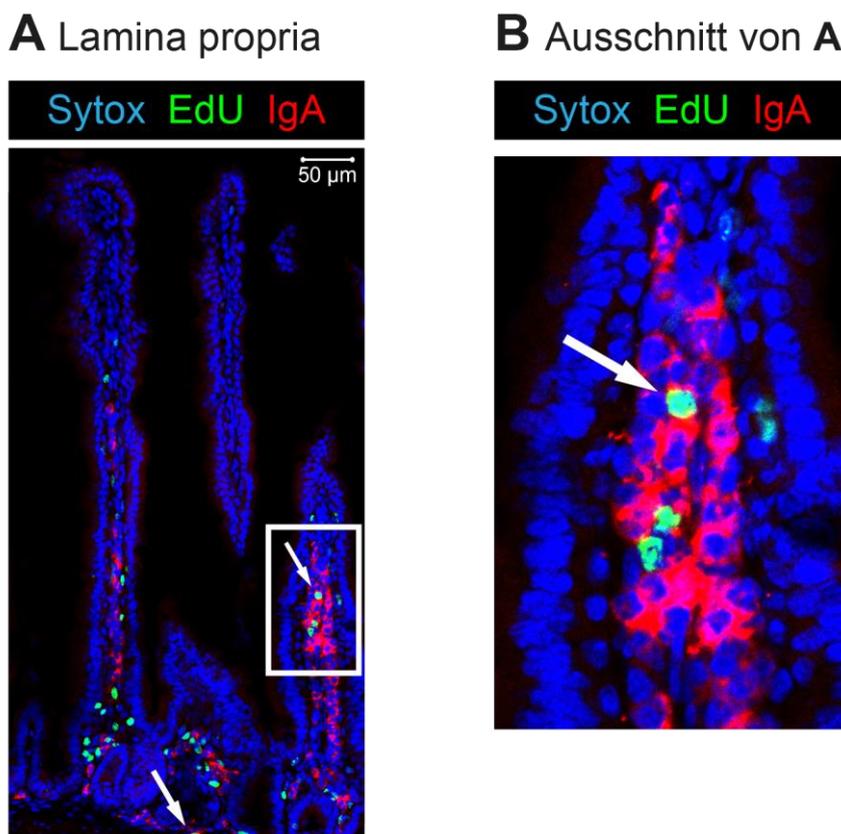
**Abb. 22. Analyse der langlebigen Plasmazellen der Milz auf ihre Isotypexpression.**

Die Lymphozyten der Milz wurden nach zweimaliger Immunisierung sowie einer 12-tägigen Markierung mit EdU zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Die Abbildung zeigt die Frequenz der EdU<sup>+</sup> ASC innerhalb der gesamten Plasmazellpopulation der Milz. Jedes Symbol repräsentiert ein Individuum, wobei innerhalb jeder Gruppe pro Zeitpunkt der Median angezeigt ist. **(B)** Die Isotypen der kappa i.c.+ EdU<sup>+</sup> ASC der Milz wurden mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen IgA (blau) und IgG<sub>1</sub> (braun) untersucht und eine dritte Gruppe, die kappa<sup>+</sup> IgA<sup>-</sup> IgG<sub>1</sub><sup>-</sup> ASC (grün) zusammenfasst. Die Darstellung zeigt die absoluten Zahlen der einzelnen langlebigen ASC unabhängig ihrer Spezifität als Median mit Range.

#### 4.3.6 Histologische Untersuchung der langlebigen ASC im Gewebeverband

Um die langlebigen Plasmazellen innerhalb des Gewebeverbands zu lokalisieren, wurden Gewebeschnitte des Dünndarms sowie des Femurs 4 Monate nach der sekundären oralen Immunisierung angefertigt und gefärbt. Dafür wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen die leichte kappa Kette sowie IgA, Fluorochrom-gekoppeltes OVA und die Fluoreszenz-Markierung des EdU herangezogen.

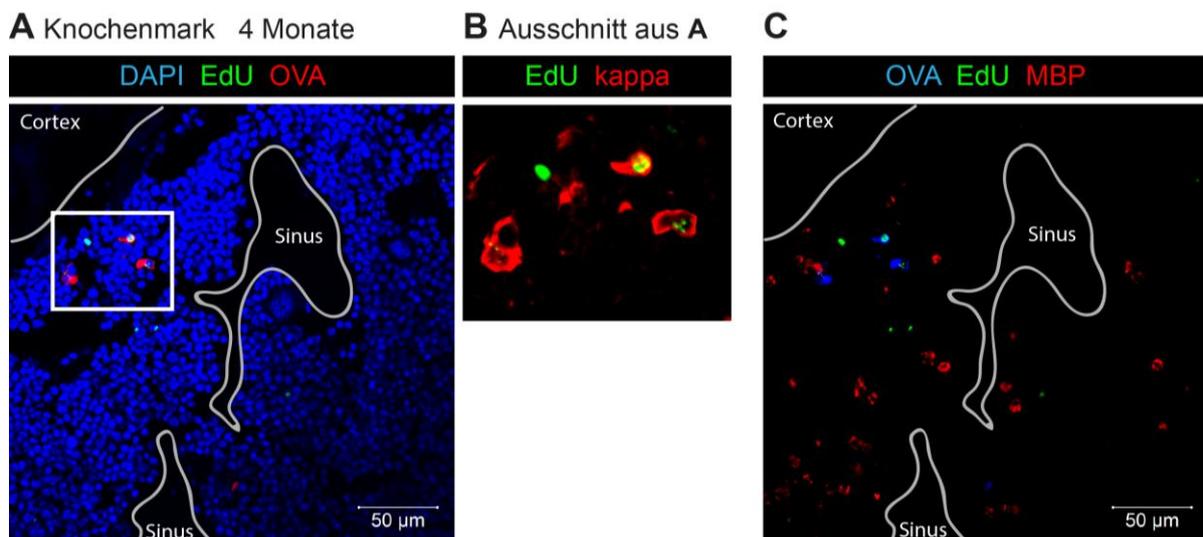
Die Zellkerne der in Abb. 23 A dargestellten Zotten der Lamina propria 4 Monate nach der oralen Immunisierung wurden mit Sytox (blau) markiert. Die Überwiegende Mehrheit der intestinalen IgA+ ASC (rot) war EdU-negativ, wobei vereinzelt EdU+ ASC (grün) detektiert werden konnten (weiße Pfeile). Zur besseren Übersicht wurde hier ein Beispiel vergrößert dargestellt (Abb. 23 B). Diese langlebigen Plasmazellen waren sowohl im Bereich der Krypten als auch innerhalb der Darmvilli lokalisiert und exprimierten ausnahmslos den Isotyp IgA. Darüber hinaus konnten vereinzelt EdU+ Zellkerne detektiert werden, welche nicht der Plasmazellpopulation angehörten (kappa- IgA-), sie wurden nicht weiter identifiziert.



**Abb. 23: Histologische Untersuchung der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria.**

4 Monate nach der sekundären Immunisierung wurden Gewebeschnitte des Dünndarms angefertigt und nach der Immunfluoreszenzfärbung histologisch analysiert. **(A)** Die Darstellung zeigt Darmzotten, deren Zellkerne mit Sytox (blau), IgA+ ASC (rot) sowie intranukleäres EdU (grün) markiert wurden. Die weißen Pfeile weisen auf zwei langlebige EdU+ Plasmazellen, welche basal nahe der Darmwand bzw. innerhalb eines Villus lokalisiert sind. Der Ausschnitt in dem weißen Rahmen mit einer langlebigen Plasmazelle wird in **(B)** vergrößert dargestellt.

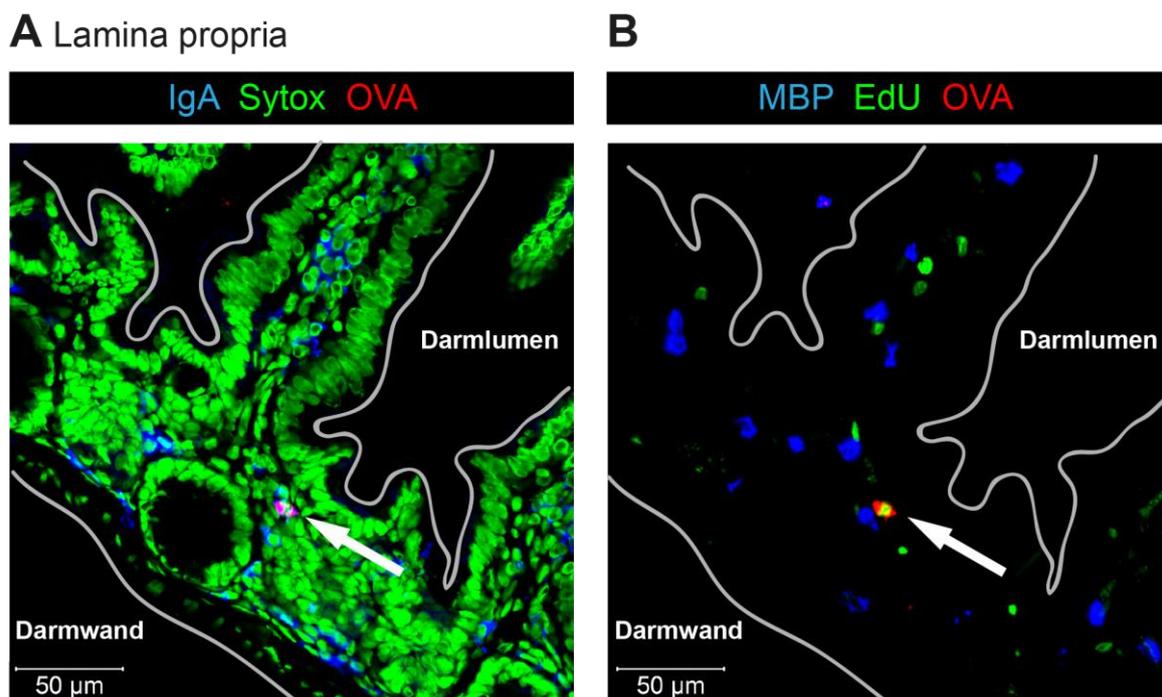
Auch im Knochenmark konnten 4 Monate nach der oralen Immunisierung EdU+ ASC sowie langlebige OVA-spezifische Plasmazellen histologisch detektiert werden (Abb. 24). Diese waren überwiegend innerhalb des Parenchyms lokalisiert, selten in unmittelbarer Nähe von Gefäßen. Abb. 24 A zeigt einen Ausschnitt vom Knochenmarkgewebe, in welchem drei OVA-spezifische ASC (rot) detektiert werden konnten (weißer Rahmen). In einer vergrößerten Darstellung ist ersichtlich, dass es sich bei diesen OVA-spezifischen ASC intranukleär z.T. um EdU+ bzw. EdU- handelte (Abb. 24 B). Nachdem kürzlich gezeigt wurde, dass eosinophile Granulozyten im Knochenmark in unmittelbarer Nähe von Plasmazellen lokalisiert sind und als APRIL- und IL-6-Produzenten ihr Überleben im Knochenmark fördern (44), wurden daher nach Fluorochrom-gekoppelter Antikörperfärbung die MBP-haltigen eosinophilen Granulozyten markiert. Dieser Marker wird für die Identifikation eosinophiler Granulozyten durch Bindung an das basische Protein (MBP – *major basic protein*) eingesetzt (133). Das Ergebnis der MBP-Markierung zeigt, dass im Knochenmark EdU+ Plasmazellen sowohl in unmittelbarer Nähe als auch ohne Kontakt zu den eosinophilen Granulozyten detektiert werden konnten (Abb. 24 C). Die Untersuchung einer Ko-Lokalisation der beiden Zelltypen wurde im Knochenmark nicht weiter verfolgt. Die MBP+ eosinophilen Granulozyten wiesen 4 Monate nach der Immunisierung generell kein EdU-Signal auf.



**Abb. 24: Histologische Detektion mukosal induzierter langlebiger Plasmazellen im Knochenmark.**

4 Monate nach der sekundären Immunisierung wurden Gewebeschnitte des Femurs nach der Immunfluoreszenzfärbung analysiert. (A) Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Knochenmarkgewebes, wobei die Zellkerne mittels DAPI blau dargestellt sind. Mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppeltem OVA konnten innerhalb des Parenchyms 3 OVA-spezifische ASC (rot, im weißen Rahmen) detektiert werden, welche z.T. intranukleäres EdU (grün) enthielten. (B) Der Bereich innerhalb des weißen Rahmens mit den detektierten OVA-spezifischen ASC wurde zur besseren Darstellung der EdU-Inkorporation vergrößert. (C) Mittels Ko-Färbung durch einen Fluoreszenzmarkierten MBP-Antikörper konnten die MBP+ eosinophilen Granulozyten (rot) identifiziert werden. Die Knochenrinde und Sinusoide sind schematisch dargestellt.

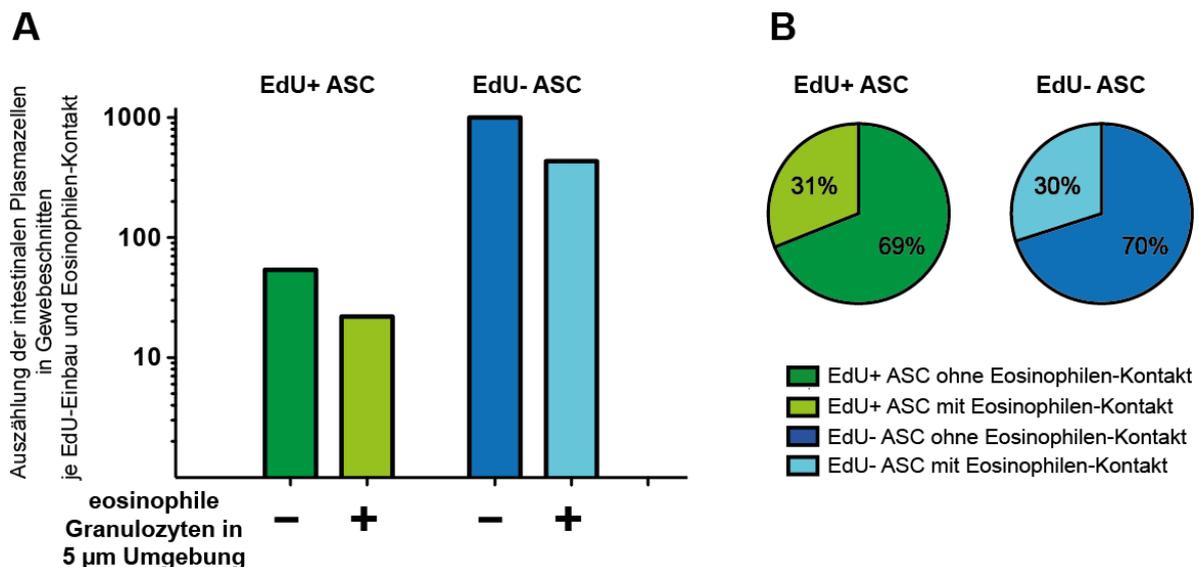
Es ist bekannt, dass auch die Lamina propria zahlreiche eosinophile Granulozyten beherbergt. Ihre Funktion galt bisher der Abwehr von parasitären Infektionen sowie der Beteiligung an allergischen Geschehen. Aufgrund zahlreicher neuer Informationen werden sie nun als multifunktionelle Leukozyten betrachtet, die sowohl im gesunden als auch im erkrankten Organismus darüber hinaus wichtige modulatorische Funktionen im Rahmen der adaptiven und angeborenen Immunität sowie Gewebekomöostase ausüben (134, 135). Ob eosinophile Granulozyten im Darm vermehrt mit langlebigen Plasmazellen ko-lokalisieren und womöglich auch im Darmgewebe einen Teil der Überlebensnische darstellen, sollte in dem nächsten Experiment untersucht werden. Dafür wurden die Gewebeschnitte des Dünndarms 4 Monate nach der oralen Immunisierung mit dem Fluorochrom-gekoppelten MBP-Antikörper zur Markierung der eosinophilen Granulozyten gefärbt. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit Sytox, wobei weiterhin IgA, EdU und OVA farblich markiert wurden. Die Abb. 25 A zeigt einen Ausschnitt des Darmgewebes, in welchem eine EdU+ langlebige OVA-spezifische ASC 4 Monate nach der oralen Immunisierung detektiert werden konnte (Pfeilmarkierung). Die MBP-Färbung zeigt weiterhin, dass sich diese langlebige ASC im Kontakt mit einem eosinophilen Granulozyten befindet (Abb. 25 B). Anschließend erfolgte eine Auszählung der EdU+ und EdU- Plasmazellen sowie der eosinophilen Granulozyten in ihrer Umgebung.



**Abb. 25: Histologische Detektion langlebiger Plasmazellen und der eosinophilen Granulozyten im Darm.** 4 Monate nach der sekundären Immunisierung wurden Gewebeschnitte des Dünndarms nach der Färbung histologisch analysiert. **(A)** Basaler Bereich einer Darmzotte mit grün dargestellten Zellkernen (Sytox), IgA+ ASC (blau) sowie einer mit einem Pfeil markierten OVA-spezifischen ASC (rot). **(B)** Bei dieser pfeilmarkierten OVA-spezifischen Plasmazelle handelt es sich um eine EdU+ (grün) langlebige ASC. Die eosinophilen Granulozyten (blau) wurden mit einem Fluorochrom-gekoppelten MBP-Antikörper detektiert.

Eine manuelle Auszählung wurde mit Hilfe der ZEN-Software durchgeführt. Insgesamt wurden ca. 1800 intestinale ASC bzgl. ihrer EdU-Inkorporation und dem Vorkommen von mindestens einem MBP+ eosinophilen Granulozyten in einer Umgebung von maximal 5 µm analysiert. Die Abb. 26 A zeigt die absolute Anzahl der EdU+ ASC (grün) sowie der EdU-negativen ASC (blau), wobei weiterhin das Vorliegen (+) bzw. Fehlen (-) von eosinophilen Granulozyten in der Umgebung getrennt dargestellt wurde. Darüber hinaus wurden die Frequenzen der einzelnen Fraktionen innerhalb der gesamten Plasmazellpopulation ermittelt (Abb. 26 B).

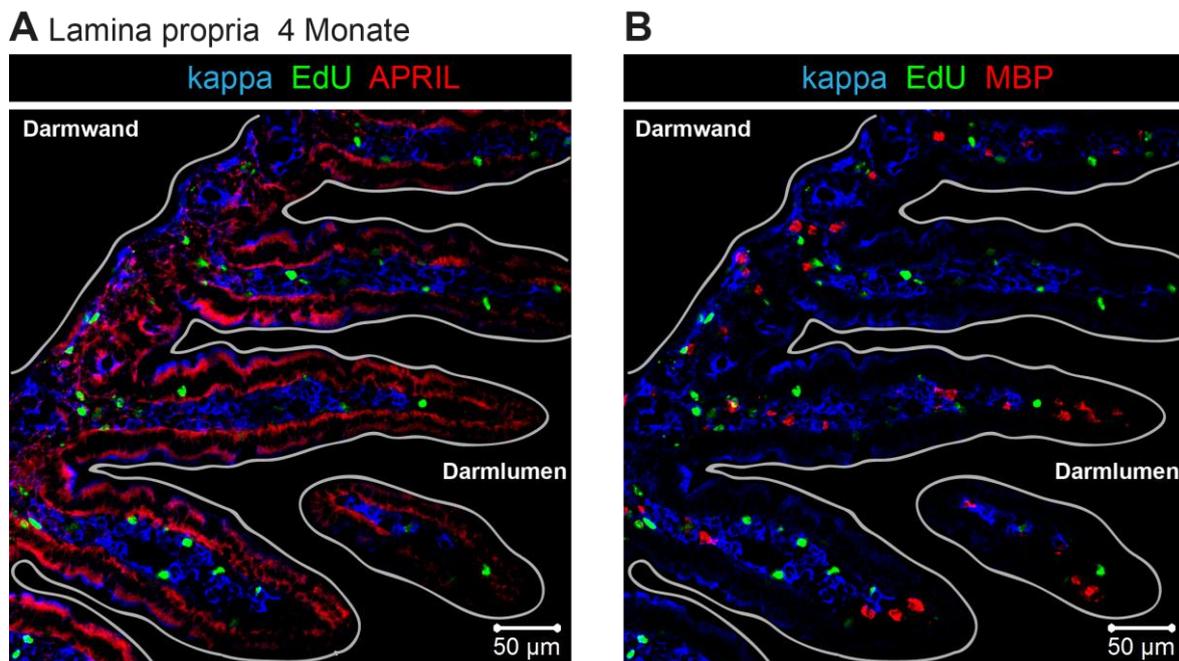
Die Resultate zeigen, dass die Mehrheit (70%) sowohl proliferierender als auch nicht-prolierender intestinaler Plasmazellen in einem Umkreis von 5 µm keine eosinophilen Granulozyten aufwies. Demnach konnte kein Unterschied zwischen den langlebigen und den kurzlebigen Plasmazellen in Hinblick auf das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten in unmittelbarer Umgebung festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass im Darm vermutlich andere Zellen bzw. andere APRIL-produzierende Zellen das Proliferationsverhalten bzw. die Lebensspanne der Plasmazellen beeinflussen.



**Abb. 26: Die Mehrheit der Plasmazellen im Darm ko-lokalisiert nicht mit MBP+ eosinophilen Granulozyten.** 4 Monate nach der zweimaligen oralen Immunisierung mit OVA und CT wurden Gewebeschnitte des Dünndarms nach Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die intestinalen ASC wurden mittels IgA i.c.+ bzw. kappa i.c. identifiziert und auf das Vorkommen von EdU im Zellkern beurteilt. Nicht-prolierative EdU+ ASC (grün) und proliferative EdU- Plasmazellen (blau) wurden in einer Umgebung von 5 µm auf das Vorkommen von MBP+ eosinophilen Granulozyten analysiert und gezählt. **(A)** Die Abbildung zeigt jeweils die Zahlen der EdU+ und EdU- ASC im Zusammenhang der Detektion (+) oder Abwesenheit (-) von eosinophilen Granulozyten. **(B)** Die Häufigkeit der einzelnen Fraktionen innerhalb der gesamten intestinalen Plasmazellpopulation wird in Kreisdiagrammen in % angegeben. Die Auszählung erfolgte manuell mit Hilfe der ZEN-Software, wobei mikroskopische Aufnahmen von mindestens zwei unterschiedlichen Gewebeschnitten von 3 verschiedenen Individuen analysiert wurden. Insgesamt wurden ca. 1800 intestinale Plasmazellen und ihre Umgebung von 5 µm beurteilt.

APRIL fördert das Überleben intestinaler Plasmazellen. Mesin et al. stellten fest, dass die Überlebensrate bzw. Funktionalität isolierter humaner ASC durch Zugabe von APRIL positiv beeinflusst wird (111). Desweiteren wurden APRIL-reiche Nischen in der Darmmukosa entdeckt, welche zum Überleben der intestinalen ASC beitragen (136). Im Darm werden art-spezifisch diverse Zellen als APRIL-Produzenten diskutiert z.B. dendritische Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, Epithelzellen sowie Makrophagen (88, 90, 137).

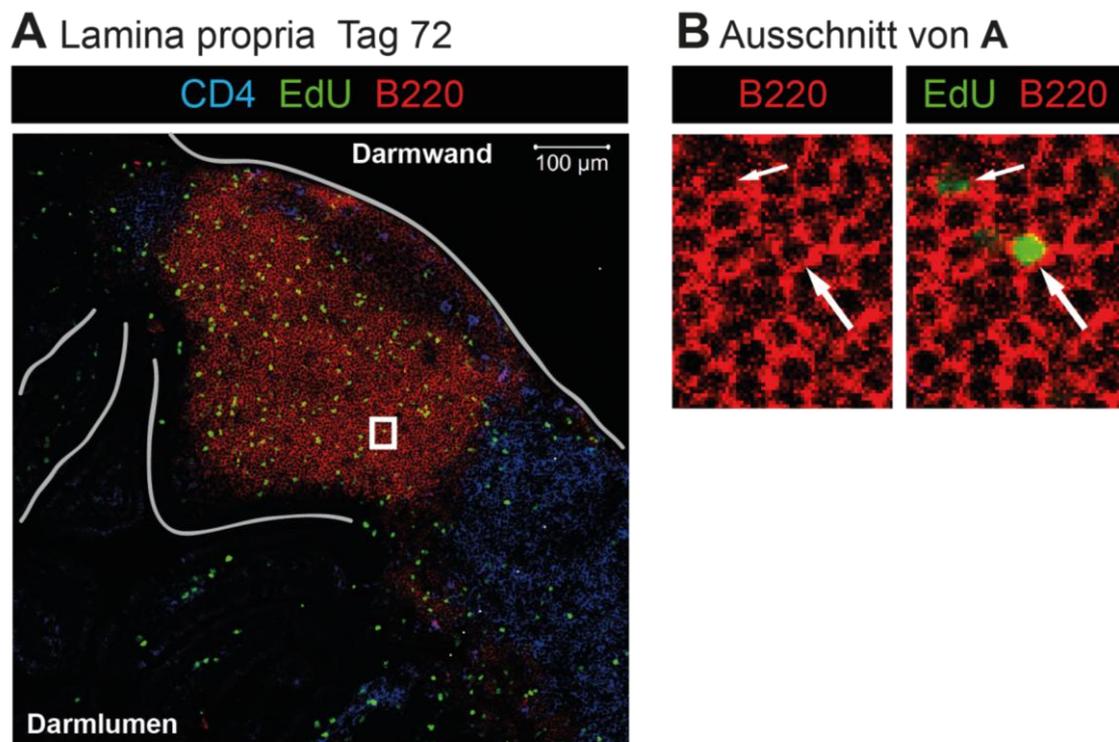
Dies führte hier zur Fragestellung, ob insbesondere langlebige Plasmazellen in unmittelbarer Nähe von APRIL-sezernierenden Zellen akkumulieren. Dafür wurde im Darmgewebe mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD256 (APRIL) das sezernierte APRIL detektiert. Die langlebigen ASC wurden als EdU+ kappa i.c.+ ASC identifiziert. Das Ergebnis zeigt in Abb. 27 A, dass sezerniertes APRIL im Darmepithel, in den Darmvilli und insbesondere im Bereich der Zottenbasis nachgewiesen werden konnte. Die Identität der APRIL-produzierenden Zellen wurde in diesen Analysen nicht bestimmt. Die intestinalen eosinophilen Granulozyten wiesen kein oder nur ein schwaches Signal für APRIL auf. Die histologischen Untersuchungen ergaben keine genauen Hinweise, ob die EdU+ langlebigen ASC in unmittelbarer Nähe von APRIL-produzierenden Zellen akkumulierten, da der ubiquitäre Nachweis von APRIL im Darmgewebe eine eindeutige Bestimmung einer Ko-Lokalisation nicht zuließ.



**Abb. 27: Die Detektion von APRIL im intestinalen Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung.**

4 Monate nach der sekundären Immunisierung wurden Gewebeschnitte des Dünndarms nach Immunfluoreszenzfärbung histologisch analysiert. **(A)** Die Darstellung zeigt mehrere Darmzotten mit kappa i.c.+ ASC (blau), EdU+ Zellkernen (grün) sowie produziertes APRIL (rot) innerhalb des Darmgewebes. Insbesondere in den Epithelzellen konnte APRIL detektiert werden, wobei APRIL auch innerhalb der Lamina propria nachgewiesen wurde. **(B)** Im Vergleich mit der APRIL-Lokalisation in (A) wiesen die MBP+ eosinophilen Granulozyten kein oder nur ein schwaches Signal für APRIL auf.

Es ist bekannt, dass nach einer oralen Immunisierung neben spezifischen Plasmazellen auch Gedächtniszellen resultieren können, welche über einen langen Zeitraum innerhalb der Lamina propria präsent sind (126). Diese sind hauptsächlich in den Peyer'schen Plaques lokalisiert (138) sowie in den mesenterialen Lymphknoten und der Milz (139). In den bisher durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen des Darmgewebes wurden daher die Peyer'schen Plaques auf das Vorkommen von langlebigen Zellen, welche nicht der Plasmazellpopulation angehören, analysiert. Mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen B220 und CD4 wurden der B-Zell-Bereich (rot) sowie die T-Zell-Areale (blau) definiert (Abb. 28 A). Nach der farblichen Markierung von EdU wurden zahlreiche langlebige EdU+ (grün) Zellen insbesondere im Bereich des B-Zell-Follikels detektiert. Ein exemplarischer Ausschnitt innerhalb des weißen Rahmens wurde zur besseren Darstellung vergrößert (Abb. 28 B). Daraus ist ersichtlich, dass diese EdU+ Zelle (größere Pfeilmarkierung) den Oberflächenmarker B220 aufwies. Eine weitere EdU+ B220+ Zelle ist im Anschnitt sichtbar (kleinere Pfeilmarkierung).



**Abb. 28: Langlebige Zellen innerhalb der Peyer'schen Plaques 72 Tage nach der oralen Immunisierung.** 72 Tage nach der sekundären oralen Immunisierung wurden Gewebeschnitte des Dünndarms nach Immunfluoreszenzfärbung histologisch analysiert. (A) Dargestellt ist ein Peyer'scher Plaque, dessen B-Zellbereich anhand B220 (rot) und die angrenzenden T-Zellareale mittels CD4 (blau) visualisiert wurden. Langlebigen Zellen wurden durch intranukleäres EdU (grün) identifiziert. Ein exemplarischer Ausschnitt innerhalb des weißen Rahmens wird in (B) vergrößert dargestellt und zeigt, dass diese Zellen den Oberflächenmarker B220 aufwiesen.

Aufgrund der B220+ Oberflächenmarkierung und dem Hinweis der Langlebigkeit handelt es sich bei diesen vermutlich um B-Gedächtniszellen. Auch innerhalb des T-Zell-Areals waren einige Zellen mit Potenzial zur Langlebigkeit nachweisbar. Zur Aufklärung des Ursprungs dieser Zellen sowie ihrer Funktion im Rahmen der intestinalen Immunantwort müssen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass das intestinale Gewebe sowohl Plasmazellen als auch anderen Zellen ein Mikromilieu bietet, in welchem diese über einen langen Zeitraum hinweg überleben können.

## 5 Diskussion

Nach der Aktivierung des mukosalen Immunsystems im Darm werden in den Darm-assoziierten Lymphgeweben sowie den mesenterialen Lymphknoten spezifische Plasmablasten induziert. Nach ihrer Migration in die Lamina propria und ihrer terminalen Differenzierung in Plasmazellen gewährleisten sie durch die Sekretion spezifischer IgA-Antikörper eine lokale Immunität. Bisher war nicht bekannt, ob die Plasmazellen des Darms, ähnlich wie die Plasmazellen des Knochenmarks nach einer systemischen Immunantwort, langlebig werden können. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Lebensspanne der mukosalen Plasmazellen zu bestimmen.

Diverse mukosale Antigene induzieren darüber hinaus die Bildung von Antigen-spezifischen Antikörpern, welche oft noch über ein Jahr lang im Serum detektiert werden können (140). Daher stand weiterhin die Analyse eines Beitrages der intestinal induzierten Plasmazellen zum langlebigen Plasmazellkompartiment des Knochenmarks im Fokus der hier durchgeführten Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass die Lamina propria des Dünndarms langlebige Plasmazellen beherbergt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass auch die aus einer mukosalen Immunantwort resultierenden Plasmazellen die Überlebensnischen des Knochenmarks besetzen können und so als langlebige Plasmazellen eine stabile humorale Immunität bewirken.

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Die orale Immunisierung induziert die Bildung spezifischer Plasmazellen

Die Induktion einer effektiven Immunantwort im Dünndarm bedingt eine orale Antigen-Applikation (57). Entsprechend wurden für diese Arbeit Antigen sowie Adjuvans nach Neutralisierung der Magensäure mit einer Schlundsonde gastrointestinal appliziert (Kap. 3.7.2). Die orale Immunisierung der Mäuse erfolgte 2-malig im Abstand von 21 Tagen, da bereits zwei Immunisierungen im Abstand von mehr als 14 Tagen eine effektive sekundäre Immunantwort induzieren (141).

Bisherige Studien zeigten auf, dass für die Immunisierung von Nagern größere Antigen-Mengen bzw. mehrmalige oder mehrtägige Verabreichungen eines Antigens notwendig sind (142). Als Ursachen werden dafür die niedrige Absorption von Antigenen durch die Schleimhaut sowie der Antigen-Abbau durch proteolytische Enzyme verantwortlich gemacht (143). Um eine möglichst große OVA-spezifische Plasmazellpopulation zu induzieren, wurde mit 100 mg OVA als Antigen im Verhältnis zu anderen Arbeiten eine deutlich größere Menge eingesetzt. Allgemein verwendete Dosierungen von OVA mit CT als Adjuvans werden zur

Induktion einer intestinalen Immunantwort in einem sehr breiten Bereich zwischen 3x 1 mg OVA (144, 145), 6x 2,5 mg OVA (101) und 3x 5mg OVA (146) in unterschiedlichen Intervallen eingesetzt. Weiterhin werden Dosierungen von 25 mg OVA mit CT (147) bzw. bis zu 80 mg OVA zur Sekundärimmunisierung ohne CT verabreicht (148). Für die Induktion einer oralen Toleranz werden zwischen 20 mg und 100 mg OVA oral appliziert (149–152). Bei der oralen Toleranz handelt es sich um eine spezifische Unterdrückung der zellulären und/oder humoralen Immunantwort. Sie kann durch diverse oral verabreichte Antigene induziert werden (153).

In dieser Arbeit wurde jedoch trotz der hohen Dosierung die Ausbildung einer Toleranz durch die Verwendung von CT als Adjuvans verhindert, da CT die Mechanismen der oralen Toleranz außer Kraft setzt (154). Es ist bekannt, dass CT eine außerordentlich potente Wirkung als mukosales Immunogen sowie als Adjuvans für diverse ko-verabreichte Antigene besitzt (124, 125) (Kap.1.5). Dass in den hier durchgeführten Immunisierungen erfolgreich die orale Toleranz durch die zeitgleiche Verabreichung von CT verhindert wurde, ist anhand der Bildung zahlreicher OVA-spezifischer Plasmazellen (Abb. 7 A) sowie den detektierten OVA-spezifischen Antikörpern im Serum (Abb. 11) ersichtlich. Dagegen konnte die alleinige Applikation von OVA ohne CT keine OVA-spezifischen ASC induzieren (Abb. 7 B, Mitte), was auf eine Toleranzausbildung hinweist.

### **5.1.2 Langlebige Plasmazellen können mit EdU effizient markiert werden**

Um die Lebensspanne sowie das Proliferationsverhalten der intestinal induzierten ASC zu bestimmen, erfolgte eine Markierung der Zellen mittels oral verabreichten EdU (Kap. 3.7.3). Bei EdU handelt es sich wie bei dem bisher bekannten BrdU (Bromodeoxyuridin) um ein Thymidinanalog, welches in die DNA proliferierender Zellen stabil eingebaut und daher für Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von Zellen eingesetzt wird (155).

Nach einer längeren oralen Gabe von BrdU wurden jedoch spezie- und stammesabhängige Beeinträchtigungen der BrdU-Markierungseffizienz beobachtet, deren Ursache unter anderem auf eine veränderte Resorptionsfähigkeit der Enterozyten zurückgeführt wird (156). Darüber hinaus wurde bei C57BL/6-Mäusen bereits nach zwei Wochen oraler Verabreichung von BrdU eine erhöhte Mortalität festgestellt (157). Aus diesen Gründen erfolgte in den Experimenten für diese Arbeit die Verwendung von EdU, wobei während der Verabreichung und auch in den nachfolgenden Wochen keine Krankheitsanzeichen ersichtlich waren.

Die Markierung mit EdU erfolgte zum Zeitpunkt der Sekundärimmunisierung (Tag 0) kontinuierlich über 12 Tage durch genau dosierte Agaroseportionen (Kap. 3.7.3). Die Applikation durch die kleinen Portionen mittels Agarose minimiert vergleichsweise zur Applikation mit dem Trinkwasser die verwendete Menge des EdU. Die Aufnahme der Agaroseportionen mit dem enthaltenen EdU wurde täglich kontrolliert.

Anhand der Effizienzanalyse der EdU-Inkorporation innerhalb der OVA-spezifischen ASC (Abb. 15 B) zeigte sich, dass mehr als 90% der intestinal induzierten Plasmazellen mit EdU markiert werden konnten. Dieses Resultat sowie die Beobachtung, dass die Bildungsrate spezifischer ASC in der intestinalen Immunantwort bzw. ihre Migration in die Lamina propria zwischen 3 und 7 Tagen nach der sekundären oralen Antigen-Applikation am höchsten ist (141, 142, 158), weisen darauf hin, dass eine 12-tägige Markierungsphase ausreichend ist. Eine weitere Bestätigung besteht darin, dass das hier ermittelte Markierungsprofil der OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks vergleichbar ist mit längeren Markierungsphasen (14). Mit einer längeren EdU-Verabreichung können auch nach Tag 12 proliferierende spezifische Zellen markiert werden. Untersuchungen nach systemischer Immunisierung zeigten jedoch, dass innerhalb von 2 Monaten nach der Immunisierung nur wenige weitere Antigen-spezifische Plasmazellen (weniger als 20%) generiert wurden (14), welche für die Zielsetzung dieser Arbeit nicht relevant waren.

Ein kleiner Anteil (<10%) der OVA-spezifischen ASC inkorporierte kein EdU (Abb. 15 B). Da die Analyse direkt im Anschluss an die EdU-Verabreichung durchgeführt wurde, kann man davon ausgehen, dass diese Zellen aus der primären Immunantwort stammen. Bei systemischen Immunisierungen unter Verwendung von Thymidinanaloga mit der sekundären Antigen-Applikation wurde vergleichbar ein Anteil von 5–15 % nicht-markierter spezifischer Plasmazellen beobachtet, welche als nicht-proliferierende Plasmazellen resultierend aus der primären Immunantwort vermutet wurden (14).

Die EdU-Markierung ermöglichte eine Unterscheidung von kurzlebigen und langlebigen ASC: Während einer ersten Zellteilung in Abwesenheit von EdU wird in dem neu-synthetisierten DNA-Strang körpereigenes Thymidin eingebaut, wodurch sich der Anteil an EdU pro Zelle verringert. Nach einer zweiten Zellteilung ist kein EdU mehr in der Zelle detektierbar. EdU-negative ASC stellten eine Mischpopulation aus proliferierenden, kurzlebigen bzw. neu-gebildeten Zellen dar, inklusive einigen langlebigen nicht-markierten ASC, die bereits vor der sekundären Immunisierung existierten. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch in der Analyse der EdU+ Plasmazellen. Diese entstanden während der Markierungsphase und behielten aufgrund fehlender Teilungsaktivität über die nachfolgenden Monate das EdU im Zellkern eingebaut. Mittels EdU konnten so langlebige Plasmazellen identifiziert werden.

Für die präzise Bestimmung eines EdU-Signals dienten Zellen von Kontroll-Tieren, welchen kein EdU verabreicht wurde. Da sich Helligkeitsunterschiede aufgrund unterschiedlicher EdU-Menge im Zellkern proliferierender Zellen in den durchgeführten Analysen nur unregelmäßig zeigten, wurden unabhängig von der EdU-Menge alle EdU-haltigen ASC als EdU+ zusammengefasst. Dieses Verfahren ermöglichte eine sichere Identifizierung langlebiger Plasmazellen, welche in den ersten 12 Tagen nach sekundärer Immunisierung entstanden sind und sich anschließend während des gesamten Untersuchungszeitraumes folglich

maximal ein Mal teilen. Die Analyse von EdU erfolgte durchflusszytometrisch, wobei histologisch die intranukleäre Lokalisation von EdU verifiziert wurde (Abb. 14 B).

### 5.1.3 Mukosale ASC können eindeutig identifiziert werden

Die Isolation der Lymphozyten aus dem Dünndarm erfolgte im Gegensatz zu den sekundären Lymphorganen durch einen enzymatischen Verdau (Kap. 3.8.2). Zahlreiche Schritte dieser Methode (z.B. Dichtezentrifugation) sowie diverse Komponenten (Mucus, Debris und Epithelzellen) können die Zahl der isolierten Lymphozyten beeinträchtigen (130).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Dichtezentrifugation verzichtet. Die gewonnene Zellsuspension enthielt daher eine große Zahl verschiedener Zelltypen inklusive Fettzellen und Epithelzellen. Dadurch musste ein eindeutiges Detektionsschema der Plasmazellen etabliert werden (Abb. 3). Die Identifikation der ASC erfolgte mit einem Fluorochromgekoppelten Antikörper, welcher an die leichte kappa-Kette der intrazellulär akkumulierten Immunglobuline von Plasmablasten und Plasmazellen bindet (Kap. 3.9.3). In der Maus weisen über 95% der B-Zellen diese leichte Kette auf.

Eine Unterscheidung von Plasmablasten und Plasmazellen mit Hilfe des membranständigen Moleküls CD138 ist nach der enzymatischen Isolation beeinträchtigt (159). Eine weitere Unterscheidung des Differenzierungsstatus ist möglich anhand der Expression des Plasmazellspezifischen Transkriptionsfaktors Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*). Blimp-1 wird von allen Plasmazellen während der terminalen Differenzierung hochreguliert (160). Die Verwendung von Reportermausen, welche ein fluoreszentes Protein unter der Kontrolle des Blimp-1-Promotors exprimieren, ermöglicht eine Bestimmung der Plasmazellen in den verschiedenen Organen anhand ihrer Fluoreszenz (161). Diese Reportermause eignen sich jedoch nicht zur Untersuchung der intestinalen Plasmazellen ohne eine Dichtezentrifugation. Zum einen ist bekannt, dass Epithelzellen eine starke Autofluoreszenz aufweisen (130), was die eindeutige Bestimmung der intestinalen fluoreszenten Plasmazellen erschwert. Zum anderen beherbergt das Darmgewebe eine Vielzahl von regulatorischen T-Zellen sowie Effektor- und Gedächtniszellen sowohl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese T-Zellen können ebenfalls einen hohen Level an Blimp-1 exprimieren (162, 163). Weitere Marker sind bei der Maus nicht bekannt.

Die Detektion der kappa i.c.+ Zellen umfasst demzufolge Plasmablasten und Plasmazellen, die in der vorliegenden Arbeit zusammenfassend als Antikörper-sezernierende Zellen (ASC) bezeichnet wurden.

Die in Kap. 4.1.2 beschriebene Strategie ermöglichte eine eindeutige Identifikation der mukosalen Plasmazellen nach Ausschluss der toten Zellen und Dubletten. Das enzymatische Isolationsverfahren führte dazu, dass nur 40–60 % der Zellen lebend isoliert werden konnten,

was jedoch mit anderen Protokollen vergleichbar ist (130). Die toten Zellen wurden markiert und von der Analyse ausgeschlossen.

Anschließend konnten die mukosalen kappa i.c.+ ASC präzise von einer kappa<sup>int</sup> Population abgegrenzt werden. Diese kappa<sup>int</sup> Population wurde von großen Zellen gebildet (Abb. 3 V.), welche aufgrund der fehlenden Expression von CD45.2 (Abb. 3 VII.) nicht den Lymphozyten zugehörig waren. Dabei handelte es sich vermutlich um Epithelzellen. Dies befindet sich im Einklang mit bisherigen Beobachtungen, dass sich im Vergleich zu Plasmazellen und T-Zellen in der Lamina propria nur wenige B-Zellen befinden (74, 94).

Diese zweifelsfrei identifizierten Plasmazellen konnten nun auf ihre EdU-Inkorporation sowie Spezifität und Isotyp ihrer Immunglobuline weiter charakterisiert werden (Schema in Abb. 6). Innerhalb der Plasmazellen war die Frequenz der OVA-spezifischen Plasmazellen sehr gering (weniger als 1% nach Tag 35), daher wurden zur eindeutigen Abgrenzung einer Hintergrundfärbung umfangreiche Kontrollen durchgeführt (Abb. 7).

Durch Anfärben der Gewebeschnitte (Kap. 3.10.5) mit Fluorochrom-gekoppelten Reagenzien konnten die induzierten Plasmazellen mikroskopisch verifiziert und genau lokalisiert werden. Dabei wurden Gewebeschnitte von nicht-immunisierten Kontrolltieren bzw. von Tieren, welchen kein EdU verabreicht wurde, regelmäßig mitgefärbt. Das Ziel dieser Untersuchungen war die Lokalisierung der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria und die Detektion von Überlebensfaktoren z.B. APRIL, wie sie im Knochenmark bereits bekannt sind.

Ein Großteil der bis heute gewonnenen Informationen von oral induzierten ASC des Darmgewebes basiert auf der Durchführung des ELISpot bzw. indirekt durch ELISA nach intestinaler Lavage (16, 111, 145, 164). Der in dieser Arbeit gelegte Fokus der Untersuchung der Lebensspanne anhand der EdU-Inkorporation machte eine durchflusszytometrische Analyse der CT-spezifischen ASC notwendig. Diese ergab jedoch aufgrund der unspezifischen CT-Bindung durch GM1-exprimierende Körperzellen keine eindeutigen Resultate (Kap.1.5). Für einen rein quantitativen Vergleich der Plasmazellpopulationen beider Spezifitäten erfolgte daher die Bestimmung der Anzahl der OVA- sowie CT-spezifischen ASC mittels ELISpot.

## 5.2 Diskussion der in den Experimenten erzielten Ergebnisse

### 5.2.1 Das Knochenmark beherbergt das größere Lymphozytenreservoir im Vergleich mit der Lamina propria des Dünndarms

Zur Bestimmung des Plasmazellkompartiments innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation wurden die absoluten Zahlen der CD45.2+ Lymphozyten sowie der Plasmazellen unabhängig ihrer Spezifität von naiven und oral immunisierten Tieren ermittelt. Für die Berechnung der Zellzahlen im Knochenmark wurde dabei ein Faktor aus der Literatur verwendet, welcher einbezieht, dass ein Femur sowie zwei Tibiae 12,8% der gesamten murinen Knochenmarkszellen enthalten (165, 166).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Knochenmark deutlich mehr (im Durchschnitt 50-fach mehr) Lymphozyten beherbergte als die Lamina propria des Dünndarms (Abb. 4 A, B). Obwohl nur wenige Studien die Verteilung und Gesamtzahl der Lymphozyten innerhalb eines Organismus ermittelten, stimmen die Resultate in einem Vergleich zwischen Knochenmark und Darm im Wesentlichen überein (167, 168). Insbesondere bei Betrachtung der unterschiedlichen Funktionen beider Organe, ist diese Beobachtung nicht unerwartet. Das Knochenmark ist hauptsächlich für die Bildung neuer Blutzellen verantwortlich sowie für die Aufrechterhaltung eines stabilen Serumentiters (41). Die Frequenz der Antikörper-sezernierenden Zellen liegt im Knochenmark bekanntermaßen bei nur 0,1–1 % (169). Die Lymphozyten der Lamina propria bestehen dagegen zu einem Drittel aus Plasmazellen, welche dem Organismus durch ihre enorme Produktion von IgA-Antikörpern Schutz gegen mukosale Pathogene sowie Kommensalen gewährleisten (84).

Für einen Vergleich der beiden Lymphozytenkompartimente muss allerdings berücksichtigt werden, dass der Prozess der Gewebeverdauung zur Isolation mit Enzymen mit einer relativ hohen Sterberate der intestinalen Lymphozyten einhergeht und tote Zellen nach Markierung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff von der Zählung ausgeschlossen wurden. Während in der Lamina propria nur zwischen 40–60 % der Zellen lebend isoliert werden konnten, war die Frequenz der toten Zellen im Knochen mit <4% vergleichsweise gering. Studien zeigten darüber hinaus, dass ein Großteil der intestinalen Lymphozyten in den Peyer'schen Plaques und im Epithel lokalisiert sind (130, 168), welche jedoch während der Aufbereitung der Lamina propria für die Untersuchungen dieser Arbeit entfernt wurden.

Publizierte Zahlen der isolierten Lymphozyten aus dem Darmgewebe der Maus zeigen generell eine große Varianz zwischen  $10^6$  und  $10^8$  Lymphozyten (130, 131), wobei sich die hier ermittelten Lymphozytenzahlen der Lamina propria (Abb. 4 A) in diesem Bereich befinden. Die Anwendung unterschiedlicher Isolationsmethoden und verschiedener Mausstämmen können dabei einen beträchtlichen Einfluss auf die Resultate ausüben (130, 131).

Zusätzlich ist bekannt, dass die postnatale Kolonisierung des Darms durch die Kommensalen die Entwicklung des humoralen und zellulären Darmimmunsystems stimuliert (170–173), wobei insbesondere die Zahl der intestinalen Zellen sowie ihr Aktivierungsstatus durch die Mikroben beeinflusst wird (171). Desweiteren wurde beobachtet, dass es dabei zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen erhebliche Unterschiede in der Stimulation gibt (173–175). Daher können die isolierten Lymphozytenzahlen der verschiedenen Arbeitsgruppen unter Berücksichtigung der veränderten SPF-Bedingungen mit der Zeit (88) nur bedingt miteinander verglichen werden.

### **5.2.2 Die Plasmazellkompartimente der Lamina propria und des Knochenmarks unterscheiden sich deutlich in ihrer Isotyp-Zusammensetzung**

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes nach der oralen Immunisierung sowie im naiven Zustand war die Zahl der Plasmazellen der Lamina propria konstant, wohingegen sie im Knochenmark kontinuierlich zunahm (Abb. 4 C, D). Bei dieser Betrachtung muss neben der durchgeführten oralen Immunisierung, der Einfluss des zunehmenden Alters der Maus mit einbezogen werden.

Der murine Darm enthält postnatal bis zum Absatzalter (ca. 3 Wochen) nur wenige ASC, danach nimmt ihre Zahl mit der bakteriellen Besiedlung bis zur 6. Lebenswoche zunächst rapide zu und steigt geringfügig bis zum 1. Lebensjahr weiter an (176, 177). Obwohl in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Mäuse in einem Alter zwischen 7 und 13 Wochen verwendet wurden, bei denen das intestinale Plasmazellkompartiment bereits voll entwickelt war, konnte keine Akkumulation der intestinalen ASC über die Zeit festgestellt werden. In den vorliegenden Ergebnissen bewirkten weder das zunehmende Alter noch die orale Immunisierung eine Veränderung der Plasmazellzahl im Darm. Dass eine orale Antigen-Applikation quantitativ keinen Einfluss auf das gesamte Plasmazellkompartiment des Darms ausübt, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (125).

Die in dieser Arbeit detektierten intestinalen ASC exprimierten zu über 99% IgA (Abb. 5 B), was in der Literatur bestätigt wird (104) und im Einklang mit der funktionellen Bedeutung der IgA-Antikörper in der Mukosa sowie dem intestinalen Vorkommen des pIg-Rezeptors für polymere Immunglobuline wie IgA ist. Plasmazellen anderer Isotypen, meist IgM, kommen im gesunden Darm kaum vor. Ein Anstieg von IgG<sup>+</sup> ASC wird bei pathologischen Veränderungen, wie z.B. Entzündungsprozessen oder Läsionen beobachtet (178, 179). Ein Anstieg IgE<sup>+</sup> ASC wird überwiegend bei parasitären Infektionen sowie Lebensmittelallergien beobachtet (179, 180). Auch in dieser Arbeit wurden nur wenige ASC anderer Isotypen detektiert (Abb. 5 D). Die orale Immunisierung führte zu einer Akkumulation spezifischer IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> ASC im Darmgewebe, die jedoch nicht dauerhaft persistierten (Abb. 9).

Auch im Knochenmark entsteht insbesondere innerhalb der ersten 6 Lebenswochen ein Reservoir an Plasmazellen, welches mit zunehmendem Alter weiter aufgebaut wird (176, 181, 182). Dies unterstützt die hier gemachte Beobachtung, dass Plasmazellen im Knochenmark über 9 Monate akkumulierten. Dennoch ist die Zahl der Plasmazellen limitiert, denn obwohl eine Vielzahl von spezifischen Plasmablasten z.B. nach einer sekundären systemischen Immunisierung in das Knochenmark migriert, persistiert nur ein geringer Anteil (~10-20 %) in einer Überlebensnische über einen langen Zeitraum (53).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zahl der persistierenden OVA-spezifischen ASC im Knochenmark relativ konstant blieb (Abb. 8 B). Dadurch, dass die Mehrheit dieser spezifischen ASC im Knochenmark das eingebaute EdU beibehielt (Abb. 20 B), kann eine Aufrechterhaltung dieser persistierenden Population durch ständige Neubildung von spezifischen Plasmazellen, z.B. durch eine persistierende Immunreaktion, ausgeschlossen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die kontinuierliche Akkumulation der Gesamtzahl der Plasmazellen im Knochenmark höchstwahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der oralen Immunisierung steht, sondern auf das zunehmende Alter der Tiere zurückzuführen ist.

Die ermittelte Isotypenverteilung der Plasmazellen steht im Einklang mit bisherigen Daten. Bei Mäusen, welche unter SPF-Bedingungen gehalten werden, bilden die IgA<sup>+</sup> ASC einen beträchtlichen Anteil innerhalb des gesamten Plasmazellkompartiments des Knochenmarks, wobei mit zunehmendem Alter Plasmazellen anderer Immunglobulinklassen im Knochenmark akkumulieren (183).

In einem Vergleich der Plasmazellkompartimente der beiden Organe untereinander fällt auf, dass die Lamina propria bis zu 12 Tagen nach der oralen Immunisierung mehr Plasmazellen beherbergte (Abb. 4 C, D). Durch die kontinuierliche Akkumulation der Plasmazellen im Knochenmark konnte jedoch nach 9 Monaten nahezu die doppelte Anzahl an Plasmazellen detektiert werden als in der Lamina propria. Dagegen steht die Annahme, dass die Lamina propria über 80% der gesamten ASC des Körpers beherbergt (104). Daten über das Plasmazellkompartiment des Dünndarms im Zusammenhang mit dem zunehmenden Alter existieren bisher nur von C3H/HE-Mäusen (176), wobei bekannt ist, dass zwischen den verschiedenen Mausstämmen große Unterschiede bestehen können (130) und auch zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen die Zahlen variieren. Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit die Zahl der Plasmazellen nur des Dünndarms einbezieht, während die Plasmazellen des Dickdarms nicht berücksichtigt wurden.

Weiterhin müssen bei einem Vergleich der Plasmazellkompartimente auch die Isolationsmethoden der Darmzellen und insbesondere die Ausbeute der lebenden, sehr empfindlichen Plasmazellen mit in Betracht gezogen werden, so dass die tatsächliche Zahl der Plasmazellen in der Lamina propria möglicherweise etwas höher ist als angegeben. Die Bestim-

mung der genauen Zahlen der Lymphozyten inklusive den ASC des Darms sind kein unbekanntes Problem (184). In dieser Arbeit wurde jedoch der Fokus auf eine qualitative Analyse im Hinblick auf die Lebenszeit der isolierten intestinalen Zellen gesetzt.

### **5.2.3 Oral induzierte Plasmazellen persistieren in verschiedenen Organen bis zu 9 Monaten nach ihrer Entstehung**

In der Lamina propria, im Knochenmark und in der Milz konnten OVA-spezifische ASC bis zu 9 Monaten nach oraler Immunisierung nachgewiesen werden (Abb. 8 A, B und Abb. 13 A). In den Peyer'schen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten waren dagegen bereits 12 Tage nach Antigen-Kontakt nur sehr wenige Zellen nachweisbar (Abb. 12). Das Vorkommen von OVA-bindenden Zellen im Knochenmark nicht-immunisierter Tieren entsprach weniger als einer Zelle pro  $0,5 \times 10^6$  Lymphozyten und bestätigt die Resultate anderer Arbeitsgruppen (12).

Eine Migration der intestinal induzierten IgA<sup>+</sup> ASC aus dem GALT und der Milz in die Lamina propria des Dünndarms wird hauptsächlich durch CCL25 gesteuert (38, 185, 186) welches von den Epithelzellen der Darmkrypten (39) sowie den Endothelzellen des Darms (100) produziert wird und mit dem entsprechenden Chemokin-Rezeptor CCR9 auf der Oberfläche der Plasmablasten interagiert. Intestinal induzierte IgA<sup>+</sup> ASC können anhand ihrer Rezeptorausstattung darüber hinaus in das Knochenmark migrieren. Sie exprimieren CCR10 bzw. CXCR4 und migrieren folglich gegen CCL28 bzw. CXCL12 (38, 40). Es wurde gezeigt, dass stromale Zellen des humanen Knochenmarks neben CXCL12 auch CCL28 produzieren (187), wodurch die IgA<sup>+</sup> Plasmablasten chemotaktisch angelockt werden können. Diese Interaktion stellt eine mögliche Verbindung von systemischer und mukosaler Immunität dar (31, 188). Neben CXCR4 sind die Integrine  $\alpha 4\beta 7 / \alpha 4\beta 1$  für die Migration der zirkulierenden Plasmazellen in das Knochenmark von Bedeutung. IgA<sup>+</sup> ASC zeigen eine hohe Expression von  $\alpha 4\beta 7$ , wobei nicht genau bekannt ist, ob sie auch  $\alpha 4\beta 1$  exprimieren (189).  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin interagiert ebenfalls mit VCAM-1 (190). Eine weitere Studie vermutet, dass auch  $\alpha 4\beta 7$  ein wichtiger Faktor für die Migration der ASC ins Knochenmark darstellen könnte (191).

Persistierende Antigen-spezifische ASC wurden bereits nach einer oralen Immunisierung mit CT (192) bzw. mit den intestinal-pathogenen Rotaviren (RV) (193) beobachtet und konnten über ein Jahr in der Lamina propria detektiert werden. Youngman et al. untersuchten nach einer RV-Infektion der Maus diverse Organe auf das Vorkommen oral induzierter ASC und konnten bis zu 9 Monate nach Immunisierung RV-spezifische ASC hauptsächlich in den Peyer'schen Plaques und der Lamina propria sowie in geringerer Zahl in Knochenmark und Milz nachweisen (138). Weitere Studien detektierten nach der oralen Immunisierung spezifische Plasmazellen in unterschiedlichem Ausmaß im Knochenmark (194–196).

Diese Studien wurden jedoch nicht über einen längeren Zeitraum fortgesetzt bzw. zogen keinen quantitativen Vergleich zwischen Lamina propria und Knochenmark. Insgesamt sind keine vergleichbaren Langzeitstudien mit Untersuchungen dieser Organe nach der oralen Immunisierung vorhanden, wobei die Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Detektion von oral induzierten Plasmazellen divergieren (138, 193, 196).

Die in dieser Arbeit ermittelten Resultate zeigen, dass in der Lamina propria (Abb. 8 A) sowie in der Milz (Abb. 13 A) die Anzahl der OVA-spezifischen ASC zunächst anstieg und anschließend kontinuierlich über die folgenden Monate abnahm. Dabei wurde in dieser Arbeit eine Akkumulation von OVA-spezifischen Plasmazellen zwischen Tag 12 und Tag 36 beobachtet, wohingegen in anderen Studien die Zahl der spezifischen ASC bereits nach einer Woche zurückging (142, 195).

Eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete verlängerte Zunahme der OVA-spezifischen ASC im Gewebe ist, dass die Immunreaktion aufgrund der hohen OVA-Dosis und/oder Rückständen von OVA eventuell verlängert stattfand. Antigene können in Form von Antigen-Antikörperkomplexen auf der Oberfläche von folliculären dendritischen Zellen über längere Zeit in den Follikeln von Milz und Lymphknoten persistieren (20, 197). Auch ist eine verlängerte Migrationsphase der bereits gebildeten ASC durch das Blut denkbar, deren spätere Ankunft im Darm zu einer weiteren Zunahme der Zellzahl führte. Dies ist möglich, da auch die Zahl der EdU-haltigen OVA-spezifischen ASC anstieg (Abb. 20 C), folglich jener Plasmazellen, die bereits während der Markierungsphase entstanden sind. Eine weitere Möglichkeit der längeren Zunahme der OVA-spezifischen ASC ist eine lokale Proliferation der in die Lamina propria migrierenden ASC nach ihrer Ankunft, da ein EdU+ Signal sowohl diejenigen Zellen erfasst, die sich nicht sowie ein Mal geteilt haben. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Migration spezifischer ASC sowohl nach systemischer als auch oraler Immunisierung lediglich in einem sehr engen Zeitfenster nach Antigen-Kontakt stattfindet (36, 195, 198). Ein weiterer Hinweis auf diese Vermutung ist die Beobachtung, dass die spezifischen Plasmazellen im Knochenmark nach Tag 12 nicht akkumulierten (Abb. 8 B). Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen des Blutes könnte das Vorkommen migrierender OVA-spezifischer ASC festgestellt werden. Auf die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse hat dies jedoch keinen Einfluss.

Die Untersuchungen der induzierten ASC zeigen weiterhin, dass die nachfolgende Abnahme der OVA-spezifischen ASC in den verschiedenen Organen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Während die Zahl der OVA-spezifischen ASC in der Lamina propria und der Milz deutlich zurückging, blieb die Population intestinal induzierter Plasmazellen im Knochenmark während des gesamten Untersuchungszeitraums relativ stabil.

In dieser Arbeit konnten zwischen 3 und 9 Monaten nach der oralen Immunisierung in der Lamina propria 1,1 bis  $4 \times 10^3$  spezifische Plasmazellen detektiert werden. Die ermittelten

Anzahlen persistierender oral induzierter Plasmazellen in der Lamina propria (bzw. ihre Kalkulation pro  $10^6$  ASC) zeigen in verschiedenen Studien ein relativ großes Spektrum (138, 192, 193). Die Zahlen der vorliegenden Arbeit ordnen sich in das Spektrum der verschiedenen Studien ein.

Neben OVA-spezifischen ASC waren in der Lamina propria auch persistierende CT-spezifische ASC nachweisbar (Abb. 10 A). Ähnlich wie bei anderen Studien wurde eine höhere Zahl der CT-spezifischen ASC detektiert als jene für das ko-applizierte Antigen spezifische ASC (126, 199). Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen einen Rückgang der induzierten OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria über die folgenden Monate nach der oralen Immunisierung. Dieser Rückgang der Zahl OVA-spezifischer Plasmazellen in der Lamina propria könnte eine Erklärung für die häufig beobachtete zeitliche Begrenzung der lokale Immunität in der Lamina propria sein (99, 200).

Der Rückgang der intestinalen OVA-spezifischen Plasmazellen ist vermutlich auf eine Verdrängung dieser Zellen durch neu-generierte Plasmablasten aktuellerer Spezifitäten zurückzuführen. Plasmazellen, welche aus den Überlebensnischen verdrängt werden, sterben anschließend durch Apoptose (36, 42, 46).

Die in dieser Arbeit ermittelten Resultate des Knochenmarks zeigen dagegen, dass ca.  $2 \times 10^4$  OVA-spezifische ASC bis zu 9 Monaten konstant detektiert werden konnten (Abb. 8 B). Ebenso konnte eine Studie bis zu 9 Monate nach oraler RV-Infektion von Mäusen RV-spezifische ASC im Knochenmark nachweisen (138). Auch nach einer LCMV-Infektion (*lymphocytic choriomeningitis virus*) konnten spezifische Plasmazellen im Knochenmark detektiert werden. Dabei konnten Slifka et al.  $2,6 \times 10^4$  (Tag 145 Balb/c) bzw.  $2,3 \times 10^4$  (Tag 103 C57B/L6) LCMV-spezifische ASC im Knochenmark mittels ELISpot detektieren. Ca. ein Jahr nach der Infektion waren noch  $1,2 \times 10^4$  LCMV-spezifische ASC im Knochenmark nachweisbar (16), was mit den ermittelten Daten dieser Arbeit korrespondiert. Nach einer systemischen OVA-Immunisierung waren über drei Monate nach der sekundären OVA-Applikation ca.  $7,5 \times 10^4$  OVA-spezifische Plasmazellen im Knochenmark vorhanden, wobei die Untersuchungen über die darauffolgenden Monate nicht fortgesetzt wurden (14). Damit können im Knochenmark nach einer systemischen Immunisierung mit OVA ca. dreifach mehr OVA-spezifische Plasmazellen detektiert werden als nach einer oralen Immunisierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen weiterhin, dass nach der oralen Immunisierung das Knochenmark im Vergleich zur Lamina propria die deutliche Mehrheit sowohl der OVA-spezifischen ASC (Abb. 8 B) als auch der CT-spezifischen ASC (Abb. 10 B) enthielt. Auch nach systemischen Immunreaktionen wurde das Knochenmark als der Hauptort identifiziert, an dem Plasmazellen akkumulieren und in speziellen Überlebensnischen durch ihre enorme Produktion von Immunglobulinen einen stabilen protektiven Serumtiter über lange Zeit aufrecht erhalten können (16–18, 41, 201). Jedoch verfügen auch diverse mukosale

Immunisierungen über das Potenzial langanhaltende schützende Antikörper im Serum zu induzieren (19, 41, 56, 117). Es ist nicht bekannt, ob die im Blutserum detektierten Antikörper nach einer oralen Immunisierung ebenfalls von den Plasmazellen des Knochenmarks resultieren. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass sich die Mehrheit der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark befindet und vermutlich die Quelle der im Serum detektierten Antikörper darstellt. Ferner geben diese Resultate einen Hinweis darauf, dass eine langanhaltende humorale Immunität nach einer oralen Immunisierung ähnlich wie nach systemischen Immunisierungen durch langlebige Plasmazellen des Knochenmarks besteht.

#### **5.2.4 OVA-spezifische ASC exprimieren im Darm überwiegend IgA, während im Knochenmark IgA+ und IgG<sub>1</sub>+ ASC die Mehrheit bilden**

Es ist bekannt, dass eine orale Applikation von OVA mit CT als Adjuvans die Bildung spezifischer Plasmazellen induziert, welche hauptsächlich die Immunglobulinklassen IgG<sub>1</sub> und IgA exprimieren. Auch die Isotypen IgE bzw. IgM können detektiert werden, jedoch in deutlich geringerer Zahl (129, 146, 147). Daher wurden in dieser Arbeit die Analysen der induzierten Plasmazellen ausschließlich auf die Isotypen IgA und IgG<sub>1</sub> fokussiert.

In der Lamina propria exprimierten nahezu alle der OVA-spezifischen ASC den Isotyp IgA (Abb. 9 A). In den ersten Wochen konnten auch einige IgG<sub>1</sub>+ ASC sowie ASC weiterer nicht-untersuchter Isotypen detektiert werden, welche jedoch nicht persistierten. Auch persistierende CT-spezifische ASC exprimierten ausnahmslos IgA (Abb. 10 A). Dies befindet sich im Einklang mit bisherigen Beobachtungen, welchen zufolge die Immunglobulinklasse A in der Lamina propria deutlich dominiert (104), wohingegen IgG+ ASC vornehmlich bei Entzündungen des Darmgewebes eine Rolle spielen (178, 179). In dieser Arbeit wurden IgA- und IgG<sub>1</sub>-negative ASC nicht weiter spezifiziert, wobei andere Studien unter anderem transiente IgM+ ASC identifizierten (176, 199). Es ist bekannt, dass IgA+ Plasmablasten chemotaktisch von CCL25 angezogen in das Dünndarmgewebe migrieren, wohingegen IgM+ und IgG+ ASC kaum auf CCL25 reagieren (185). Dies erklärt, warum nur wenige Plasmazellen eines anderen Isotyps als IgA im Dünndarmgewebe detektiert werden konnten.

Im Gegensatz zum Darm exprimierte die Mehrheit der OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks IgA bzw. IgG<sub>1</sub> (Abb. 9 B). Studien bestätigen das Vorkommen von spezifischen Antikörpern dieser Isotypen im Serum nach oraler Immunisierung mit OVA und CT (146). Auch nach einer intestinalen Rotavirusinfektion konnten mittels ELISpot spezifische ASC dieser Isotypen im Knochenmark nachgewiesen werden (138). Bei systemischen Immunisierungen werden dagegen nahezu ausschließlich IgG+ spezifische ASC induziert, wohingegen IgA+ und IgM+ ASC meist nur wenig gebildet werden (108, 186).

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Fraktion der IgG<sub>1</sub>+ Plasmazellen über 9 Monate nach der oralen Immunisierung relativ konstant blieb, während die Zahl der IgA+ ASC über die Zeit kontinuierlich abnahm (Abb. 9 B). Daraus resultiert die Vermutung, dass IgG<sub>1</sub>+ ASC im Knochenmark eine bessere Überlebenschance aufweisen als IgA+ ASC. Auf diese Ergebnisse wird im Zusammenhang mit den EdU-Analysen der langlebigen Plasmazellen näher eingegangen (Kap. 5.2.9).

### **5.2.5 Oral induzierte persistierende Plasmazellen halten einen stabilen Serumtiter aufrecht**

Sowohl systemische als auch mukosale Immunisierungen können langanhaltende schützende Antikörper im Serum induzieren (19, 41, 56, 117). Während die lokale Antikörpersekretion in der Lamina propria bereits das Eindringen von Pathogenen in den Organismus verhindert, sind systemisch zirkulierende Antikörper für eine Eindämmung der Erregervermehrung und –ausbreitung wichtig (188). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von ELISA-Analysen des Blutserums zeigen, dass ein stabiler Serumtiter sowohl von IgG+ als auch von IgA+ OVA-spezifischen Antikörpern über mindestens 9 Monate vorhanden war (Abb. 11 A, B).

Für die Bildung eines spezifischen Serumtiters sind hauptsächlich die Plasmazellen des Knochenmarks verantwortlich (16–18, 41, 201). Veränderungen der Plasmazellzahlen im Knochenmark spiegeln sich im Serumtiter wieder. Nach einer abgeschlossenen Immunreaktion bleibt der Titer weitestgehend konstant (41, 202). Die hier mittels ELISA detektierten spezifischen Antikörper der Isotypen IgA und IgG korrespondierten mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen der persistierenden OVA-spezifischen ASC des Knochenmarks, deren Mehrheit IgA bzw. IgG<sub>1</sub> exprimierte (Abb. 9 B).

Dennoch können in den ersten Wochen zunehmend IgA-Antikörper im Blut nachgewiesen werden, was bei den IgG-Antikörpern nicht beobachtet wurde. Da im Knochenmark jedoch keine deutliche Zunahme von IgA+ ASC detektiert wurde, muss davon ausgegangen werden, dass OVA-spezifische ASC anderer Herkunft zur Bildung des Serumtiters beitragen. Generell wird vermutet, dass intestinale Plasmazellen der Lamina propria nicht zum Serumtiter beitragen, da die Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria nicht mit dem Serumtiter korreliert (104, 141, 203). Artspezifisch gibt es jedoch Unterschiede in der molekularen Struktur von IgA im Serum. Während beim Menschen im Serum überwiegend monomeres IgA zirkuliert, ist bei Nagern der Anteil von polymeren IgA-Antikörpern beträchtlich größer (204). Daraus lässt sich vermuten, dass bei Nagern intestinale IgA+ ASC einen Beitrag leisten zu den im Serum zirkulierenden IgA-Antikörpern. Es ist durchaus denkbar, dass die sezernierten Antikörper der persistierenden OVA-spezifischen ASC in der Milz zum Serumtiter beitragen, jedoch wäre dieser Beitrag aufgrund der niedrigen Plasmazellzahl

sehr gering und erklärt nicht die einseitige Zunahme der IgA-Antikörper. Eine Erklärung für die vermehrt detektierten IgA-Antikörper könnte jedoch sein, dass tatsächlich noch intestinal induzierte IgA<sup>+</sup> ASC im Blut zirkulierten auf dem Weg in die Lamina propria. Es ist bekannt, dass zirkulierende IgA<sup>+</sup> ASC bereits während ihrer Zirkulation Antikörper sezernieren (205). Dies könnte auch eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem konstanten IgA-Serumtiter und der absinkenden Zahl der IgA<sup>+</sup> OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark sein. Die Zahl der IgA<sup>+</sup> OVA-spezifischen ASC im Knochenmark ging jedoch insbesondere in den ersten 4 Monaten nach der oralen Immunisierung zurück, während zwischen 4 und 9 Monaten die Zahl nur noch gering sank (Abb. 9 B). Dies könnte erklären, warum kein Unterschied zwischen den detektierten Antikörper-Mengen zwischen 4 und 9 Monaten detektiert wurde.

Eine Messung der intestinal sezernierten Antikörper, welche eine lokale Immunität wieder spiegeln, wurde hier nicht durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung der Antikörper im Darmlumens könnten durch eine ELISA-Analyse nach einer intestinalen Lavage ermittelt werden.

### **5.2.6 Plasmazellen der Lamina propria können langlebig werden**

Während der Erstellung dieser Dissertation erschienen diverse Studien, die darauf hindeuteten, dass zumindest eine kleine Subpopulation der intestinalen Plasmazellen langlebig werden kann (Kap. 1.3.1.5) (111, 112). Dabei wurde vermutet, dass Plasmazellen ähnlich wie im Knochenmark auch in der Lamina propria um Überlebensnischen konkurrieren. Aufgrund des Kontakts mit der beträchtlichen Antigen-Menge im Darm, werden diese Nischen jedoch weitaus häufiger neu besetzt, was die Lebensspanne von spezifischen Plasmazellen im Darm deutlich verkürzt (206).

Die hier durchgeführten Untersuchungen der Lebensspanne intestinaler Plasmazellen mittels EdU-Markierung ergaben, dass die Mehrheit der Plasmazellen des Darms durch Proliferation das eingebaute EdU wieder durch Thymidin ersetzte, wobei eine kleine Fraktion von 1,7 % der Plasmazellen das EdU über mindestens 4 Monate behielt (Abb. 19 A). Damit kann mit der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das Darmgewebe langlebige Plasmazellen beherbergt.

Nach Einbeziehung der Größe der Plasmazellkompartimente von Darm und Knochenmark (Abb. 4 C, D) sowie der Frequenz EdU<sup>+</sup> Plasmazellen (Abb. 19 A, B) enthielt die Lamina propria nach 4 Monaten ca. ein Viertel an langlebigen Plasmazellen verglichen mit dem Knochenmark. Dabei müssen in dieser Kalkulation die unterschiedlichen Isolationsmethoden berücksichtigt werden, woraus resultiert, dass die tatsächliche Zahl der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria vermutlich etwas höher ist als angegeben. Diese nicht-proliferativen Plasmazellen des Darmgewebes exprimierten nahezu ausschließlich den

Isotyp IgA. Dies bestätigten histologische Untersuchungen, in denen ebenfalls nur EdU+ kappa i.c.+ Plasmazellen der Immunglobulinklasse A detektiert wurden (Kap. 4.3.6).

Resultate von ähnlichen Markierungsexperimenten zeigten, dass nach 45 Tagen noch ca. 2 % der Plasmazellen die Markierung aufwiesen, wohingegen nach 60 bzw. 90 Tagen keine markierten Plasmazellen mehr detektierbar waren (107). Diese Analyse wurde jedoch im Rahmen der Homöostase des Darmimmunsystems durchgeführt, ohne jegliche spezifische Immunisierung. Es ist bekannt, dass die Rezeptoren des Darmepithels, Makrophagen und dendritischen Zellen die Signale von kommensalen Bakterien und Pathogenen unterscheiden können. Kommensale Bakterien weisen so genannte MAMPs (*microbial-associated molecular patterns*) auf, welche durch z.B. Modifikationen von den Rezeptoren nicht erkannt werden bzw. durch andere Mechanismen ihrer Erkennung entgehen. Dagegen lösen Pathogene über PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) „Gefahr-Signale“ aus, woraufhin das adaptive Immunsystem aktiviert wird (58). Es ist denkbar, dass die Lebenszeit einer intestinalen Plasmazelle davon beeinflusst wird, ob sie im Rahmen der Kolonisierung durch die Kommensalen entstanden ist oder durch ein starkes Immunogen induziert wurde.

Andere Studien zeigten ebenfalls Hinweise auf das Vorkommen langlebiger intestinaler Plasmazellen, jedoch ermittelten sie in ihren Analysen keine Häufigkeit innerhalb des gesamten Plasmazellkompartiments des Darms (111, 112). Dadurch können die in dieser Arbeit festgestellten Resultate nur unzureichend mit den Studien verglichen werden. Die Beobachtung, dass die intestinalen Plasmazellen keine homogene Population bilden, sondern sich in Bezug auf die Expression von verschiedenen Faktoren wie TNF- $\alpha$  unterscheiden (207), lässt vermuten, dass weitere bisher nicht bekannte Unterschiede in den Eigenschaften der Plasmazellen vorhanden sind.

Bei Betrachtung der Spezifität der induzierten Plasmazellen ist ersichtlich, dass der Anteil der langlebigen OVA-spezifischen ASC nach 4 Monaten bis zu 10% betrug (Abb. 20 A). Demnach überlebte ein beträchtlicher Teil der spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria.

Da neben langlebigen OVA-spezifischen ASC noch zahlreiche weitere EdU+ ASC vorhanden waren, ist denkbar, dass auch persistierende CT-spezifische ASC langlebig werden können. Der Nachweis von EdU in CT-spezifischen ASC mittels Durchflusszytometrie war jedoch durch die umfangreiche CT-Bindung anderer Lymphozyten aufgrund der Expression des GM1-Rezeptors nicht möglich (Kap.1.5).

CT- und OVA-spezifische ASC entstanden unter zahlreichen identischen Bedingungen der Immunantwort und es ist bekannt, dass zeitgleich induzierte Plasmazellen verschiedener Spezifitäten eine ähnliche Kinetik aufweisen (127). Dies lässt vermuten, dass sie sich in weiteren Eigenschaften ähneln, z.B. der Fähigkeit erfolgreich eine Nische zu besetzen, welche durch verschiedene Faktoren ein Überleben der ASC über einen langen Zeitraum

ermöglicht (46, 47). Allerdings ist bis heute der Einfluss der Antigen-Spezifität auf die Lebensspanne einer Plasmazelle nicht bekannt (88).

Ob nach der oralen Applikation von OVA und CT Rückstände dieser Antigene im Gewebe über längere Zeit gespeichert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch bekannt ist, dass Plasmazellen nach ihrer terminalen Differenzierung ihre Oberflächenimmunglobuline sowie MHC-II herunterregulieren, ist es unwahrscheinlich, dass persistierende Antigene auf die Langlebigkeit einer Plasmazelle einen Einfluss ausüben (28).

Mit diesem Nachweis von langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria nach einer oralen Immunisierung mit OVA und CT wäre es nun interessant, weiter zu untersuchen, ob auch mit einem anderen Antigen bzw. den üblichen oralen Impfstoffen langlebige ASC induziert werden können und welche Faktoren die Lebensspanne von spezifischen ASC der Lamina propria entscheidend beeinflussen. Bei der Entwicklung von oralen Vakzinen wird, neben der Induktion von spezifischen Antikörpern im Serum sowie von Gedächtniszellen, die Ausbildung einer langanhaltenden humoralen Immunität in der Mukosa angestrebt, da diese für eine erste Abwehr intestinaler Pathogene von großer Bedeutung ist (56, 57, 69, 117, 208).

Entscheidende Faktoren für eine effektive intestinale Immunantwort sind unter anderem die Antigen-Dosis und die wiederholte Antigen-Applikation. Lycke et al. zeigten vor kurzem, dass während einer 3-fachen oralen Immunisierung von Mäusen mit NP-gekoppelten CT (NP – 4-Hydroxy-3-Nitrophenylsäure) aktivierte hoch-affine B-Zellen des GALT durch einen Wiedereintritt in bereits bestehende Keimzentren der verschiedenen Peyer'schen Plaques die Immunreaktionen sowie den Selektionsprozess zunächst synchronisieren, aus denen später die hoch-affinen Plasmazellen der Lamina propria resultieren (127).

Die Affinität für ein spezifisches Antigen ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung und das Überleben der Plasmazellen. Hoch-affine B-Zellen entstehen im Rahmen einer Keimzentrum-Reaktion, wobei sie bevorzugt Signale erhalten, welche ihre Differenzierung und Proliferation sowie ihr Überleben fördern (29). Plasmazellen gehen jedoch aus verschiedenen aktivierten B-Zellen wie z.B. aus B-Gedächtniszellen oder naiven B-Zellen hervor. Tatsächlich ist bisher nicht bekannt, ob auch aus naiven B-Zellen langlebige Plasmazellen resultieren oder ob langlebige Plasmazellen nur aus Keimzentrums-B-Zellen oder B-Gedächtniszellen entstehen können (53).

Wenn spezifische Plasmazellen in der Lamina propria innerhalb einer Nische überleben, stellt sich jedoch die Frage, wie lange sie diese insbesondere im Zusammenhang mit der enormen Antigenmenge, welche die Lamina propria täglich ausgesetzt ist, erfolgreich gegen neu einwandernde Plasmazellen mit Spezifitäten gegen aktuelle Antigene verteidigen können (206). Eine aktuelle Studie zeigte, dass spezifische Plasmazellen im Darm über einen längeren Zeitraum persistieren, wobei allein eine Re-Stimulation gegen andere Bakterienantigene der Kommensalen, die humorale mukosale Immunität gegen das erste

Antigen deutlich minderte (112). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass sich die humorale Immunität des Darmimmunsystems kontinuierlich an das große Repertoire an Kommensalen- und Nahrungsantigenen sowie mukosalen Pathogenen anpasst und folglich spezifische Plasmazellen verdrängt. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse resultieren von SPF-Mäusen, deren Darm während des gesamten Untersuchungszeitraumes mit apathogenen Keimen besiedelt war. Bei der hier beobachteten kontinuierlichen Abnahme der Zahl der OVA-spezifischen Plasmazellen bei konstanter Gesamtzahl der ASC in der Lamina propria (Abb. 8 A) besteht durchaus die Möglichkeit, dass diese zunehmend durch neue Plasmazellen verdrängt wurden. Dennoch kann hier gezeigt werden, dass intestinale Plasmazellen zweifellos das Potenzial aufweisen über mehrere Monate zu überleben.

Um diesen Zusammenhang sowie insbesondere verschiedene Einflussfaktoren auf die langlebigen Plasmazellen näher zu überprüfen, sind weiterführende Untersuchungen denkbar, welche das Vorkommen von EdU+ Plasmazellen analysieren z.B. nach wiederholten oralen Immunisierungen durch diverse andere Antigene in Kombination mit Veränderungen der Kommensalen- und Futterzusammensetzung. Weiterhin wäre denkbar, dass sich diese Anpassung der intestinalen humoralen Immunität zwischen verschiedenen Antigenen unterscheidet und langlebige Plasmazellen in der Lamina propria daher über unterschiedlich lange Zeiträume überleben können. Es ist bekannt, dass auch im Knochenmark Plasmazellpopulationen innerhalb einer Spezifität eine sehr große Varianz in ihrer Langlebigkeit aufweisen und folglich Serumtitern zwischen den verwendeten Vakzinen unterschiedlich stabil sind.

### **5.2.7 Überlebensnischen in der Lamina propria des Dünndarms**

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass das Darmgewebe langlebige Plasmazellen beherbergt, führt zu der Schlussfolgerung, dass auch die Lamina propria - ähnlich wie im Knochenmark - spezielle Nischen enthält, welche den Plasmazellen ein Milieu mit Überlebensfaktoren bieten. Eine Betrachtung der bisher bekannten Überlebensfaktoren z.B. APRIL, CXCL12 und IL-6 ergibt, dass diese auch in der Lamina propria vorkommen (88). An ihrer Bildung sind diverse intestinale Zellen beteiligt. Dendritische Zellen sowie plasmazytoide dendritische Zellen und Epithelzellen produzieren BAFF und APRIL, wobei das Epithel zusätzlich IL-6 und CXCL-12 bildet (88, 113, 114).

Eosinophile Granulozyten werden im Knochenmark als ein Teil der Überlebensnische angesehen. Untersuchungen von Balb/c-Mäusen zeigten, dass die eosinophilen Granulozyten mit Plasmazellen in Kontakt stehen und deren Überleben durch die Produktion von APRIL und IL-6 fördern (44). Auch in der Lamina propria befinden sich zahlreiche eosinophile Granulozyten. Ihre Funktionen bei pathologischen Veränderungen sowie im gesunden Organismus wurden in den letzten Jahren zunehmend erkannt (134, 135, 209–211).

Histologische Untersuchungen der Lamina propria in Bezug auf die Lokalisation der Plasmazellen im Zusammenhang mit den eosinophilen Granulozyten zeigen, dass die Mehrheit der intestinalen Plasmazellen keine eosinophilen Granulozyten in unmittelbarer Nähe aufwies (Abb. 26). Obwohl beide Zelltypen gleichermaßen in den verschiedenen Regionen des Darmgewebes vorkamen, konnte ein direkter Kontakt bzw. eine Ko-Lokalisation innerhalb von 5 µm nur bei 30 % der intestinalen Plasmazellen festgestellt werden (Abb. 26 B).

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei dieser Analyse die Gewebeschnitte nur zweidimensional untersucht wurden und vorkommende Zellen ober- und unterhalb der Ebene nicht mit einbezogen wurden. Weiterhin ist bekannt, dass genetische Faktoren an der Regulation der Bildung von eosinophilen Granulozyten beteiligt sind und daher zwischen den verschiedenen Mausstämmen Unterschiede beobachtet werden können (212, 213). In den hier untersuchten C57BL/6-Mäusen konnte keine vermehrte Ko-Lokalisation zwischen den eosinophilen Granulozyten und den langlebigen Plasmazellen detektiert werden. Es wäre dennoch denkbar, dass beim Menschen bzw. bei anderen Mausstämmen z.B. Balb/c-Mäusen durchaus die eosinophilen Granulozyten einen Beitrag zum Überleben der intestinalen Plasmazellen leisten. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass an den Überlebensnischen des Darmgewebes weitere bzw. andere Faktoren oder Zellen beteiligt sind. Dazu sind weiterführende Untersuchungen mit anderen Mausstämmen sowie Analysen von humanen Gewebe-Biopsaten notwendig.

In den untersuchten Gewebeschnitten dieser Arbeit konnten keine langlebigen EdU+ eosinophilen Granulozyten detektiert werden. Eine Studie zeigte, dass eosinophile Granulozyten, vor allem im Knochenmark, überwiegend kurzlebig sind. Im Rahmen einer Immunantwort, z.B. durch eine Infektion mit *N. brasiliensis*, zeigen die eosinophilen Granulozyten im peripheren Gewebe jedoch eine verlängerte Überlebenszeit (214).

Artspezifisch werden neben den eosinophilen Granulozyten (44) in den verschiedenen Geweben weitere Zellen als APRIL-Produzenten diskutiert, z.B. dendritische Zellen (90, 137), plasmazytoide dendritische Zellen, Makrophagen (48, 137), neutrophile Granulozyten (136), aktivierte T-Zellen sowie Epithelzellen (90). Von diesen verschiedenen Zelltypen sind im Darm hauptsächlich die Epithelzellen und dendritischen Zellen von Bedeutung (90). Die essentielle Funktion von APRIL für das Überleben der Plasmazellen konnte durch Untersuchungen mit APRIL-defizienten Mäusen gezeigt werden. Nach einer systemischen Immunisierung migrierten zwar zunächst Antigen-spezifische Plasmazellen in das Knochenmark, diese konnten jedoch nicht über einen längeren Zeitraum überleben (48). Auch nach einer oralen Immunisierung APRIL-defizienter Mäuse mit OVA und CT war die mukosale humorale Immunität deutlich kürzer als in Wild-Typ-Mäusen (136). In-vitro Experimente mit isolierten humanen Plasmazellen zeigten ebenfalls nach Blockierung von endogenem APRIL eine deutlich verminderte Antikörper-Produktion (111).

Sezerniertes APRIL bindet über HSPG (*Heparan sulfate proteoglycans*) an die CD138-exprimierenden Epithelzellen des Darms. Nach einer lokalen Anreicherung fördert APRIL das Überleben der Plasmazellen, indem es die Expression der anti-apoptischen Proteine bcl-2, bcl-xL und mcl-1 hochreguliert (136). Damit stellt APRIL einen wichtigen Faktor für die Aufrechterhaltung der humoralen Immunität der Mukosa dar.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass in der Lamina propria APRIL umfangreich verfügbar war und hauptsächlich von den Epithelzellen der Villi und im Bereich der Zottenbasis gebildet wurde (Abb. 27 A). Es ist denkbar, dass es sich dabei um APRIL-reiche Nischen handelt, wie sie im humanen Darmgewebe nachgewiesen wurden (136). Ob ähnlich wie im Darm des Menschen vermehrt Plasmazellen in APRIL-Nähe akkumulieren (136), konnte in den durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von APRIL konnte eine Akkumulation der langlebigen Plasmazellen in APRIL-Nähe nicht mit zufriedenstellender Sicherheit beurteilt werden.

Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung von APRIL für das Überleben der Plasmazellen im Dünndarm sowie zur Identifikation der Hauptproduzenten von APRIL im Darmgewebe sind durch eine orale Immunisierung von konditionalen APRIL-knockout Mäusen denkbar, in welchen APRIL in spezifischen Zellen, z.B. Epithelzellen und/oder dendritischen Zellen, ausgeschaltet werden kann. Ferner kann eine Depletion von dendritischen Zellen einen Einblick geben über ihre Beteiligung an einer intestinalen Überlebensnische.

### **5.2.8 Das Dünndarmgewebe beherbergt weitere langlebige Zellen**

Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass in der Lamina propria zahlreiche weitere EdU+ Zellkerne langlebiger Zellen vorhanden waren. Diese Zellen wiesen weder intrazellulär noch an ihrer Zelloberfläche den Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zur Markierung der leichten kappa-Kette auf. Bei diesen Zellen könnte es sich zum einen um Plasmazellen handeln, welche statt der kappa die leichte lamda-Kette exprimierten. Da Ko-Färbungen gegen IgA und kappa jedoch keine IgA+ kappa i.c.-negativen Zellen aufwiesen, handelte es sich bei den langlebigen Zellen vermutlich nicht um Zellen der B-Zelllinie. Die histologischen Untersuchungen gaben ferner Hinweise, dass diese EdU+ Zellkerne der langlebigen Zellen häufig subepithelial lokalisiert waren bzw. detektierbares APRIL in ihrer Nähe aufwiesen.

Das Vorkommen von langlebigen „Nicht-Plasmazellen“ wurde bereits in den Markierungsexperimenten von Mattioli et al. beobachtet (107). Aufgrund der Morphologie dieser Zellen vermuteten sie, dass es sich dabei um Histiozyten, retikuläre Zellen bzw. um Lymphozyten handeln könnte. Um diese langlebigen Zellen zu identifizieren, sind jedoch weitere mikroskopische Untersuchungen von Gewebeschnitten notwendig. Denkbar wären immunfluoreszente Färbungen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen z.B. CD3 und/oder

CD4/CD8, CD44 und CD62L für die Identifikation von T-Gedächtniszellen. Eine Markierung von Stromalen Zellen ist mittels CXCL12 denkbar. Auch Monozyten bzw. dendritische Zellen und Makrophagen kommen aufgrund ihrer häufig subepithelialen Lokalisation in Betracht (57, 215). Diese Zellen zeigen zumeist eine hohe Proliferationsrate, wodurch sie als langlebige Zellen vermutlich weniger in Frage kommen. Bei den dendritischen Zellen jedoch sind durchaus Subpopulationen bekannt, die über mehrere Wochen leben können (216).

Weitere EdU<sup>+</sup> Zellkerne langlebiger Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit in den Peyer'schen Plaques nachgewiesen (Abb. 28). Die Anfärbung mit einem Fluorochromgekoppelten Antikörper gegen die leichte kappa-Kette an ihrer Zelloberfläche gibt einen Hinweis darauf, dass es sich um B-Gedächtniszellen handeln könnte. Es ist bekannt, dass die orale Verabreichung von CT spezifische B-Gedächtniszellen induziert (126, 217, 218). Verschiedene Studien zeigten, dass B-Gedächtniszellen in den Peyer'schen Plaques (138) sowie in den mesenterialen Lymphknoten und der Milz akkumulieren (139). Diese führen zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort als beim Erst-Kontakt und sind bei der Maus vermutlich lebenslang vorhanden (217).

### **5.2.9 Intestinal induzierte Plasmazellen tragen zum langlebigen Plasmazell-kompartiment des Knochenmarks bei**

Die Persistenz der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark sowie ein stabiler Serumtiter nach systemischer sowie nach oraler Immunisierung weisen auf die große Bedeutung des Knochenmarks als Effektororgan zur Aufrechterhaltung einer humoralen Immunität für beide Applikationsarten hin. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob intestinal induzierte Plasmazellen ähnlich wie nach systemischer Immunreaktionen im Knochenmark zum langlebigen Plasmazellkompartiment beitragen können.

Die Ergebnisse zeigen, dass über die Hälfte der OVA-spezifischen ASC, welche 4 Monate nach Antigen-Kontakt im Knochenmark detektiert werden konnten, noch immer EdU enthielten und folglich ohne bzw. nach maximal einer Proliferation persistierten (Abb. 20 B). Damit wird mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt, dass intestinal induzierte Plasmazellen erfolgreich Überlebensnischen des Knochenmarks besetzen und dort mehrere Monate überleben können. Mikroskopische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse. OVA-spezifische ASC konnten 12 Tage nach der sekundären Immunisierung in unmittelbarer Nähe der Sinusoide des Knochenmarks detektiert werden (Abb. 17). 4 Monate später waren sie innerhalb des Parenchyms des Knochenmarks lokalisiert (Abb. 24). Ähnliche Beobachtungen wurden bei systemisch induzierten Antigen-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark gemacht (44).

In einem Vergleich mit der Lamina propria ist ersichtlich, dass OVA-spezifische ASC im Knochenmark häufiger langlebig werden können. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass das Knochenmark die Mehrheit aller langlebigen OVA-spezifischen Plasmazellen beherbergt. Auch hier ist anzunehmen, dass aufgrund der unterschiedlichen Isolationsmethode die tatsächliche Zahl der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria etwas höher ist als ermittelt wurde. Da jedoch im Knochenmark 27-fach mehr EdU+ ASC bestimmt wurden und der Verlust intestinaler Lymphozyten während der Isolation aus der Lamina propria deutlich geringer angenommen wird, kann man aus den Resultaten schlussfolgern, dass das Knochenmark die meisten langlebigen ASC des Körpers beherbergt. Dies wird zwar bereits seit einigen Jahren vermutet, aufgrund der durchgeführten systemischen Immunisierungen wurden die intestinalen ASC jedoch nicht in die Analysen mit einbezogen (12, 16, 41).

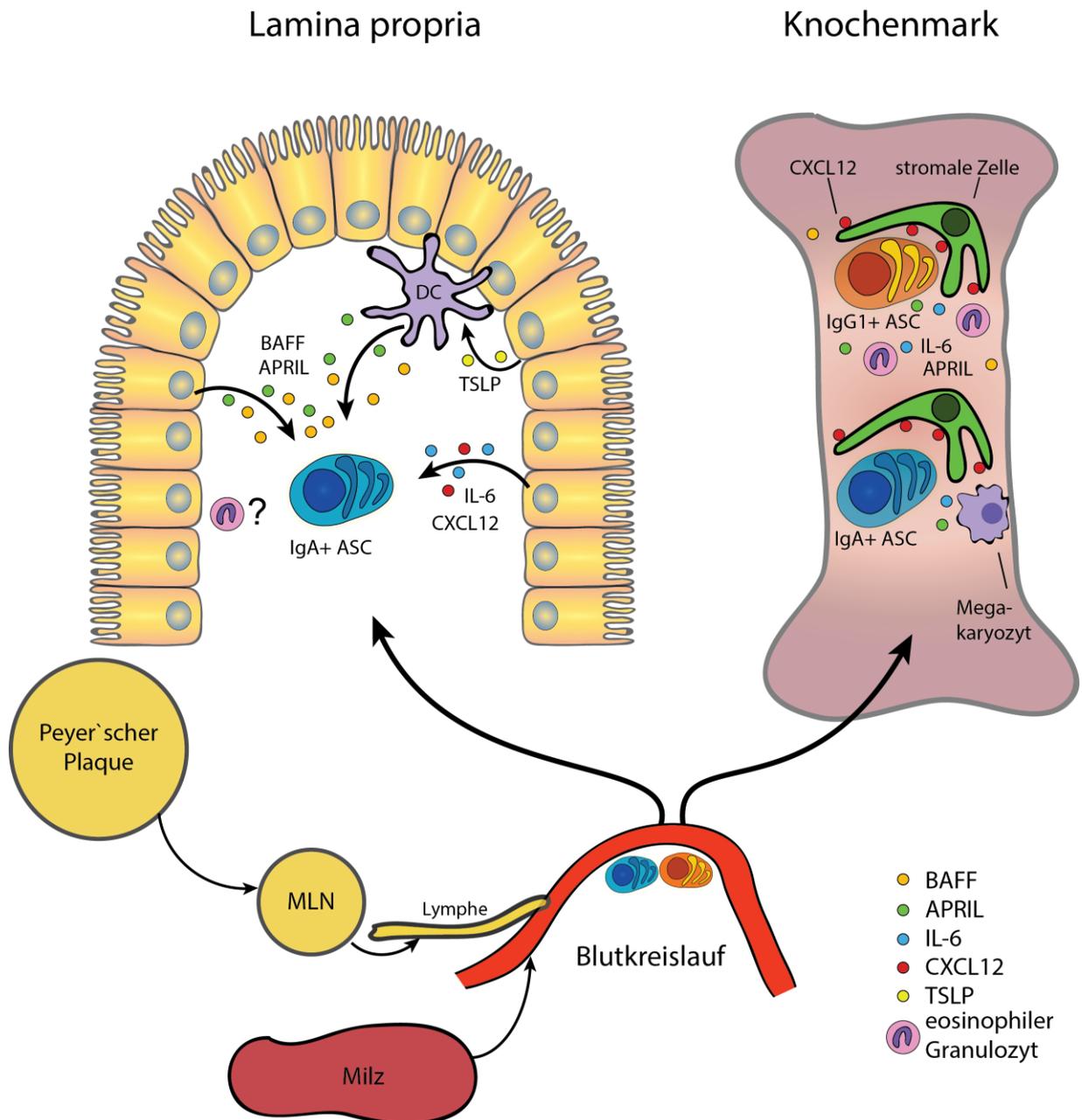
Weiterhin stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Langlebigkeit von Plasmazellen und ihrem Isotyp. Im Einklang mit einer früheren Studie (30) wurde innerhalb des gesamten Plasmazellkompartiments kein Unterschied der Proliferationsrate zwischen IgA+ und IgG<sub>1</sub>+ Plasmazellen festgestellt (Abb. 21 A). Bei Betrachtung der OVA-spezifischen Plasmazellen des Knochenmarks zeigen die Ergebnisse jedoch, dass langlebige ASC des Isotyps IgG<sub>1</sub> eine bessere Überlebenschance bzw. eine längere Überlebensspanne aufwiesen als langlebige ASC des Isotyps IgA, deren Zahl kontinuierlich abnahm (Abb. 21 B). Dies lässt vermuten, dass zusätzliche Faktoren wie z.B. die Entstehung der Plasmazellen und ihre Antigen-Spezifität im Zusammenhang mit ihrem Isotyp einen entscheidenden Einfluss auf die Lebenszeit ausüben. Auch andere, hier nicht weiter definierte Isotypen, überlebten über mehrere Monate, wobei diese im Rahmen der oralen Immunisierung nur einen sehr geringen Anteil bildeten.

Nach einer oralen CT-Applikation werden spezifische Plasmazellen in den Peyer'schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten und der Milz gebildet, wobei ihr Zusammenspiel bis heute nicht vollständig geklärt ist (127). Eine Beteiligung der ILF ist kontrovers. Kürzlich erworbene Resultate zeigen, dass sie an der Immunreaktion mit einem TD-Antigen nicht teilnehmen (127). Dabei ist die Frage, ob der Ort der Entstehung einen Einfluss auf die Langlebigkeit einer Plasmazelle ausübt, bisher unbeantwortet.

Nach einer systemischen Immunisierung migrieren IgG+ Plasmazellen nur innerhalb eines engen Zeitfensters nach Antigenkontakt gegen CXCL12 in das Knochenmark. Obwohl sie die Expression von CXCR4 aufrecht erhalten, sind sie nach ihrer Ankunft im Knochenmark nicht mehr gegen CXCL12 migrationsfähig (36, 37, 219). Es wurde gezeigt, dass CXCR4 für das Überleben der Plasmazellen von Bedeutung ist (36, 46). Intestinal induzierte IgA+ ASC exprimieren in den Peyer'schen Plaques, in den mesenterialen Lymphknoten sowie während ihrer Zirkulation durch das Blut zunächst CCR9. Sobald sie jedoch in der Lamina propria ankommen, regulieren sie diesen Chemokin-Rezeptor herunter (101) und verlieren ihre

Migrationsfähigkeit. Aus diesen Gründen sowie der Beobachtung, dass Plasmazellen, welche ihre Nische verlassen, apoptotisch sterben, ist eine Migration der Plasmazellen von der Lamina propria ins Knochenmark bzw. umgekehrt unwahrscheinlich.

Eine schematische Darstellung fasst die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen (Abb. 29). Durch die orale Immunisierung mit OVA und CT werden in den Peyer'schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten sowie in der Milz spezifische ASC induziert. Diese migrieren über die Blutzirkulation in verschiedene Effektororgane. Dabei kommt es zu einer Akkumulation von spezifischen ASC des Isotyps IgA in der Lamina propria, während im Knochenmark hauptsächlich spezifische ASC der Isotypen IgA und IgG<sub>1</sub> akkumulieren. Sowohl die Lamina propria als auch das Knochenmark beherbergen Überlebensnischen, in welchen ein Teil der eingewanderten ASC langlebig werden kann. In diesen Nischen fördern verschiedene Faktoren das Überleben der Plasmazellen, wobei noch nicht alle Faktoren bekannt sind. Ähnlich wie nach einer systemischen Immunreaktion, gewährleisten langlebige spezifische Plasmazellen, induziert durch eine orale Immunisierung, eine stabile humorale Immunität durch die Sekretion von spezifischen Antikörpern.



**Abb. 29. Migration oral induzierter Plasmazellen in die Lamina propria und das Knochenmark.**

Die schematische Darstellung zeigt die Induktion von spezifischen ASC nach der oralen Immunisierung in den Peyer'schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten (MLN) und der Milz. Die resultierenden Plasmablasten migrieren über die Lymphbahn und/oder die Blutzirkulation in die Lamina propria bzw. das Knochenmark. Während im Darm nahezu ausschließlich Plasmazellen des Isotyps IgA (blau) akkumulieren, migrieren neben IgA+ ASC auch IgG<sub>1</sub>+ ASC in das Knochenmark. Im Knochenmark sind diverse Faktoren bzw. Zellen bekannt, welche gemeinsam eine Überlebensnische für Plasmazellen bilden. Eine Auswahl dieser Faktoren ist hier schematisch dargestellt. Auch in der Lamina propria werden einige der bisher bekannten Überlebensfaktoren gebildet. Diese könnten eine ähnliche Überlebensnische bilden wie im Knochenmark. Ob in der Lamina propria auch eosinophile Granulozyten ein Teil dieser Nische bilden, bleibt ungeklärt. Dieses Schema orientiert sich an bereits publizierte Abbildungen (53, 88, 220), welche modifiziert wurden.

### 5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Rahmen einer intestinalen Immunantwort spezifische langlebige Plasmazellen gebildet werden, welche im Darmgewebe und im Knochenmark persistieren. Intestinal induzierte Plasmazellen besetzen Überlebensnischen im Knochenmark und erhalten durch ihre Sekretion spezifischer Antikörper einen stabilen Serumentiter aufrecht. Diese neuen Erkenntnisse bieten damit eine Vielzahl interessanter Aspekte für weiterführende Untersuchungen.

Die Anwendung von EdU stellt ein geeignetes System dar, langlebige Plasmazellen eindeutig zu identifizieren und weiter zu charakterisieren. Die hier ermittelten Resultate zeigen, dass eine Subpopulation intestinaler Plasmazellen die Fähigkeit zur Langlebigkeit aufweist. Um diese langlebigen Plasmazellen auf ihren Differenzierungsstatus sowie ihr Potenzial, Antigen zu präsentieren bzw. selbst zu binden, näher zu charakterisieren, können Analysen der Expression von MHC-II, B220 und membranständigen Immunglobulinen Informationen geben. Weiterhin können Untersuchungen der Expression von Chemokin-Rezeptoren wie z.B. CXCR4, CCR9, CCR10, welche die Migration der ASC in Darm und Knochenmark ermöglichen, Aufschluss über die Herkunft der Plasmazellen geben sowie über die Bedeutung dieser Rezeptoren für ihr Überleben. Diese Untersuchungen werden innerhalb der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt. Eine Transkriptom-Analyse der kurzlebigen sowie langlebigen Plasmazellen des Darms kann einen Einblick geben in die Genexpression dieser heterogenen Zellpopulationen.

Das Vorkommen von langlebigen Plasmazellen im Darm zeigt auf, dass die Lamina propria ähnlich wie im Knochenmark Überlebensnischen beherbergt. Durch weitere histologische Untersuchungen der Umgebung von EdU+ ASC innerhalb des Darmgewebes auf zelluläre Komponenten sowie lösliche Faktoren können diese Nischen näher charakterisiert werden. Neue Zusammenhänge zwischen der Langlebigkeit einer intestinalen Plasmazelle und ihrem umgebenden Mikromilieu könnten wichtige Ansatzpunkte für das Nischenkonzept im Knochenmark bieten. Dies ist von großer Bedeutung, da neben den schützenden langlebigen Plasmazellen auch autoreaktive, maligne bzw. Allergen-spezifische Plasmazellen in Überlebensnischen verschiedener Organen über einen langen Zeitraum überleben können. Um diese pathogenen Plasmazellen zu eliminieren, sind die Nischen selbst mit ihren verschiedenen Komponenten das therapeutische Ziel (221).

Für das weitere Verständnis einer Verbindung zwischen dem mukosalen und dem systemischen Immunsystem sind Untersuchungen der Bildungsorte jener Plasmazellen wichtig, welche im Knochenmark zum langlebigen Kompartiment beitragen können. Um insbesondere die Rolle der Milz in der Bildung langlebiger intestinal induzierter Plasmazellen zu analysieren, könnten Untersuchungen nach Splenektomie Aufschluss geben.

## Diskussion

---

Die Erkenntnis, dass eine gezielte mukosale Antigen-Applikation langlebige spezifische Plasmazellen induziert, welche im Darm, mehrheitlich jedoch im Knochenmark, persistieren, ist auch für die Anwendung und Entwicklung oraler Vakzine von Bedeutung. Um Faktoren zu ermitteln, welche die Lebensspanne und das Migrationsverhalten der Plasmazellen beeinflussen, sind Untersuchungen mit verschiedenen Antigenen sowie Adjuvanzen in Kombination mit Veränderungen der Darmflora und/oder Nahrungsbestandteilen denkbar.

## 6 Zusammenfassung

### Untersuchung der Lebenszeit von Plasmazellen nach der oralen Immunisierung von Mäusen

Plasmazellen gewährleisten durch ihre Sekretion von spezifischen Antikörpern eine langanhaltende humorale Immunität eines Organismus. Sie werden nach einem gastrointestinalen Antigen-Kontakt in den darmassoziierten Lymphgeweben sowie den drainierenden mesenterialen Lymphknoten gebildet. Je nach Antigen kann auch die Milz an ihrer Entstehung beteiligt sein. Von dort migrieren die überwiegend IgA<sup>+</sup> ASC in die Lamina propria des Darmgewebes. Ihre sezernierten spezifischen IgA-Antikörper werden in das Darmlumen transportiert, wo sie Pathogene und Toxine spezifisch markieren und neutralisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch eine zweimalige orale Immunisierung spezifische ASC induziert werden, welche nach ihrer Migration im Darm und im Knochenmark langlebig werden können.

Histologische Untersuchungen des Darmgewebes auf bekannte überlebensfördernde Faktoren für Plasmazellen ergeben, dass eine Ko-Lokalisation zwischen langlebigen Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten, wie sie im Knochenmark nach einer systemischen Immunisierung beobachtet wird (44), nicht vorliegt.

Der Überlebensfaktor APRIL wird im Darm zwar umfangreich produziert, die Untersuchungen lassen jedoch keinen Rückschluss zu, ob langlebige ASC in unmittelbarer Nähe von APRIL akkumulieren. Da APRIL in löslicher Form vorliegt, ist es daher auch ohne direkten Kontakt an eosinophile Granulozyten für Plasmazellen verfügbar. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass andere Faktoren an den Überlebensnischen des Darmgewebes beteiligt sind.

Während der Darm nahezu ausnahmslos langlebige ASC des Isotyps IgA beherbergt, akkumulieren im Knochenmark spezifische ASC der Isotypen IgA und IgG<sub>1</sub>. Sowohl IgA<sup>+</sup> als auch IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> spezifische ASC können im Knochenmark in einer Überlebensnische persistieren, wobei die Ergebnisse Hinweise geben, dass ASC des Isotyps IgG<sub>1</sub> eine bessere Überlebenschance im Knochenmark aufweisen als diejenigen des Isotyps IgA.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass intestinal induzierte ASC in das Knochenmark migrieren und dort als langlebige ASC persistieren können. Sie sezernieren über mehrere Monate spezifische Antikörper und erhalten einen stabilen Serumtiter aufrecht.

## 7 Summary

### Analysis of Lifetime of plasma cells after oral immunization of mice

Plasma cells provide long-lasting humoral immunity by secretion of specific antibodies. After gastrointestinal application of antigens they are generated in gut-associated lymphoid tissue and their draining mesenteric lymph nodes. Depending on the antigen the spleen also participates in generation of intestinal induced plasma cells. The resulting plasma blasts predominantly express IgA isotype and migrate into the lamina propria of the small intestine. Secreted IgA antibodies are transported into the gut lumen where they specifically mark and neutralize pathogens and toxins, respectively.

The results show that immunizing mice two times orally can induce antigen-specific plasma cells that can become long-lived within the lamina propria and bone marrow. Histologic investigations of the lamina propria regarding the incidence of known survival factors for plasma cells show that long-lived plasma cells do not co-localize with eosinophils as they do in bone marrow after systemic immunization (44). The survival factor APRIL is constitutively expressed in the lamina propria but analysis permit no preferential accumulation of plasma cells in APRIL-enriched regions. This observation can be explained by the presence of soluble APRIL in the lamina propria. Moreover, other factors might be part of the intestinal survival niche.

Whereas the small intestine harbors long-lived plasma cells of the IgA isotype exclusively, IgA<sup>+</sup> and IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> plasma cells specific for orally administered antigens accumulate in the bone marrow. Both IgA<sup>+</sup> and IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> ASC persist in the bone marrow in survival niches while results imply that IgG<sub>1</sub><sup>+</sup> plasma cells are of considerable higher viability than IgA<sup>+</sup> plasma cells.

The results of this work show that intestinal induced plasma cells migrate to the bone marrow where they survive as long-lived plasma cells. They secrete specific antibodies for several months and thereby provide a constant serum titer.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*,
2. Jung, D., C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, and F. W. Alt. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 541–570.
3. Fahey, J. L., and S. Sell. 1965. The immunoglobulins of mice, V. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. *J. Exp. Med.* 122: 41–58.
4. Talbot, P. J., and M. J. Buchmeier. 1987. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* 60: 485–489.
5. Vieira, P., and K. Rajewsky. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur. J. Immunol.* 18: 313–316.
6. Shaffer, A. L., K. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltzane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, and L. M. Staudt. 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17: 51–62.
7. Shapiro-Shelef, M., K.-I. Lin, L. J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M. G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19: 607–620.
8. Calame, K. L. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* 2: 1103–1108.
9. Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553–563.
10. MacLennan, I. C. M., K.-M. Toellner, A. F. Cunningham, D. M. Sze, M. C. Cook, and C. G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194: 8–18.
11. Smith, K. G., T. D. Hewitson, G. J. Nossal, and D. M. Tarlinton. 1996. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* 26: 444–448.
12. Manz, R. A., M. Löhning, G. Cassese, A. Thiel, and A. Radbruch. 1998. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* 10: 1703–1711.
13. Höfer, T., G. Muehlinghaus, K. Moser, T. Yoshida, H. E Mei, K. Hebel, A. Hauser, B. Hoyer, E. O Luger, T. Dörner, R. a Manz, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2006. Adaptation of humoral memory. *Immunol. Rev.* 211: 295–302.
14. Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388: 133–134.

15. Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8: 363–372.
16. Slifka, M. K., M. Matloubian, and R. Ahmed. 1995. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J. Virol.* 69: 1895–1902.
17. Benner, R., W. Hijmans, and J. J. Haaijman. 1981. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 46: 1–8.
18. Tew, J. G., R. M. DiLosa, G. F. Burton, M. H. Kosco, L. I. Kupp, A. Masuda, and A. K. Szakal. 1992. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol. Rev.* 126: 99–112.
19. Amanna, I. J., N. E. Carlson, and M. K. Slifka. 2007. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N. Engl. J. Med.* 357: 1903–1915.
20. Tew, J. G., R. P. Philipps, and T. E. Mandel. 1980. The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 53: 175–201.
21. Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298: 2199–2202.
22. Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, T. M. Kündig, S. Oehen, H. Pirchet, and H. Hengartner. 1996. On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 333–367.
23. Nossal, G. J. V., and O. Mäkelä. 1962. Autoradiographic studies on the immune response. I. The kinetics of plasma cell proliferation. *J. Exp. Med.* 115: 209–230.
24. Schooley, J. C. 1961. Autoradiographic observations of plasma cell formation. *J. Immunol.* 86: 331–337.
25. Manz, R. A., and A. Radbruch. 2002. Plasma cells for a lifetime? *Eur. J. Immunol.* 32: 923–927.
26. Miller, J. J. 1964. An autoradiographic study of plasma cell and lymphocyte survival in rat popliteal lymph nodes. *J. Immunol.* 92: 673–681.
27. Manz, R. A., S. Arce, G. Cassese, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 517–521.
28. Slifka, M. K., and R. Ahmed. 1998. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 252–258.
29. Oracki, S. A., J. A. Walker, M. L. Hibbs, L. M. Corcoran, and D. M. Tarlinton. 2010. Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237: 140–159.
30. Ho, F., J. E. Lortan, I. C. M. MacLennan, and M. Khan. 1986. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur. J. Immunol.* 16: 1297–1301.
31. Brandtzaeg, P., and F. Johansen. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206: 32–63.

32. Hutloff, A., K. Büchner, K. Reiter, H. J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Dörner, and R. A. Kroczeck. 2004. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 50: 3211–3220.
33. Kim, H.-J., V. Krenn, G. Steinhauser, and C. Berek. 2013. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J. Immunol.* 162: 3053–3062.
34. Luger, E. O., V. Fokuhl, M. Wegmann, M. Abram, K. Tillack, G. Achatz, R. A. Manz, M. Worm, A. Radbruch, and H. Renz. 2009. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 819–26.e4.
35. Abram, M., M. Wegmann, V. Fokuhl, S. Sonar, E. O. Luger, S. Kerzel, A. Radbruch, H. Renz, and M. Zemlin. 2009. Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 182: 4705–4712.
36. Hauser, A. E., G. F. Debes, S. Arce, G. Cassese, A. Hamann, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol.* 169: 1277–1282.
37. Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, T. T. Lu, V. N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, Y. R. Zou, D. R. Littman, and J. G. Cyster. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194: 45–56.
38. Lazarus, N. H., E. J. Kunkel, B. Johnston, E. Wilson, K. R. Youngman, and E. C. Butcher. 2003. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J. Immunol.* 170: 3799–3805.
39. Kunkel, E. J., J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Boisvert, A. I. Roberts, E. C. Ebert, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, C. M. Parker, E. C. Butcher, D. P. Andrew, and W. W. Agace. 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J. Exp. Med.* 192: 761–767.
40. Kunkel, E. J., C. H. Kim, N. H. Lazarus, M. A. Vierra, D. Soler, E. P. Bowman, and E. C. Butcher. 2003. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J. Clin. Invest.* 111: 1001–1010.
41. Manz, R. A., A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Maintenance of Serum Antibody Levels. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 367–386.
42. Yoshida, T., H. Mei, T. Dörner, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Fillatreau, and B. F. Hoyer. 2010. Memory B and memory plasma cells. *Immunol. Rev.* 237: 117–139.
43. Tokoyoda, K., A. E. Hauser, T. Nakayama, and A. Radbruch. 2010. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 193–200.
44. Chu, V. T., A. Fröhlich, G. Steinhauser, T. Scheel, T. Roch, S. Fillatreau, J. J. Lee, M. Löhning, and C. Berek. 2011. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* 12: 151–159.

45. Winter, O., K. Moser, E. Mohr, D. Zotos, H. Kaminski, M. Szyska, K. Roth, D. M. Wong, C. Dame, D. M. Tarlinton, H. Schulze, I. C. M. MacLennan, and R. A. Manz. 2010. Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116: 1867–1875.
46. Cassese, G., S. Arce, A. E. Hauser, K. Lehnert, B. Moewes, M. Mostarac, G. Muehlinghaus, M. Szyska, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol.* 171: 1684–1690.
47. Minges Wols, H. A., G. H. Underhill, G. S. Kansas, and P. L. Witte. 2002. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol.* 169: 4213–4221.
48. Belnoue, E., M. Pihlgren, T. L. McGaha, C. Tougne, A.-F. Rochat, C. Bossen, P. Schneider, B. Huard, P.-H. Lambert, and C.-A. Siegrist. 2008. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111: 2755–2764.
49. Tokoyoda, K., T. Egawa, T. Sugiyama, B.-I. Choi, and T. Nagasawa. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20: 707–718.
50. O'Connor, B. P., V. S. Raman, L. D. Erickson, W. J. Cook, L. K. Weaver, C. Ahonen, L.-L. Lin, G. T. Mantchev, R. J. Bram, and R. J. Noelle. 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* 199: 91–98.
51. Chevrier, S., C. Genton, A. Kallies, A. Karnowski, L. A. Otten, B. Malissen, M. Malissen, M. Botto, L. M. Corcoran, S. L. Nutt, and H. Acha-Orbea. 2009. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 3895–3900.
52. Xiang, Z., A. J. Cutler, R. J. Brownlie, K. Fairfax, K. E. Lawlor, E. Severinson, E. U. Walker, R. A. Manz, D. M. Tarlinton, and K. G. C. Smith. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat. Immunol.* 8: 419–429.
53. Radbruch, A., G. Muehlinghaus, E. O. Luger, A. Inamine, K. G. C. Smith, T. Dörner, and F. Hiepe. 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 741–750.
54. Brandtzaeg, P. 2009. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand. J. Immunol.* 70: 505–515.
55. Czerkinsky, C., and J. Holmgren. 2010. Topical immunization strategies. *Mucosal Immunol.* 3: 545–555.
56. Lycke, N. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 592–605.
57. Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 148–158.

58. Smith, P. D., T. T. MacDonald, and R. S. Blumberg. 2012. *Principles of Mucosal Immunology*.
59. Bemark, M., P. Boysen, and N. Y. Lycke. 2012. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1247: 97–116.
60. Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 435–446.
61. Mowat, A. M. 1999. Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 15: 546–556.
62. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 331–341.
63. Mostov, K. E., and D. L. Deitcher. 1986. Polymeric immunoglobulin MDCK cells transcytoses receptor IgA expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell* 46: 613–621.
64. Cerutti, A. 2008. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol.* 1: 8–10.
65. Brandtzaeg, P., and K. Tolo. 1977. Mucosal penetrability enhanced by serum-derived antibodies. *Nature* 266: 262–263.
66. Macpherson, A. J., K. D. McCoy, F.-E. Johansen, and P. Brandtzaeg. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1: 11–22.
67. Mantis, N. J., M. C. Cheung, R. Koteswara, J. Rey, B. Corthésy, and R. Neutra. 2002. Selective adherence of IgA to murine peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* 169: 1844–1851.
68. Kadaoui, K. A., and B. Corthe. 2007. Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J. Immunol.* 179: 7751–7757.
69. Burns, J. W., M. Siadat-Pajouh, A. A. Krishnaney, and H. B. Greenberg. 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 272: 104–107.
70. Bomsel, M., M. Heyman, H. Hocini, S. Lagaye, L. Belec, C. Dupont, and C. Desgranges. 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9: 277–287.
71. Craig, S. W., and J. J. Cebra. 1971. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 134: 188–200.
72. Tsuji, M., K. Suzuki, H. Kitamura, M. Maruya, K. Kinoshita, I. I. Ivanov, K. Itoh, D. R. Littman, and S. Fagarasan. 2008. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 29: 261–271.

73. Kroese, F. G. M., E. C. Butcher, A. M. Stall, P. A. Lalor, S. Adams, and L. A. Herzenberg. 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.* 1: 75–84.
74. Suzuki, K., M. Maruya, S. Kawamoto, and S. Fagarasan. 2010. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol. Rev.* 237: 180–190.
75. Kopf, M., F. Brombacher, P. D. Hodgkin, A. J. Ramsay, E. A. Milbourne, W. J. Dai, K. S. Ovington, C. A. Behm, G. Köhler, I. G. Young, and K. I. Matthaei. 1996. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5<sup>+</sup> B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4: 15–24.
76. Ha, S., M. Tsuji, K. Suzuki, B. Meek, N. Yasuda, T. Kaisho, and S. Fagarasan. 2006. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J. Exp. Med.* 203: 2541–2550.
77. Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288: 2222–2226.
78. Stoel, M., H.-Q. Jiang, C. C. van Diemen, J. C. a M. Bun, P. M. Dammers, M. C. Thurnheer, F. G. M. Kroese, J. J. Cebra, and N. A. Bos. 2005. Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts. *J. Immunol.* 174: 1046–1054.
79. Lam, K.-P., and K. Rajewsky. 1999. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* 190: 471–477.
80. Berland, R., and H. H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 253–300.
81. Neutra, M. R., E. Pringault, and J.-P. Kraehenbuhl. 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275–300.
82. Jang, M. H., M.-N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, and H. K. Kiyono. 2004. Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 6110–6115.
83. Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H.-C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307: 254–258.
84. Cerutti, A., and M. Rescigno. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28: 740–750.
85. Casola, S., and K. Rajewsky. 2006. B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308: 155–171.
86. Park, S.-R., J.-H. Lee, and P.-H. Kim. 2001. Smad3 and Smad4 mediate transforming growth factor- $\beta$ 1-induced IgA expression in murine B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 31: 1706–1715.

87. Suzuki, K., M. Maruya, S. Kawamoto, K. Sitnik, H. Kitamura, W. Agace, and S. Fagarasan. 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 33: 71–83.
88. Pabst, O. 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 821–832.
89. Castigli, E., S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A. K. Bhan, E. Mizoguchi, and R. S. Geha. 2004. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3903–3908.
90. He, B., W. Xu, P. a Santini, A. D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D. M. Knowles, M. Rescigno, and A. Cerutti. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26: 812–826.
91. Mora, J. R., M. Iwata, and U. H. Von Andrian. 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 685–698.
92. Mora, J. R., M. Iwata, B. Eksteen, S.-Y. Song, T. Junt, B. Senman, K. L. Otipoby, A. Yokota, H. Takeuchi, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Rajewsky, D. H. Adams, and U. H. von Andrian. 2006. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314: 115711–60.
93. Endsley, M. A., L. M. Njongmeta, E. Shell, M. W. Ryan, A. J. Indrikovs, S. Ulualp, R. M. Goldblum, W. Mwangi, and D. M. Estes. 2009. Human IgA-inducing protein from dendritic cells induces IgA production by naive IgD+ B cells. *J. Immunol.* 182: 1854–1859.
94. Fagarasan, S., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Ikuta, and T. Honjo. 2001. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413: 639–643.
95. Shikina, T., T. Hiroi, K. Iwatani, M. H. Jang, S. Fukuyama, M. Tamura, T. Kubo, H. Ishikawa, and H. Kiyono. 2004. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.* 172: 6259–6264.
96. Bergqvist, P., E. Gärdby, A. Stensson, M. Bemark, and N. Y. Lycke. 2006. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J. Immunol.* 177: 7772–7783.
97. Fagarasan, S., S. Kawamoto, O. Kanagawa, and K. Suzuki. 2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 243–273.
98. Husband, A. J., and J. L. Gowans. 1978. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.* 148: 1146–1160.
99. Brandtzaeg, P. 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25: 5467–5484.
100. Papadakis, K. A., J. Prehn, V. Nelson, L. Cheng, S. W. Binder, P. D. Ponath, D. P. Andrew, and S. R. Targan. 2000. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on

- lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J. Immunol.* 165: 5069–5076.
101. Pabst, O., L. Ohi, M. Wendland, M. Wurbel, E. Kremmer, B. Malissen, and R. Förster. 2004. Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J. Immunol.* 199: 411–416.
102. Quiding-Järbrink, M., I. Nordström, G. Granström, A. Kilander, M. Jertborn, E. C. Butcher, a I. Lazarovits, J. Holmgren, and C. Czerkinsky. 1997. Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses. *J. Clin. Invest.* 99: 1281–1286.
103. Fagarasan, S., and T. Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 63–72.
104. Van der Heijden, P. J., W. Stok, and a T. Bianchi. 1987. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total “background” immunoglobulin production. *Immunology* 62: 551–555.
105. Hiepe, F., and A. Radbruch. 2006. Is long-term humoral immunity in the mucosa provided by long-lived plasma cells? A question still open. *Eur. J. Immunol.* 36: 1068–1069.
106. Gowans, J. L., and E. J. Knight. 1964. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 159: 257–282.
107. Mattioli, C. A., and T. B. Tomasi. 1973. The life span of IgA plasma cells from the mouse intestine. *J. Exp. Med.* 138: 452–460.
108. Mei, H. E., T. Yoshida, W. Sime, F. Hiepe, K. Thiele, R. A. Manz, A. Radbruch, and T. Dörner. 2009. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 113: 2461–2469.
109. Liang, B., L. Hyland, S. Hou, B. I. N. Liang, and S. A. M. Hou. 2001. Nasal-associated lymphoid tissue is a site of long-term virus-specific antibody production following respiratory virus infection of mice. *J. Virol.* 75: 5416–5420.
110. Etchart, N., B. Baaten, S. R. Andersen, L. Hyland, S. Y. C. Wong, and S. Hou. 2006. Intranasal immunisation with inactivated RSV and bacterial adjuvants induces mucosal protection and abrogates eosinophilia upon challenge. *Eur. J. Immunol.* 36: 1136–1144.
111. Mesin, L., R. Di Niro, K. M. Thompson, K. E. a Lundin, and L. M. Sollid. 2011. Long-lived plasma cells from human small intestine biopsies secrete immunoglobulins for many weeks in vitro. *J. Immunol.* 187: 2867–2874.
112. Hapfelmeier, S., M. a E. Lawson, E. Slack, J. K. Kirundi, M. Stoel, M. Heikenwalder, J. Cahenzli, Y. Velykoredko, M. L. Balmer, K. Endt, M. B. Geuking, R. Curtiss, K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. 2010. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328: 1705–1709.
113. Ng, E. K., N. Panesar, E. Longo, M. J. Shapiro, D. L. Kaminski, K. C. Tolman, and J. E. Mazuski. 2003. Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. *Mediators Inflamm.* 12: 3–8.

114. Agace, W. W., A. Amara, a I. Roberts, J. L. Pablos, S. Thelen, M. Ugucioni, X. Y. Li, J. Marsal, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, E. C. Ebert, B. Moser, and C. M. Parker. 2000. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr. Biol.* 10: 325–328.
115. Renegar, K. B., P. A. Small, L. G. Boykins, and P. F. Wright. 2004. Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. *J. Immunol.* 173: 1978–1986.
116. Holmgren, J., and C. Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11: S45–S53.
117. Holmgren, J., and A.-M. Svennerholm. 2012. Vaccines against mucosal infections. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 343–353.
118. Levine, M. M. 2010. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biol.* 8.
119. Lönnroth, I., and J. Holmgren. 1973. Subunit Structure of Cholera Toxin. *J. Gen. Microbiol.* 76: 417–427.
120. Holmgren, J., L. Lindholm, and I. Lönnroth. 1974. Interaction of cholera toxin and toxin derivatives with lymphocytes, I. Binding properties and interference with Lectin-induced cellular stimulation. *J. Exp. Med.* 139: 801–819.
121. Van Heyningen, S. 1974. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* 183: 656–657.
122. Sánchez, J., and J. Holmgren. 2008. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 1347–1360.
123. Cassel, D., and T. Pfeuffer. 1978. Mechanism of cholera toxin action: Covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2669–2673.
124. Elson, C. O., and W. Ealding. 1984. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* 132: 2736–2741.
125. Lycke, N., and J. Holmgren. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 59: 301–308.
126. Vajdy, M., and N. Y. Lycke. 1992. Cholera toxin adjuvant promotes long-term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization. *Immunology* 75: 488–492.
127. Bergqvist, P., A. Stensson, L. Hazanov, A. Holmberg, J. Mattsson, R. Mehr, M. Bemark, and N. Y. Lycke. 2012. Re-utilization of germinal centers in multiple Peyer's patches results in highly synchronized, oligoclonal, and affinity-matured gut IgA responses. *Mucosal Immunol.* XX: 1–14.
128. Van der Heijden, P. J., A. T. J. Bianchi, B. A. Bokhout, M. Dol, J. W. Scholten, and W. Stok. 1989. Quantification of antigen-specific antibody-secreting cells in the small intestine and other lymphoid organs of mice after oral booster immunization. *Immunology* 66: 404–409.

129. Holmgren, J., J. Adamsson, F. Anjuère, J. Clemens, C. Czerkinsky, K. Eriksson, C.-F. Flach, A. George-Chandy, A. M. Harandi, M. Lebens, T. Lehner, M. Lindblad, E. Nygren, S. Raghavan, J. Sanchez, M. Stanford, J.-B. Sun, A.-M. Svennerholm, and S. Tengvall. 2005. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol. Lett.* 97: 181–188.
130. Lefrancois, L., and N. Lycke. 1996. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr. Protoc. Immunol.* .
131. Van der Heijden, P. J., and W. Stok. 1987. Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. *J. Immunol. Methods* 103: 161–167.
132. Kawamoto, T. 2003. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch. Histol. Cytol.* 66: 123–143.
133. Lee, J. J., M. P. McGarry, S. C. Farmer, K. L. Denzler, K. A. Larson, P. E. Carrigan, I. E. Brenneise, M. A. Horton, A. Haczku, E. W. Gelfand, G. D. Leikauf, and N. A. Lee. 1997. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J. Exp. Med.* 185: 2143–2156.
134. Jacobsen, E. A., R. A. Helmers, J. J. Lee, and N. A. Lee. 2012. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* 120: 3882–3890.
135. Kita, H. 2011. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol. Rev.* 242: 161–177.
136. Huard, B., T. Mckee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zubler, J. P. Guyot, P. Schneider, and E. Roosnek. 2008. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* 118: 2887–2895.
137. Mohr, E., K. Serre, R. A. Manz, A. F. Cunningham, M. Khan, D. L. Hardie, R. Bird, and I. C. M. MacLennan. 2009. Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J. Immunol.* 182: 2113–2123.
138. Youngman, K. R., M. A. Franco, N. A. Kuklin, L. S. Rott, E. C. Butcher, and H. B. Greenberg. 2002. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J. Immunol.* 168: 2173–2181.
139. Lycke, N., and M. Bemark. 2010. Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins. *Mucosal Immunol.* 3: 556–566.
140. Slifka, M. K., and R. Ahmed. 1996. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol.* 4: 394–400.
141. Pierce, N. F. 1978. The Role of Antigen Form and Function in the Primary and Secondary intestinal Immune Responses to Cholera Toxin and Toxoid in Rats. *J. Exp. Med.* 195–206.

142. Pierce, N. F., and J. L. Gowans. 1975. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J. Exp. Med.* 142: 1550–1563.
143. Mestecky, J., M. W. Russell, and C. O. Elson. 2007. Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *J. Immunol.* 179: 5633–5638.
144. Fujihashi, K., T. Koga, and J. R. McGhee. 2000. Mucosal vaccination and immune responses in the elderly. *Vaccine* 18: 1675–1680.
145. Yamamoto, M., P. Rennert, J. R. McGhee, M. Kweon, S. Yamamoto, T. Dohi, S. Otake, H. Bluethmann, K. Fujihashi, and H. Kiyono. 2000. Alternate mucosal immune system: organized peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J. Immunol.* 164: 5184–5191.
146. Marinara, M., H. F. Staats, T. Hiroi, R. J. Jackson, M. Coste, P. N. Boyaka, N. Okahashi, M. Yamamoto, H. Kiyono, H. Bluethmann, K. Fujihashi, and J. R. McGhee. 1995. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.* 155: 4621–4629.
147. Pierre, P., O. Denis, H. Bazin, E. M. Mbella, and J.-P. Vaerman. 1992. Modulation of oral tolerance to ovalbumin by cholera toxin and its B subunit. *Eur. J. Immunol.* 22: 3179–3182.
148. Snel, J., M. H. Bakker, and P. J. Heidt. 1997. Quantification of antigen-specific immunoglobulin A after oral booster immunization with ovalbumin in mice mono-associated with segmented filamentous bacteria or *Clostridium innocuum*. *Immunol. Lett.* 58: 25–28.
149. Kato, H., K. Fujihashi, R. Kato, Y. Yuki, and J. R. McGhee. 2001. Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses. *J. Immunol.* 166: 3114–3121.
150. Moreau, M.-C., and V. Gaboriau-Routhiau. 1996. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res. Immunol.* 147: 49–59.
151. De Faria, A. M. C., S. M. Ficker, E. Speziali, J. da S. Menezes, B. Stransky, V. S. Rodrigues, and N. M. Vaz. 1998. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech. Ageing Dev.* 102: 67–80.
152. Hadis, U., B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, and O. Pabst. 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34: 237–246.
153. Faria, A. M. C., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 206: 232–259.
154. Elson, C., and W. Ealding. 1984. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J. Immunol.* 133: 2892–2897.
155. Salic, A., and T. J. Mitchison. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 2415–2420.
156. Jecker, P., A. Beuleke, I. Dressendorfer, R. Pabst, and J. Westermann. 1997. Long-term oral application of 5-bromo-2-deoxyuridine does not reliably label proliferating immune cells in the LEW rat. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 393–401.

157. Rocha, B., C. Penit, C. Baron, F. Vasseur, N. Dautigny, and A. A. Freitas. 1990. Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs: minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 20: 1697–1708.
158. Svennerholm, A., S. Lange, and J. Holmgren. 1978. Correlation between intestinal synthesis of specific immunoglobulin A and protection against experimental cholera in mice. *Infect. Immun.* 21: 1–6.
159. Medina, F., C. Segundo, I. Salcedo, A. García-Poley, and J. a Brieva. 2004. Purification of human lamina propria plasma cells by an immunomagnetic selection method. *J. Immunol. Methods* 285: 129–135.
160. Calame, K. L., K.-I. Lin, and C. Tunyaplin. 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 205–230.
161. Kallies, A., J. Hasbold, D. M. Tarlinton, W. Dietrich, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt. 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* 200: 967–977.
162. Kallies, A., E. D. Hawkins, G. T. Belz, D. Metcalf, M. Hommel, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt. 2006. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 7: 466–474.
163. Martins, G., and K. Calame. 2008. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 133–169.
164. Lycke, N. 1986. A sensitive method for the detection of specific antibody production in different isotypes from single lamina propria plasma cells. *Scand. J. Immunol.* 24: 393–403.
165. Chervenick, P. A., D. R. Boggs, J. C. Marsh, G. E. Gartwright, and M. M. Wintrobe. 1968. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normale mice. *Am. J. Physiol.* 215: 253–360.
166. Benner, R., A. van Oudenaren, and G. Koch. 1981. Induction of antibody formation In mouse bone marrow. In *Immunological Methods, Vol. II* vol. 2. 247–261.
167. Trepel, F. 1974. Number and distribution of lymphocytes in man . A critical analysis. *Klin. Wochenschr.* 52: 511–515.
168. Ganusov, V. V, and R. J. De Boer. 2007. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* 28: 514–518.
169. Terstappen, L. W., S. Johnsen, I. M. Segers-Nolten, and M. R. Loken. 1990. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76: 1739–1747.
170. Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430–435.
171. Cebra, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 Supl.: 1046–1051.

172. Macpherson, A. J., and N. L. Harris. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 478–485.
173. Cebra, J. J., S. B. Periwai, G. Lee, F. Lee, and K. E. Shroff. 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev. Immunol.* 6: 13–18.
174. Talham, G. L., H.-Q. Jiang, N. A. Bos, and J. J. Cebra. 1999. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect. Immun.* 67: 1992–2000.
175. Klaasen, H. L., P. J. Van der Heijden, W. Stok, F. G. Poelma, J. P. Koopman, M. E. Van den Brink, M. H. Bakker, W. M. Eling, and A. C. Beynen. 1993. Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infect. Immun.* 61: 303–306.
176. Van der Heijden, P. J., A. T. J. Bianchi, W. Stok, and B. A. Bokhout. 1988. Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine as a function of age. *Immunology* 65: 243–248.
177. Van der Heijden, P. J., A. T. J. Bianchi, P. J. Heidt, W. Stok, and B. A. Bokhout. 1989. Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine before and after weaning. *J. Reprod. Immunol.* 15: 217–227.
178. Brandtzaeg, P. 1997. Review article: Homing of mucosal immune cells - a possible connection between intestinal and articular inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11: 24–39.
179. Lamm, M. E. 1997. Interaction of Antigens and Antibodies at Mucosal Surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 311–340.
180. Kiyono, H., M. Kweon, T. Hiroi, and I. Takahashi. 2001. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol. Scand.* 59: 145–153.
181. Haaijman, J. J., H. R. E. Schuit, and W. Hijmans. 1977. Immunoglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its life-span. *Immunology* 32: 427–434.
182. Wols, H. A. M. 2005. Plasma Cells. *Encyclopedia of Life Science* 1–8.
183. Winter, O. 2010. Megakaryozyten bilden eine funktionelle Komponente der Plasmazellnische im Knochenmark. Dissertation, Technische Universität Berlin.
184. Ganusov, V. V., and R. J. De Boer. 2008. Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut: response to Pabst et al. *Trends Immunol.* 29: 209–210.
185. Bowman, E. P., N. A. Kuklin, K. R. Youngman, N. H. Lazarus, E. J. Kunkel, J. Pan, H. B. Greenberg, and E. C. Butcher. 2002. The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J. Exp. Med.* 195: 269–275.
186. Sundström, P., S. B. Lundin, L.-A. Nilsson, and M. Quiding-Järbrink. 2008. Human IgA-secreting cells induced by intestinal, but not systemic, immunization respond to CCL25 (TECK) and CCL28 (MEC). *Eur. J. Immunol.* 38: 3327–3338.

187. Nakayama, T., K. Hieshima, D. Izawa, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and O. Yoshie. 2003. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J. Immunol.* 170: 1136–1140.
188. Johansen, F.-E., E. S. Baekkevold, H. S. Carlsen, I. N. Farstad, D. Soler, and P. Brandtzaeg. 2005. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood* 106: 593–600.
189. Kunkel, E. J., and E. C. Butcher. 2003. Plasma-Cell Homing. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 822–829.
190. Hamann, A., D. P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Hoizmann, and E. C. Butcher. 1994. Role of  $\alpha 4$ -integrins in lymphocyte homing to mucosal tissue in vivo. *J. Immunol.* 152: 3282–3292.
191. Winkelmann, R., L. Sandrock, M. Porstner, E. Roth, M. Mathews, E. Hobeika, M. Reth, M. L. Kahn, W. Schuh, and H.-M. Jäck. 2011. B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Krüppel-like factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 710–715.
192. Lycke, N., and J. Holmgren. 1987. Long-term cholera antitoxin memory in the gut can be triggered to antibody formation associated with protection within hours of an oral challenge immunization. *Scand. J. Immunol.* 25: 407–412.
193. Shaw, R. D., A. A. Merchant, W. S. Groene, and E. H. Cheng. 1993. Persistence of Intestinal Antibody Response to Heterologous Rotavirus Infection in a Murine Model beyond 1 Year. *J. Clin. Microbiol.* 31: 188–191.
194. Benedetti, R., E. Massouh, and J. Fló. 1995. The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. *Immunol. Lett.* 48: 109–115.
195. Lewis, D. J., P. Novotny, G. Dougan, and G. E. Griffin. 1991. The early cellular and humoral immune response to primary and booster oral immunization with cholera toxin B subunit. *Eur. J. Immunol.* 21: 2087–2094.
196. Benedetti, R., P. Lev, E. Massouh, and J. Fló. 1998. Long-term antibodies after an oral immunization with cholera toxin are synthesized in the bone marrow and may play a role in the regulation of memory B-cell maintenance at systemic and mucosal sites. *Res. Immunol.* 149: 107–118.
197. Szakal, A. K., M. H. Kosco, and J. G. Tew. 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: Structure Function Relationships. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 91–109.
198. Lycke, N., L. Lindholm, and J. Holmgren. 1985. Cholera antibody production in vitro by peripheral blood lymphocytes following oral immunization of humans and mice. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 39–47.
199. Jackson, R. J., K. Fujihashi, J. Xu-Amano, H. Kiyono, C. O. Elson, and J. R. McGhee. 1993. Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect. Immun.* 61: 4272–4279.

200. Czerkinsky, C., and J. Holmgren. 2009. Enteric vaccines for the developing world: a challenge for mucosal immunology. *Mucosal Immunol.* 2: 284–287.
201. McMillan, R., R. L. Longmire, R. Yelenosky, J. E. Lang, V. Heath, and C. G. Craddock. 1972. Immunoglobulin Synthesis by Human Lymphoid Tissues: Normal Bone Marrow as a Major Site of IgG Production. *J. Immunol.* 109: 1386–1394.
202. Haaijman, J. J., P. van den Berg, and J. Brinkhof. 1977. Immunoglobulin class and subclass levels in the serum of CBA mice throughout life. *Immunology* 32: 923–927.
203. Hahn, A., N. Thiessen, R. Pabst, M. Buettner, and U. Bode. 2010. Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology* 129: 427–36.
204. Vaerman, J.-P., C. André, H. Bazin, and J. F. Heremans. 1973. Mesenteric lymph as a major source of serum IgA in guinea pigs and rats. *Eur. J. Immunol.* 3: 580–584.
205. Lamm, M. E., and J. M. Phillips-quagliata. 2002. Origin and homing of intestinal IgA antibody-secreting cells. *J. Exp. Med.* 195: 8–11.
206. Antia, R., S. Pilyugin, and R. Ahmed. 1998. Models of immune memory: On the role of cross-reactive stimulation, competition, and homeostasis in maintaining immune memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14926–14931.
207. Fritz, J. H., O. L. Rojas, N. Simard, D. D. McCarthy, S. Hapfelmeier, S. Rubino, S. J. Robertson, M. Larijani, J. Gosselin, I. I. Ivanov, A. Martin, R. Casellas, D. J. Philpott, S. E. Girardin, K. D. McCoy, A. J. Macpherson, C. J. Paige, and J. L. Gommerman. 2012. Acquisition of a multifunctional IgA<sup>+</sup> plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481: 199–203.
208. Pavot, V., N. Rochereau, C. Genin, B. Verrier, and S. Paul. 2012. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30: 142–154.
209. Powell, N., M. M. Walker, and N. J. Talley. 2010. Gastrointestinal eosinophils in health, disease and functional disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 146–156.
210. Rothenberg, M. E., A. Mishra, E. B. Brandt, and S. P. Hogan. 2001. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol. Rev.* 179: 139–155.
211. Rothenberg, M. E., and S. P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 147–174.
212. Vadas, M. A. 1982. Genetic control of eosinophilia in mice: gene(s) expressed in bone marrow-derived cells control high responsiveness. *J. Immunol.* 128: 691–695.
213. Spry, C. J. F. 1985. New properties and roles for eosinophils in disease: discussion paper. *J. R. Soc. Med.* 78: 844–848.
214. Ohnmacht, C., A. Pullner, N. Van Rooijen, and D. Voehringer. 2007. Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J. Immunol.* 179: 4766–4774.
215. Hooper, L. V, and A. J. Macpherson. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 159–169.

216. Kamath, A. T., S. Henri, F. Battye, D. F. Tough, and K. Shortman. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100: 1734–1741.
217. Lycke, N., and J. Holmgren. 1986. Intestinal Mucosal Memory and Presence of Memory Cells in Lamina Propria and Peyer' s Patches in Mice 2 Years after Oral Immunization with Cholera Toxin. *Scand. J. Immunol.* 23: 611–616.
218. Pierce, N. F. 1984. Induction of optimal mucosal antibody responses: effects of age , immunization route(s), and dosing schedule in rats. *Infect. Immun.* 43: 341–346.
219. Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, J. M. Casasnovas, A. Aiuti, and T. A. Springer. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184: 1101–1109.
220. Chu, V. T., and C. Berek. 2013. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunological reviews* 251: 177–188.
221. Winter, O., C. Dame, F. Jundt, and F. Hiepe. 2012. Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy. *J. Immunol.* 189: 5105–5111.

## 9 Anhang

### I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die orale Immunisierung mit Cholera-toxin induziert persistierende CT-spezifische Plasmazellen. ....	38
Abb. 2: Bindung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern an den Immunglobulinen der Plasmazellen. ....	39
Abb. 3: Durchflusszytometrische Identifikation und Isotypbestimmung der intestinalen Plasmazellen. ....	40
Abb. 4: Anzahl der CD45.2+ Lymphozyten und der kappa i.c.+ Plasmazellen der Lamina propria und des Knochenmarks nach der oralen Immunisierung. ....	42
Abb. 5: Analyse der Isotyp-Expression der Plasmazellen von Lamina propria und Knochenmark. ....	44
Abb. 6: Markierung von OVA-spezifischen Plasmazellen mittels Fluorochrom-gekoppelten OVA. ....	45
Abb. 7: Detektion von OVA-spezifischen Plasmazellen der Lamina propria mittels Durchflusszytometrie. ....	47
Abb. 8: Absolute Anzahl der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark nach der oralen Immunisierung. ....	48
Abb. 9: Analyse der Isotyp-Expression der OVA+ Plasmazellen aus Lamina propria und Knochenmark. ....	49
Abb. 10: Anzahl der CT- und OVA-spezifischen ASC der Lamina propria und des Knochenmarks neun Monate nach der oralen Immunisierung. ....	51
Abb. 11: Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern im Blutserum mittels ELISA. ....	52
Abb. 12: OVA-spezifische Plasmazellen in Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten und Milz. ....	53
Abb. 13: Detektion und Analyse der OVA-spezifischen Plasmazellen der Milz nach oraler Immunisierung. ....	54
Abb. 14: Histologischer Nachweis proliferierender Zellen durch den Einbau von EdU in die DNA. ....	55
Abb. 15: Intestinal induzierte Plasmazellen können mit EdU effizient markiert werden. ....	56
Abb. 16: Histologische Detektion der OVA-spezifischen Plasmazellen in der Lamina propria. ....	57
Abb. 17: Histologische Detektion der OVA-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark. ....	58
Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens mittels EdU-Einbau von ASC. ....	59
Abb. 19: Frequenz der EdU+ ASC innerhalb der Plasmazellkompartimente von Darm und Knochenmark. ....	60
Abb. 20: Mukosal induzierte EdU+ OVA-spezifische ASC können ohne Zellteilung persistieren. ....	62

Abb. 21: Analyse der Isotypexpression der langlebigen Plasmazellen des Knochenmarks.....	63
Abb. 22: Analyse der langlebigen Plasmazellen der Milz auf ihre Isotypexpression.....	64
Abb. 23: Histologische Untersuchung der langlebigen Plasmazellen in der Lamina propria.....	65
Abb. 24: Histologische Detektion mukosal induzierter langlebiger Plasmazellen im Knochenmark.....	66
Abb. 25: Histologische Detektion langlebiger Plasmazellen und der eosinophilen Granulozyten im Darm. ....	67
Abb. 26: Die Mehrheit der Plasmazellen im Darm ko-lokalisiert nicht mit MBP+ eosinophilen Granulozyten.....	68
Abb. 27: Die Detektion von APRIL im intestinalen Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	69
Abb. 28: Langlebige Zellen innerhalb der Peyer`schen Plaques 72 Tage nach der oralen Immunisierung.....	70
Abb. 29. Migration oral induzierter Plasmazellen in die Lamina propria und das Knochenmark.....	94

## II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lizenzierte orale Impfstoffe der Humanmedizin (Stand: Feb. 2013 PEI, Deutschland).....	18
Tab. 2: Orale Impfstoffe der Veterinärmedizin .....	19
Tab. 3: Medien und Puffer .....	22
Tab. 4: Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tab. 5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	23
Tab. 6: Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz	24
Tab. 7: Antikörper für ELISpot und ELISA .....	25
Tab. 8: Geräte .....	25
Tab. 9: FACS Canto II: Filterkonfigurationen und verwendete Fluorochrome .....	29

**III. Abkürzungsverzeichnis**

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
ASC	<i>Antikörper-sezernierende Zellen</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BALT	<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
Blimp-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BrdU	<i>Bromodeoxyridin</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMC	<i>Carboxymethylcellulose</i>
CT	<i>Choleratoxin</i>
DAPI	<i>4',6-Diamin-2-Phenylindol</i>
EdU	<i>Ethynyldeoxyuridin</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbend Assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immuno-Spot</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FOXP3+ T <sub>Reg</sub>	<i>forkhead box P3 regulatorische T-Zellen</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GIP	<i>IgA-inducing protein</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
i.c.	<i>intracellular</i>
IEL	<i>intraepitheliale Lymphozyten</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILF	<i>isolated lymphoid follicle</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
LFA-1	<i>leukocyte function-associated antigen-1</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal adressin cell adhesion molecule-1</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAMPs	<i>microbial-associated molecular patterns</i>
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
MEC	<i>mucosae-associated chemokine</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NALT	<i>nasopharynx-associated lymphoid tissue</i>
NK-Zellen	<i>natürliche Killerzellen</i>
NP	<i>4-Hydroxy-3-Nitrophenylsäure</i>
O.D.	<i>optische Dichte</i>
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Pax-5	<i>Paired box protein 5</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pIgR	<i>polymeric Ig receptor</i>
PMT	<i>Photomultiplier</i>
RA	<i>retinoic acid</i>
s.f.	<i>surface</i>
SA-AP	<i>Streptavidin-Alkalische Phospatase</i>

---

SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
slgA	<i>sezerniertes Immunglobulin A</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TAC1	<i>transmembrane activator and calcium- modulator and cyclophylin ligand interactor</i>
TALT	<i>tear-duct-associated lymphoid tissue</i>
TD	<i>thymus-dependent</i>
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1, transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>
T <sub>H</sub>	<i>T-Helfer-Zellen</i>
TI	<i>thymus-independent</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopietin</i>
VCAM-1	<i>vascular cell-adhesion molecule-1</i>
VIP	<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>

#### IV. Publikationen und Kongressbeiträge

**Posterpräsentation:** „Lifetime of antibody secreting cells in the murine GALT“

*2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology (ECI 2009)*

*13.-16.09.2009, Berlin, Deutschland*

**Posterpräsentation:** „Lifetime of antibody secreting cells in the murine GALT“

*4. Doktorandensymposium des FB Veterinärmedizin der FU Berlin*

*06.11.2009, Berlin, Deutschland*

**Posterpräsentation:** „Lifetime and migration of antibody secreting cells in the murine gut associated lymphoid tissue“

*6<sup>th</sup> Spring School on Immunology*

*21.-26.02.2010, Ettal, Deutschland*

**Vortrag:** „Überlebenszeit und Migration von Antigen-spezifischen Plasmazellen in der Darmmukosa“

*5. Doktorandensymposium des FB Veterinärmedizin der FU Berlin*

*02.07.2010, Berlin, Deutschland*

**Posterpräsentation:** „ Migration and lifetime and of antibody secreting cells in the murine GALT“

*9<sup>th</sup> B Cell Forum*

*31.03.-02.04.2011, Bad Sooden-Allendorf, Deutschland*

**Teilnahme und Präsentation der Ergebnisse durch Anja E. Hauser:**

„ Lifetime of antibody secreting cells generated in mucosal immune responses“

*Joint Annual Meeting*

*28.09.-01.10.2011, Riccione, Italien*

**A. Lemke, M. Kraft, K. Roth, A. E. Hauser:** „Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool“

*Manuskript in Vorbereitung*

## V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützten.

Prof. Dr. vet. med. Anja Hauser danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung sowie Betreuung dieses Projekts - insbesondere für die zahlreichen Diskussionen und anregenden Ideen.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. rer. nat. Michael Veit und Prof. Dr. Susanne Hartmann für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am DRFZ anfertigen zu können.

Ich möchte den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die angenehm freundschaftliche, hilfsbereite und humorvolle Atmosphäre danken. Ganz besonders Jannike und Magda gilt mein Dank für das geduldige Lesen dieser Arbeit und für die hilfreichen Tipps und Ideen. Auch Sabrina möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Marion, Karin und René. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen, gaben stets ein ehrliches und wertvolles Feedback und haben keinen Moment an mir gezweifelt.

Weiterhin danke ich zahlreichen Mitarbeitern des DRFZ für ihre Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere, wenn einmal ein Gerät nachts streikte. Darüber hinaus möchte ich mich für das Engagement der Admins, Labmanager und Tierpfleger bedanken.

Zusätzlich möchte ich an die Mäuslein gedenken, ohne die diese wissenschaftlichen Ergebnisse nicht hätten gewonnen werden können.

Meinen Eltern möchte ich großen Dank aussprechen für ihre umfangreiche Unterstützung.

Netti, Gesa und Mumpsi – ihr habt immer an mich geglaubt. Ich bin glücklich über unsere unerschütterliche Freundschaft, in der von Fröhlichkeit, Bedenken bishin zu Verzweiflung bedingungslos alles geteilt werden kann.

Mein größter Dank gilt meiner Tochter Luca und meinem lieben Sascha.

Ohne euren Zuspruch, euer Verständnis, eure Motivation und eure Liebe wäre diese Arbeit niemals entstanden. Ich danke euch von ganzem Herzen!

## **VI. Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, der 28.03.2013

Anja Lemke