Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Der Beitrag von polyklonaler-/bystander-Aktivierung zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Julia Charlotte Unseld
aus Ludwigsburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Dörner

2. PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Manz

3. Prof. Dr. rer. nat. Lars Nitschke

Datum der Promotion: 7.Dezember 2007

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 4

2 Einleitung 7

2.1 Angeborene und adaptive Immunität 8

2.2 Lymphozyten und lymphatische Organe 10

2.2.1 B- und T- Lymphozyten 10

2.2.2 Grundstruktur lymphatischer Organe 11

2.3 Die humorale Immunantwort 12

2.3.1 Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen 13

2.3.2 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen 15

2.3.3 Struktur und Funktion von Antikörpern 17

2.4 Das immunologische Gedächtnis 20

2.4.1 Gedächtnis-B-Zellen und sekundäre Antikörperantworten 20

2.4.2 Langzeit-Antikörpertiter 22

2.4.3 Gedächtnisantikörper nach unterschiedlichen Immunantworten 23

2.4.4 Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters 24

3 Zielsetzung 30

4 Material und Methoden 31

4.1 Material 31

4.1.1 Medien, Puffer und Reagenzien 31

4.1.2 Übersicht über die verwendeten Färbereagenzien und Antikörper 32

4.1.3 Kommerziell erworbene Assays („Kits“) 34

4.1.4 Besondere Verbrauchsmaterialien 34

4.1.5 Geräte und Software 34

4.2 Mäuse und Immunisierungen 35

4.2.1 Mäuse 35

4.2.2 Übersicht über die zu Immunisierungen verwendeten Proteine, Oligonucleotide und Adjuvantien 35

4.2.3 Immunisierungen 36

4.2.4 DNA-Markierung proliferierender Zellen mittels BrdU 37

4.2.5 Gewinnung der Seren 37

4.3 Zellisolierung und Zellquantifizierung 38

4.3.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension 38

4.3.2 Zellquantifizierung mittels CASY®-Technology 38

4.4 Durchflusszytometrische Messungen 39

4.4.1 Prinzip des Durchflusszytometers ... 39
4.4.2 Probenmessung und Datenauswertung ... 41
4.4.3 Markierung der Zellen mit Antikörpern ... 42

4.5 Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISPOT-Assay ... 43
4.5.1 Prinzip des ELISPOT Assays ... 43
4.5.2 Vorgehensweise beim ELISPOT ... 45

4.6 Quantifizierung von Immunglobulinen in Serum mittels ELISA ... 46
4.6.1 Prinzip und Durchführung des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ... 46

4.7 Zelltransfer-Experimente ... 46
4.7.1 Magnetische Zellsortierung (MACS) ... 47

4.8 Graphische Darstellung und Statistik ... 47

5 Ergebnisse ... 48

5.1 Immunantwort gegen das Antigen Ovalbumin ... 48
5.1.1 Mononukleäre Zellen in Milz und Knochenmark nach mehrmaliger Ovalbumin-Immunisierung ... 48
5.1.2 Kinetik der Anzahl Ovalbumin-spezifischer Antigen-sezernierender Zellen (ASC) in Milz und Knochenmark 49
5.1.3 Kinetik von ASC nach wiederholter Ovalbumin-Immunisierung ... 51
5.1.4 Anstieg der spezifisch gegen Ovalbumin gerichteten Antikörper im Serum im Verlauf mehrmaliger Ovalbumin-Immunisierung ... 52

5.2 Polyklonale-/bystander-Aktivierung durch Ovalbumin-Immunisierung ... 54
5.2.1 Identifizierung von Plasmablasten/Plasmazellen in der Milz ... 54
5.2.2 Identifizierung von Plasmablasten/Plasmazellen im Knochenmark ... 57
5.2.3 Einfluss einer Ovalbumin-Immunisierung auf Plasmazellen in der Milz ... 59
5.2.4 Anzahl *nicht* Ovalbumin-spezifischer ASC nach Ovalbumin-Immunisierung in Milz und Knochenmark ... 61
5.2.5 Weiterführende Analyse der Ovalbumin-negativen ASC in der Milz nach Ovalbumin-Immunisierung ... 63

5.3 Einfluss einer NP/CpG-Immunisierung auf Ovalbumin-spezifische B-Zellen ... 68
5.3.1 Änderung der Anzahl von Ovalbumin-spezifischen ASC durch polyklonale-/bystander-Aktivierung ... 69
5.3.2 Titerverlauf der gegen Ovalbumin gerichteten Antikörper nach NP/CpG-Immunisierung ... 70
5.3.3 Identifizierung von Ovalbumin-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen in der Milz ... 71
5.3.4 Ovalbumin-spezifische Gedächtnis-B-Zellen nach NP/CpG-Immunisierung ... 72
5.3.5 Reaktion naiver B-Zellen auf polyklonale-/bystander-Stimuli ... 73

5.4 Aktivierung transferierter Ovalbumin-Gedächtniszellen mit NP/CpG oder Ovalbumin 75

6 Diskussion ... 77

6.1 Diskussion der Methodik ... 78

6.2 Diskussion der Ergebnisse ... 81

7 Zusammenfassung ... 96

8 Literatur ... 98

9 Abkürzungsverzeichnis 105

10 Danksagung 106

11 Lebenslauf 107

12 Erklärung 108

2 Einleitung

In der Umwelt ist jeder Organismus einer Vielzahl infektiöser Pathogene –Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Parasiten- ausgesetzt. Bei gesunden Individuen dauern die meisten Infektionen, bzw. deren klinische Symptome jedoch nur kurze Zeit und hinterlassen keine bleibenden Schäden, weil das Immunsystem des Organismus mit seinen vielfältigen Schutzmechanismen die Ausbreitung der Erreger verhindert. Im Laufe der Evolution hat es sich zu einem komplexen System entwickelt, in dem man bei höheren Vertebraten die angeborene von der erworbenen Immunität unterscheiden kann. Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität, welche heute noch in Pflanzen zu finden ist, wurde vor ca. 450 Millionen Jahren durch das erworbene Immunsystem erweitert. Dieses erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei darauf folgenden Infektionen durch ein immunologisches Gedächtnis und bot damit einen Selektionsvorteil (1).

Dass es ein immunologisches Gedächtnis gibt, welches den Körper im Falle einer zweiten Infektion vor erneutem Ausbruch der Krankheit bewahrt, ist schon lange bekannt. Der griechische Geschichtsschreiber Thukydides berichtet in seinen Aufzeichnungen über die „Plage von Athen“ 430 v. Chr.: „*Dennoch fanden die Kranken und Sterbenden das meiste Mitgefühl bei denen, welche sich von der Krankheit selbst erholt hatten. Diese wussten aus Erfahrung wie es ist und hatten keine Angst um sich selbst; denn der gleiche Mann wurde nie ein zweites Mal befallen- jedenfalls nicht tödlich*.“(2).

Seit die Immunologie sich gegen Ende des 18. Jahrhunderts mit Edward Jenner als Vorreiter zu einer systematischen Wissenschaft entwickelt hat, konnten sehr viele Erkenntnisse über das immunologische Gedächtnis erlangt werden. So ist bekannt, dass sich dieses aus zellulären Bestandteilen, den B- und T-Gedächtniszellen, sowie aus den von B-Zellen sezernierten Antikörpern im Serum zusammensetzt. Die Mechanismen, die dazu beitragen, dass solche Antikörper auch noch sehr lange Zeit nach einer Infektion im Körper nachweisbar sind, und Ihren wichtigen Beitrag zum Schutz gegen ein Ausbreiten von Pathogenen leisten können, gehört zu einem der Phänomene des immunologischen Gedächtnisses, die die Wissenschaftler auch heute noch beschäftigen.

2.1 Angeborene und adaptive Immunität

Die Epithelschichten, die unseren Körper auf der gesamten Kontaktfläche zur Außenwelt begrenzen, stellen die erste Barriere für eindringende Mikroorganismen dar. Fettsäuren, Enzyme, ein niedriger pH-Wert, Zilienbewegungen und die normale Mikroorganismenflora schützen vor den meisten potentiellen Krankheitserregern. Erst wenn diese Epithelbarriere überwunden wird, werden die Mechanismen der angeborenen Immunität in Anspruch genommen. Dazu gehören in erster Linie Phagozyten, die Mikroorganismen aufnehmen und zerstören, von ihnen abgesonderte Zytokine und das Komplementsystem. Wichtiges Unterscheidungsmerkmal zur adaptiven Immunität ist, dass die phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten sehr einfache Erkennungsmechanismen benutzen, die im Gegensatz zu der hochspezifischen Antigenerkennung im adaptiven Immunsystem steht. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen so nicht jedes mögliche Antigen, sondern bestimmte, in der Evolution hoch konservierte Strukturen. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Wiederholungsmuster molekularer Strukturen wie Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, Peptidoglykane, Mannane, oder bakterielle DNA und doppelsträngige RNA.

Diese Rezeptoren im angeborenen Immunsystem sind keimbahnkodiert, das heißt, bei allen Zellen desselben Typs kommt ein bestimmter Satz an Rezeptoren vor. Darum kann dieser Teil des Immunsystems sofort auf das eingedrungene Pathogen reagieren, ohne den zeitverzögernden Prozess der klonalen Expansion des adaptiven Immunsystems abzuwarten. So werden die Mikroorganismen innerhalb von Minuten phagozytiert, mit Hilfe des Komplementsystems lysiert oder sterben durch den programmierten Zelltod nach Kontakt mit natürlichen Killerzellen. Durch sezernierte Zytokine wird im Gewebe eine Entzündung hervorgerufen, welche den Blutfluss fördert, es werden zusätzliche Leukozyten in das betroffene Gebiet rekrutiert und durch lokale Blutgerinnung die weitere Ausbreitung verhindert.

Unterschiedliche Komponenten des angeborenen Immunsystems stellen dabei eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem her, indem sie die Reaktionen des adaptiven Immunsystems, die in den folgenden 4-6 Tagen beginnt, vorbereiten und unterstützen (3). Dazu gehören unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLR), eine Gruppe der Mustererkennungs-Rezeptoren. Sie signalisieren die Anwesenheit von Pathogenen (sog. Danger-Signals) und induzieren durch eine intrazelluläre Signalkaskade unter anderem die Produktion von Zytokinen und die Expression kostimulatorischer Moleküle, welche für das Zustandekommen einer adaptiven Immunantwort

wichtig sind (4). Außerdem fördern sie die Reifung der dendritischen Zellen, die für die Antigenpräsentation an die Zellen der adaptiven Immunität verantwortlich sind (5).

Ebenfalls dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden können die so genannten „natürlichen Antikörper“. Diese sind hauptsächlich vom IgM-Subtyp und nicht Produkte aus einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort. Vielmehr kommen sie in normalen Konzentrationen auch im Serum von Mäusen vor, die in einer weitgehend sterilen Umgebung gehalten wurden. Da sie eine, wenn auch geringe, Affinität für zahlreiche Krankheitserreger besitzen und starke Kreuzreaktionen zeigen, sind sie möglicherweise wichtig für eine Bindung von Krankheitserregern noch bevor die Antikörper der adaptiven Immunität entstanden sind. Wahrscheinlich wird ein Großteil dieser IgM-Moleküle von B-1 Zellen sezerniert, Zellen, die als eine evolutionäre Vorgängerform der konventionellen B-2 Zellen angesehen werden können (6, 7), nach neueren Erkenntnissen aber auch für spezifische Immunantworten zum Schutz der Schleimhäute verantwortlich gemacht werden (8)..

Wenn das angeborene Immunsystem in den Körper eingedrungene Krankheitserreger nicht ausreichend eliminieren kann, so kommt es zur Aktivierung der erworbenen Immunität. Die entscheidende Rolle übernehmen hierbei die Lymphozyten, von denen jeder nur einen Rezeptortyp mit einer Spezifität für nur ein ganz bestimmtes Antigen trägt. Aus diesem Grund werden in einer Immunantwort niemals alle Lymphozyten aktiviert, sondern nur diejenigen, welche einen passenden Rezeptor für ein Antigen auf dem eingedrungenen Erreger tragen. Um trotzdem eine ausreichende Anzahl von Effektorzellen zu erreichen, führt die Aktivierung eines Lymphozyten zu dessen Proliferation und klonaler Expansion, so dass nach wenigen Tagen viele identische Kopien der aktivierten Zelle im Organismus vorhanden sind und somit einen optimalen, antigenspezifischen Schutz gewährleisten.

Durch die Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten entstehen jedoch nicht nur die momentan benötigten Effektorzellen, sondern auch langlebige Zellen, welche die zweite besondere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems tragen: Das immunologische Gedächtnis. Dieses ermöglicht dem Organismus bei einem zweiten Kontakt mit demselben Antigen einen schnelleren und effektiveren Schutz als beim Erstkontakt. Aufgrund der Lern- und Merkfähigkeit der Zellen des adaptiven Immunsystems wird der Körper so in vielen Fällen vor wiederkehrenden Erkrankungen bewahrt und macht den Schutz vor Krankheiten durch aktive Impfung möglich.

2.2 Lymphozyten und lymphatische Organe

2.2.1 B- und T- Lymphozyten

Innerhalb des adaptiven Immunsystems kann man zwei Systeme voneinander unterscheiden, die durch zwei unterschiedliche Lymphozytentypen repräsentiert werden, durch verzahnte Interaktionen jedoch gemeinsam zum Schutz des Individuums beitragen. T-Zellen, die Effektorzellen der so genannten zellvermittelten Immunität, verfügen über Rezeptoren, die Peptidfragmente intrazellulärer Krankheitserreger erkennen. Spezialisierte Moleküle, die MHC-I-Moleküle, transportieren Peptide von Virenbestandteilen, die im Zytosol der befallenen Zellen hergestellten wurden, an die Zelloberfläche, und präsentieren sie zytotoxischen T-Zellen. Genauso können zytotoxische T-Zellen auch entartete Zellen erkennen und abtöten. Bestandteile von phagozytierten Erregern werden mit MHC-II-Molekülen einer anderen Art von T-Zellen präsentiert: den T-Helfer-Zellen. Die Aktivierung dieser T-Helfer-Zellen ist wichtig für das zweite System der adaptiven Immunität, die so genannte humorale Immunität. Deren Effektorzellen, die B-Lymphozyten, tragen den B-Zell-Rezeptor (BCR) auf ihrer Oberfläche. Mit dessen Hilfe können sie Antigene außerhalb von Körperzellen erkennen, zu denen viele Bakterien zählen. Wird die B-Zelle wirkungsvoll aktiviert, kann sie zur Plasmazelle ausdifferenzieren, die ihre antigenspezifischen Antikörper in die Körperflüssigkeiten sezerniert.
Gemeinsamkeit der beiden Zellarten ist ihre Vorläuferzelle im Knochenmark, aus der sowohl B- als auch T-Zellen hervorgehen. Die weitere Entwicklung und Reifung geschieht jedoch in unterschiedlichen Organen aus denen die Bezeichnung der Zellen abgeleitet wurde. Während T-Zellen in den Thymus, einem lymphoepithelialen Organ im vorderen Mediastinum, wandern und dort zu immunkompetenten T-Zellen heranreifen, sind die Reifungsorte der B-Zellen das Knochenmark (englisch: Bone marrow), die Milz und die fötale Leber. Beide Zellarten verfügen über die Möglichkeit, im Laufe dieses Reifungsprozesses eine sehr große Anzahl an Rezeptorspezifitäten ausbilden zu können, und so zu garantieren, dass jedes in den Körper eindringende Antigen von einem Lymphozyten spezifisch erkannt und gebunden werden kann. Während ihrer Entwicklung durchlaufen die Zellen eine Umordnung in den Keimbahngenen, die für Antigenrezeptoren codieren. Dabei erfolgt eine zufällige Kombination von Gensegmenten als Grundlage für die Diversität der Antigenrezeptoren. Diese so genannte somatische Rekombination ermöglicht trotz des Vorhandenseins von nur einigen hundert Gensegmenten die Entstehung einer großen Vielzahl von Rezeptoren. Legt man die geschätzte Anzahl der

unterschiedlichen Gensegmente zugrunde und geht man davon aus, dass jede neue Anordnung dieser Gene auf der DNA erfolgreich ist, so beliefe sich die Zahl der Rearrangements und damit Antikörper-, bzw. BCR-Spezifitäten auf 48 Millionen (9) und im Falle der T-Zell-Rezeptoren auf 3 x 10^{20} unterschiedliche Varianten (10). Um bei dieser Vielzahl zu gewährleisten, dass keine Rezeptoren bzw. Antikörper entstehen, welche körpereigene, d.h. Selbst-Antigene, erkennen und Autoimmunreaktionen auslösen, wird jeder entstandene Lymphozyt einem strengen Selektionsprozess unterzogen. T-Zellen müssen zusätzlich noch die Fähigkeit zeigen, körpereigene MHC-Moleküle zu erkennen, ansonsten sterben auch sie den programmierten Zelltod (Apoptose). Diese Testung geschieht zunächst in den zentralen lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark. Nach Wanderung der Lymphozyten in die peripheren lymphatischen Organe können auch dort nur Lymphozyten überleben, welche nicht gegen körpereigene Zellen gerichtet sind, bzw. sie werden zunächst anergisch und sterben erst später.

Kommt es in der Peripherie zu einer Infektion, so nehmen phagozytierende Zellen große Mengen von Antigen auf und wandern damit in die sekundären Organe. Erkennt ein Lymphozyt dort ein passendes Antigen, wird er aktiviert, proliferiert und kann zu Effektorzellen differenzieren. Über efferente Lymphbahnen verlassen diese den Ort ihrer Aktivierung um am Infektionsherd das eingedrungene Pathogen zu bekämpfen.

2.2.2 Grundstruktur lymphatischer Organe

Die lymphatischen Organe liefern mit ihren unterschiedlichen Zellen und Signalen die entscheidenden Faktoren für das Überleben der Lymphozyten. Durch die Ansammlung antigenpräsentierender Zellen ist in sekundären lymphatischen Organen die Möglichkeit für Lymphozyten groß, auf ihr passendes Antigen und andere aktivierte Lymphozyten zu treffen um erfolgreich aktiviert zu werden. Als zentrale oder primäre lymphatische Organe werden das Knochenmark und der Thymus bezeichnet. Hier findet die Reifung und Ausbildung der Rezeptorspezifitäten statt.

Zu den peripheren lymphatischen Organen gehören die Milz, Lymphknoten, das Knochenmark, das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT), und weniger gut organisierte Ansammlungen von Lymphozyten wie das bronchienassoziierte Gewebe (BALT) oder das mucosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT) in anderen Schleimhäuten. Milz und Lymphknoten werden auch als systemische lymphatische Organe bezeichnet, die verantwortlich sind für die Antigene, die sich im Blut (Milz) bzw. in der gewebedrainierenden Lymphe

(Lymphknoten) befinden. Die mucosa-assoziierten Gewebe nehmen Antigene von den Oberflächenepithelien des Darms, der Lunge und des Rachenbereiches auf.

Sie alle zeigen ähnliche Organisationsstrukturen. Dazu gehören der Aufbau aus getrennten Bereichen für B- und T-Zellen, die Besiedlung mit anderen Leukozyten wie z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen sowie mit Stromazellen. In der Milz sind die meisten Lymphozyten in der weißen Pulpa lokalisiert, die Inseln innerhalb der roten Milzpulpa einnehmen. In die weiße Pulpa wird Blut aus den zentralen Arteriolen geleitet, die von der periarteriolären Scheide (PALS) umgeben sind, einem Bereich, in dem hauptsächlich T-Zellen zu finden sind. Die meisten B-Zellen liegen in so genannten Follikeln, die neben den PALS liegen. Aus diesen Follikeln bilden sich nach Antigenkontakt Keimzentren, Orte massiver Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. Um die PALS und B-Zellareale liegt der Randzonenbereich, in dem sich spezielle Makrophagen, Gedächtniszellen und eine besondere Art von B-Zellen befinden.

Ungeprägte Lymphozyten zirkulieren zwischen Blut, Gewebe und diesen Organen solange, bis sie auf ein passendes Antigen treffen und proliferieren, oder sie sterben. Der Eintritt in ein Follikel liefert für die naiven B-Zellen wahrscheinlich ein essentielles Überlebenssignal, so dass die Zellen, denen die Passage aufgrund begrenzter Kapazität verwehrt wird, nicht lange in der Peripherie überleben. Eine Ausnahme hiervon stellen die Randzonen-B-Zellen in der Milz dar, die nicht zirkulieren. Sie besitzen eingeschränkte Rezeptorspezifitäten und können ohne die Hilfe von T-Zellen schneller als die follikulären B-Zellen aktiviert werden (11).

2.3 Die humorale Immunantwort

Aus dem lateinischen Wort *humor* (Feuchtigkeit, Flüssigkeit) leitet sich der Begriff der humoralen Immunität ab, mit dem der Beitrag der B-Lymphozyten zur adaptiven Immunität umschrieben wird. Allein die Effektorzellen der B-Lymphozyten, die Plasmazellen, sind in der Lage, Antikörper zu produzieren, und diese in die Körperflüssigkeiten zu sezernieren. Dadurch ist die humorale Immunantwort verantwortlich für den Schutz der Extrazellularräume, in dem sich die meisten infektiösen Bakterien vermehren, und wo intrazellulär lebende Bakterien bei Ihrer Ausbreitung von Zelle zu Zelle angegriffen werden können. Davon abgesehen stellt eine effektive Aktivierung der B-Zellen die Voraussetzung für die weitere Immunantwort dar, die zum Beispiel auf deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation beruht.

2.3.1 Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen

Es gibt hauptsächlich zwei Arten, wie B-Lymphozyten aktiviert werden können. Die eine Form der Aktivierung beruht auf einer Antigenerkennung durch eine B-Zelle, die im Anschluss daran mit einer durch dasselbe Antigen aktivierten T-Zelle interagiert (sog. cognate Interaktion). Diesen Mechanismus nennt man T-Zell-abhängige Immunantwort. Er kommt zum Tragen bei Immunantworten auf Proteinantigene, in deren Verlauf sich Gedächtnis-B-Zellen bilden und langlebige Plasmazellen generiert werden. Polysaccharidantigene dagegen können B-Lymphozyten stimulieren, ohne dass diese in Kontakt mit aktivierten T-Lymphozyten treten müssen, weshalb diese Immunantworten T-Zell-unabhängig genannt werden. Außerdem muss man unterschiedliche B-Zelltypen- B1/B2 Zellen und Randzonen B-Zellen- unterscheiden, die sich sowohl in ihren Anforderungen an eine effiziente Aktivierung als auch in den entstehenden Effektorzellen unterscheiden.

Im Falle von Proteinantigenen (zu denen auch das in dieser Arbeit verwendete Ovalbumin gehört), welche eine T-Zell-abhängige Immunantwort auslösen, beginnt die Aktivierung einer B-Zelle mit der Bindung des Antigens an den spezifischen BCR der Zelloberfläche. Das Antigen wird in die Zelle eingeschleust, prozessiert, und einzelne Peptide daraus anschließend mit MHC-Klasse-II Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert (7, 12). Die so dargebotenen Moleküle können von T-Helferzellen erkannt werden, wenn diese vorher durch das gleiche Antigen aktiviert worden waren. Die Interaktion mit einer aktivierten T-Zelle stellt die Voraussetzung für die Aktivierung der B-Zelle dar, was als „Gekoppelte Erkennung“ bezeichnet wird. Diese Kopplung bedeutet aber nicht, dass beide Zellen identische Epitope auf dem Antigen erkennen müssen, sondern dass die jeweils erkannten Epitope Teil desselben Antigens sind.

Die Bindung einer aktivierten T-Zelle an den MHCII-Peptid-Komplex löst in der T-Zelle die Bildung von Zytokinen und Synthese von zellgebundenen Rezeptoren und Liganden aus. Dazu gehört auch der CD40-Ligand, dessen Bindung mit dem CD40-Molekül auf der B-Zelle zu deren Proliferation führt (13). Wird diese Interaktion durch blockierende Antikörper verhindert, kommt keine effiziente Immunantwort zustande und Keimzentren können nicht ausgebildet werden (14). Außerdem spielen die von der T-Zelle sezernierten IL-4, BLyS und APRIL eine Rolle, die vermutlich zusammen für die klonale Vermehrung und weitere Entwicklung der B-Zelle sorgen (11). Um sicherzustellen, dass nur die gebundene, antigenspezifische B-Zelle von den sezernierten Zytokinen beeinflusst wird, scheint die Kontaktstelle zwischen beiden Zellen nach

außen hin mittels Adhäsionsmolekülen abgedichtet zu werden. Die folgende Sekretion der Effektormoleküle bleibt nur auf diesen Raum beschränkt.

Auch auf der B-Zelle ist durch die Bindung von Antigen an den BCR die Expression von Oberflächenmolekülen induziert worden, welche als Korezeptoren für den BCR wirken und positive oder negative Signale ins Innere übermitteln können.

Wie oben dargestellt, sind die peripheren lymphatischen Organe Ort dieser Aktivierung. An der Grenze zwischen B- und T-Zellzone entsteht durch die klonale Vermehrung der Zellen der so genannte Primärfokus. Viele der entstandenen B-Zellen sterben den programmierten Zelltod, andere B-Zellen differenzieren zu extrafollikulären, kurzlebigen Plasmazellen und wandern in andere Bereiche der lymphatischen Organe oder zirkulieren und sezernieren Antikörper geringer Affinität (15). Wenige der B- und T-Zellen aus den Primärfoki wandern in die B-Zellzone des lymphatischen Gewebes, wo sie sich innerhalb der Primärfollikel weiter vermehren und schließlich so genannte Keimzentren ausbilden, aus denen nach wenigen Tagen langlebende Plasmazellen mit hochaffinen Antikörpern und Gedächtniszellen hervorgehen.

Als Keimzentren werden hoch organisierte Ansammlungen von B-Zellen, Helfer-T-Zellen und Follikulären dendritischen Zellen (FDC) bezeichnet. In diesen Regionen findet nach T-Zell-abhängiger Antigenaktivierung eine schnelle oligoklonale Expansion der spezifischen B-Zellen statt (7). Die ersten Zellstadien werden Zentroblasten genannt, die viele Hypermutationen in den Genen der variablen Antikörperregionen erfahren. Die Zellen differenzieren im Keimzentrum weiter zu Zentrozyten, die sich nicht mehr teilen. Diese Zentrozyten müssen streng selektioniert werden, da durch die Hypermutation nicht nur höher affine Rezeptoren, sondern auch Auto-Antikörper entstanden sind (16).

Bakterielle Polysaccharide und polymere Proteine zählen zu den Antigenen, welche ohne diese beschriebene T-Zell-Hilfe eine Differenzierung von B-Zellen auslösen können (Typ 1). LPS zum Beispiel aktiviert die Zellen via TLR-4, die sich daraufhin unabhängig von ihrer BCR-Spezifität polyklonal vermehren. Die daraus entstehenden Plasmazellen können schnell zur Bekämpfung extrazellulärer Bakterien beitragen, auch wenn ihre Antikörper nur geringe Affinität aufweisen und die Effektorzellen nicht lange leben. Eine andere Klasse von T-Zell-unabhängigen Antigenen (Typ 2) ist durch die vielfache Wiederholung von Epitopen charakterisiert (17). Diese Antigene aktivieren hauptsächlich reife B-Zellen der B-1- oder Marginal- Zellpopulation indem sie BCR quervernetzen (7, 8). Auch aus diesen Zellen entstehen Plasmazellen, welche wahrscheinlich größtenteils kurzlebig sind. Wie bei allen T-Zellunabhängigen Reaktionen

entstehen dabei keine Gedächtnis-B-Zellen. Ein Klassenwechsel von IgM zu anderen Isotypen ist bei T-Zell-unabhängigen Typ-2 Antigenen möglich, wenn die B-Zelle Kontakt zu T-Zell Zytokinen erhält.

2.3.2 Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen

Plasmazellen (Antigen-sezernierende Zelle, ASC) sind die ausdifferenzierten Endstadien der B-Zellentwicklung, deren herausragende Aufgabe es ist, eine große Menge von Antikörpern einer einzigen Spezifität zu sezernieren. Im Laufe Ihrer Entwicklung, die mit der Aktivierung einer B-Zelle beginnt, verändern sich der Phänotyp und die Morphologie der Zelle. Die morphologischen Merkmale der Plasmazellen sind alle durch Ihre Funktion als Antikörper-„Fabrik“ zu erklären. Sie besitzen sehr viel Zytoplasma, das fast vollständig von rauem endoplasmatischen Retikulum (RER) ausgefüllt ist. Das RER ist Ort der Proteinsynthese der Zelle, weswegen die Zisternen des RER einer Plasmazelle viele Immunglobuline enthalten (18). In der histologischen Färbung erscheint das Zytoplasma der Plasmazelle basophil, was durch die großen Mengen RNA entsteht, die im RER benötigt werden. Die Antikörper, von denen mehrere tausend pro Sekunde hergestellt und sezerniert werden (19, 20), können in der Zelle mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt werden.

Die Veränderungen auf molekularer Ebene betreffen unterschiedliche Oberflächenmoleküle. Dazu gehören die Abregulation von MHCII, B220, CD19, CD21 und CD22, sowie der Verlust fast aller Oberflächenimmunglobuline (11, 15). Weitere Moleküle werden exprimiert, die Plasmazellen von anderen B-Zellen unterscheiden: Syndecan-1 (CD138 in der Maus, CD38 im Mensch), ein Proteoglykan, welches extrazelluläre Matrix erkennt (21) gilt als Marker für Plasmazellen. Auch der Transkriptionsfaktor Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) gilt heute als Marker für Plasmazellen. Es hat sich herausgestellt, dass die Expression von BLIMP-1 entscheidend für die Differenzierung von B- zu Plasmazellen ist (22-24).

Im Rahmen dieser Aufzählung ist zu beachten, dass die Plasmazellen in ihrer Entwicklung zunächst ein Zwischenstadium durchlaufen, in dem sie als Plasmablasten bezeichnet werden. Als Plasmablast verlassen die B-Zellen die Keimzentren, sind als Vorläuferzellen noch teilungsfähig und exprimieren im Gegensatz zu Plasmazellen noch MHCII. Die Ausdifferenzierung ist im Stadium der Plasmazelle abgeschlossen, und die Zelle nicht mehr teilungsfähig. Beide Zelltypen sezernieren jedoch Antikörper. Darum wurde im Rahmen dieser Arbeit in den Fällen, in denen nicht, aufgund von Oberflächenmolekülen, zwischen Plasmablast und –Zelle unterschieden werden konnte, der Begriff „Antikörper sezernierende Zelle“ (ASC) gewählt.

Dass Plasmazellen kein MHCII mehr tragen, hat zur Folge, dass sie nicht mehr in der Lage sind, T-Helfer-Zellen Antigen zu präsentieren.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Plasmazellen ist ihre veränderte Sensibilität gegenüber unterschiedlichen Chemokinen. Diese Änderungen vermitteln die Wanderung der Plasmazellen vom Ort ihrer Entstehung in andere Gebiete. In der Milz ist das die rote Milzpulpa, in den Lymphknoten die Markstränge (25) und im Knochen verteilt im Mark. Außerdem können Plasmazellen in großer Anzahl in entzündete Gebiete migrieren (26). Plasmazellen, die aus Immunantworten der Schleimhäute entstanden sind, kehren nach einer Zirkulation durchs Blut meist wieder an ihren Entstehungsort in der Schleimhaut zurück (27) Die Plasmazellen in der Milz und den Lymphknoten leben wahrscheinlich größtenteils nur wenige Tage. Nur ein geringer Anteil überlebt auch in diesen Organen sehr viel länger (28), wenn die räumliche Kapazität des Gewebes ausreicht um das Überleben zu fördern. Zu den kurzlebigen Plasmazellen gehören wahrscheinlich die extrafollikulär entstandenen Plasmazellen aus Primärantworten, aber auch Plasmazellen aus T-Zell unabhängigen Immunreaktionen, Abkömmlinge von B-1 Zellen und Randzonen B-Zellen (29). Im Gegensatz dazu stellt das Knochenmark einen Ort dar, zu dem Plasmazellen vor allem nach sekundären Immunantworten migrieren und lange überleben können (30, 31). Aus diesem Grund kann nach einer sekundären Immunisierung nach den ersten Tagen des Anstiegs ein rapider Abfall von Plasmazellen in Milz und Lymphknoten beobachtet werden, während im Knochenmark die Plasmazellen gleichzeitig kumulieren (32).

Jahrzehntelang galt im Bereich der immunologischen Forschung das Dogma, dass Plasmazellen kurzlebig sind, d.h. nach einer Lebensspanne von wenigen Tagen den programmierten Zelltod, die Apoptose sterben (33-35). Aufgrund von Proliferationsstudien mit radioaktivem Thymidin trafen Ho et al. die Aussage, dass die Lebensdauer von Plasmazellen vom Ort ihres Aufenthaltes abhängt (36). Sie schätzten das Überleben der Zellen in Milz und Lymphknoten auf 3 Tage, im Knochenmark ermittelten sie eine Lebensdauer von 3 Wochen. In den letzten Jahren konnte aber deutlich gezeigt werden, dass Plasmazellen im Knochenmark aus sekundären Immunantworten sehr viel länger leben. In BrdU-Inkorporationsstudien waren Plasmazellen im Knochenmark noch 90 Tage nach einer Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin nachweisbar, ohne Zellzyklen durchlaufen zu haben (37). Nach Infektion mit dem lymphocytic choriomeningitis Virus (LCMV) konnte Slifka et al. noch 1,5 Jahre nach Infektion mit nachfolgender Bestrahlung zur Depletion der Gedächtniszellen virusspezifische Plasmazellen im Knochenmark zeigen (31). Durch Rekonstitution mit allotypischen Lymphozyten konnte hier ausgeschlossen werden, dass persistierende Viren neue B-Zellen zu Plasmazellen aktivierten. Sowohl Slifka als auch Manz

gelang es, virus- bzw. ovalbumin-spezifische Plasmazellen aus dem Knochenmark in naive Rezipienten zu transferieren, wo sie für viele Tage weiterlebten und antigenspezifische Antikörper sezernierten ohne Kontakt zum Antigen zu benötigen (30, 31).

Im Allgemeinen wird heute angenommen, dass das Überleben der Plasmazellen aus Sekundärantworten vor allem im Knochenmark aber auch der Milz nicht von deren intrinsischen Veranlagung abhängt, sondern von unterschiedlichen Signalen aus der unmittelbaren Umgebung der Plasmazelle in den Organen (38, 39). Die Ansammlung der nötigen Faktoren an einem Ort wird als „Überlebensnische“ für die Plasmazelle bezeichnet. Dazu gehören Zytokine wie IL-6, TNF-α (Tumornekrosefaktor-α), SDF-1 (Stromal derived factor-1) und BlyS (B lymphocyte Stimulator), aber auch Zell-Zellkontakte zwischen Plasmazellen und stromalen Zellen (40-43). Die weitere Identifikation der Signale und Faktoren, welche eine solche Nische ausmachen sind jedoch noch Gegenstand intensiver Forschung.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Frequenz von Plasmazellen im Knochenmark während der gesamten Lebenszeit konstant bleibt, wird vermutet, dass die Zahl dieser Nischen, welche Plasmazellen beherbergen, begrenzt ist. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Sze et al., der eine Höchstzahl von Plasmazellen je Flächeneinheit in der Milz fand (28).

Aus diesem Konzept der begrenzten Überlebensnischen von Plasmazellen entstand daraufhin der Gedanke des Wettbewerbs der Plasmazellen untereinander oder auch mit anderen Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen um einen Platz in einer Nische. Die in der Milz und anderen peripheren lymphatischen Organen gebildeten Plasmazellen wandern in das Knochenmark ein. Dort können sie nur überleben, wenn entweder freie Nischen verfügbar sind oder indem sie alte Plasmazellen verdrängen (44).

2.3.3 Struktur und Funktion von Antikörpern

Der islamische Arzt Rhazes ging im 10. Jahrhundert davon aus, dass eine Ansteckung mit Pocken das Blut des Kranken „reifen“ lässt, genauso wie aus Traubensaft durch Gärung Wein entsteht und der Kranke gesundet, wenn „überschüssige Feuchtigkeit aus dem Blut getrocknet ist“ (45, 46). Der deutsche Arzt und Wissenschaftler Behring und sein japanischer Kollege Kitasato entdeckten Ende des 19. Jahrhunderts, dass durch eine Infektion bestimmte Stoffe im Serum des Blutes auftauchen, die den Erreger effektiv bekämpfen können. Ehrlich und Behring stellten das erste hochkonzentrierte Serum zur passiven Immunisierung her, 1936 konnten Antikörper schließlich isoliert werden, und 1959 beschrieben Porter und Edelman die chemische Struktur des Antikörper-Moleküls.

Antikörper sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors, die von Plasmazellen in die Körperflüssigkeiten ausgeschüttet werden. Dort üben sie ihre Schutzfunktion durch Bindung von Toxinen und Pathogenen aus.

Sie sind alle aus zwei Paaren unterschiedlicher Polypeptidketten aufgebaut, den schweren Ketten mit 50kDa und den leichten Ketten mit 25kDa. Aus diesen Teilen bildet sich eine Form, die einem „Y“ ähnelt, in der die Ketten durch Disulfidbrücken lose miteinander verbunden sind.

Dieses „Y“ setzt sich strukturell aus zwei Regionen zusammen, von denen die eine spezifisch Antigen bindet, und die andere für verschiedene Effektormechanismen verantwortlich ist. Der antigenbindende Teil ist in einer großen Vielzahl unterschiedlicher Versionen vorhanden, so dass nahezu jede Struktur erkannt werden kann, weshalb dieser Teil variable Region genannt wird. Die variable Region befindet sich am oberen Ende der Arme des „Y“, und wird von leichter und schwerer Kette zusammen gebildet. Jeder Arm weist eine Bindungsstelle auf, so dass gleichzeitig zwei identische Strukturen gebunden werden können.

Der andere Teil (hauptsächlich der Fuß des „Y“) heißt konstante Region, der zu einem großen Teil von den gepaarten schweren Ketten gebildet wird. Da es fünf unterschiedliche Hauptformen der schweren Kette gibt, kann man fünf verschiedene Immunglobulinklassen voneinander unterscheiden, nämlich IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Jede dieser Hauptklassen hat andere Effektorfunktionen und regelt ihre Verteilung im Körper. In jeder primären Immunantwort werden zunächst Antikörper des IgM-Subtyps gebildet. Obwohl diese ersten Antikörper noch eine geringe Affinität aufweisen, ist die Gesamtbindungsstärke (Avidität) eines IgM-Antikörpers hoch, da er als Pentamer insgesamt 10 Antigenbindungsstellen besitzt. IgM kommt hauptsächlich im Blut vor. Erst nach einer Genumlagerung der Plasmazelle, ausgelöst durch T-Zell Zytokine, kommt es zum Klassenwechsel und damit zur Sekretion anderer Antikörperklassen. IgA ist der Isotyp der Schleimhäute und kommt in vielen Sekreten, z.B. im Darm, Atemtrakt, in der Tränenflüssigkeit und im Kolostrum vor. IgE kommt selten frei im Blut vor, sondern ist meist an Mastzellen gebunden, die sich in Bindegewebe von Haut und Gefäßen aufhalten. Der häufigste Isotyp in Serum und extrazellulären Flüssigkeiten mit einem Anteil von 85% ist IgG (41). Auch dem ungeborenen Kind werden durch die Plazenta nur Antikörper vom Typ IgG übertragen.

Die Wirkung der Antikörper beruht auf unterschiedlichen Mechanismen:

1. *Neutralisation*

   Die krankmachende Wirkung vieler Mikroben beruht auf deren Sekretion so genannter Toxine. Manchmal reicht schon ein einziges Molekül dieser Toxine aus, um schädliche Wirkungen auf Zellen auszuüben, indem diese an deren Oberfläche binden. Beispiele dafür

sind das Tetanustoxin von Clostridium tetani, das erythrogene Toxin des Scharlacherregers Streptococcus pyogenes oder Choleratoxin von Vibrio cholerae. Spezifische Antikörper können an diese Toxine binden und verdecken so deren Bindungsstellen für die Rezeptoren auf Körperzellen. Genauso können Antikörper auch Viren oder ganze Bakterien neutralisieren.

2. *Komplementaktivierung*

   Haben sich mehrere IgG- oder ein IgM-Moleküle auf die Oberfläche eines Bakteriums gebunden, ändert sich deren räumliche Struktur. So können sich Proteine des Komplementsystems anheften und eine Kaskade proteolytischer Spaltungen wird in Gang gesetzt. Am Ende dieses Prozesses steht die Aufnahme des Pathogens durch Phagozyten oder eine direkte Lyse durch einen membranangreifenden Komplex.

3. *Immunkomplexbildung*

   Viele kleine Antigene werden durch mehrere Antikörper zu Immunkomplexen verbunden, die wiederum Komplement aktivieren oder unter Bindung an Erythrozyten in Milz und Leber transportiert werden, wo sie abgebaut werden können.

4. *Opsonierung*

   Die Bindung von Antigen an einen Antikörper lässt den Fuß des „Y“ des Antikörpers frei. Dieser Teil der konstanten Region wird Fc-Fragment genannt. Viele Immunzellen, darunter Makrophagen, zytotoxische T-Zellen, Leukozyten und Mastzellen, besitzen Rezeptoren für diese Fc-Teile. Ein Antigen wird durch die Bindung von Antikörpern markiert, bzw. opsoniert (griech. *opsonein*: schmackhaft machen), so dass diese Zellen den Fc-Teil binden können und aktiviert werden. Daraufhin wird das Pathogen, je nach Zelltyp, phagozytiert, oder es werden Mediatoren freigesetzt die es schließlich zerstören. Auch dendritische Zellen besitzen Fc-Rezeptoren, über die sie Immunkomplexe in den peripheren lymphatischen Organen festhalten können um sie T-und B-Lymphozyten zu präsentieren.

Eine weitere Funktion von Antikörpern im Serum stellt die Regulation der Immunantwort dar. Vor allem IgM kann über Komplementaktivierung zu einer Verstärkung der Immunantwort beitragen, während IgG durch negatives Feedback die humorale Immunantwort auf ein spezifisches Antigen unterdrücken kann (47). Durch die Maskierung von Epitopen durch IgG und die Hemmung der B-Zell-Aktivierung durch den Fc-Rezeptor FcγRIIB wird der Körper vor einer überschießenden Antikörperproduktion bewahrt.

2.4 Das immunologische Gedächtnis

Eine der herausragendsten Eigenschaften des adaptiven Immunsystems ist die Fähigkeit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Das bedeutet, dass sich das Immunsystem lange Zeit, manchmal ein Leben lang, an ein Pathogen erinnern kann, mit dem es einmal Kontakt hatte. Für die Immunantwort bedeutet dies, dass es zwischen einem ersten (primären) Kontakt und jedem weiteren (sekundärem) Kontakt mit einem Antigen strukturelle Unterschiede gibt. Für den Organismus bedeutet es im günstigsten Fall, dass es bei einem zweiten Kontakt mit demselben Pathogen nicht mehr zu klinischen Krankheitssymptomen kommt, weil sein Immunsystem das Pathogen nun viel effizienter bekämpfen kann.

2.4.1 Gedächtnis-B-Zellen und sekundäre Antikörperantworten

Das immunologische Gedächtnis beruht zum einen auf speziellen T- und B- Gedächtniszellen und zum anderen auf dem Vorhandensein von zirkulierenden Antikörpern im Serum.

Diese B-Gedächtniszellen, die im Laufe des ersten Antigenkontaktes aus Keimzentren entstanden sind (16), unterscheiden sich sowohl qualitativ als auch quantitativ von naiven B-Zellen. Morphologisch erscheinen sie als kleine Zellen, die im Gegensatz zu naiven B-Zellen kein IgD auf der Oberfläche tragen, und nur selten IgM (7, 16, 48). Während beim ersten Kontakt nur sehr wenige Lymphozyten aufgrund ihres spezifischen BCR auf das Antigen reagieren können, stehen in den folgenden Immunantworten 10-100-mal mehr spezifische Gedächtnislymphozyten zur Verfügung. Ein Teil dieser B-Gedächtniszellen zirkuliert, wie naive Lymphozyten auch, kontinuierlich durch die sekundären lymphatischen Organe bis sie auf ihr passendes Antigen treffen, während andere Gedächtniszellen an einem Ort verbleiben, z.B. in den Randzonen der Milzfollikel. Nach der Bindung eines passenden Antigens kommt es wie bei naiven B-Zellen auch zur Aktivierung und Teilung der Zelle entweder in einem Keimzentrum oder außerhalb von Keimzentren (7, 49). Wahrscheinlich haben die Gedächtnis-B-Zellen eine niedrigere Schwelle für Reaktivierung als naive B-Zellen (16, 49). Bernasconi et al. wiesen in ihren Studien auf die Möglichkeit einer unspezifischen Aktivierung humaner Gedächtnis-B-Zellen durch CpG mittels dessen Rezeptor TLR9 hin (16, 50, 51).

Aufgrund der größeren Anzahl spezifischer Zellen können in einer Sekundärantwort wesentlich höhere Antikörpertiter erzeugt werden, die je nach System 8-10x höher als in der Primärantwort ausfallen (48, 52, 53).

Nach ihrer Aktivierung zur Plasmazelle sezernieren sie schon von Beginn einer sekundären Reaktion an hauptsächlich Antikörper vom Typ IgG und in geringeren Mengen auch IgA oder IgE, was einen Unterschied zu den anfänglichen IgM-Antikörpern in Primärantworten darstellt (54). Das ist möglich, weil die B-Gedächtniszellen schon während ihrer Entstehung im Keimzentrum in der Primärantwort einen Klassenwechsel durchgemacht haben. Wie aus der Abb. 1 ersichtlich, ist dabei auch ein deutlich schnellerer Anstieg der Antikörper im Serum zu verzeichnen.

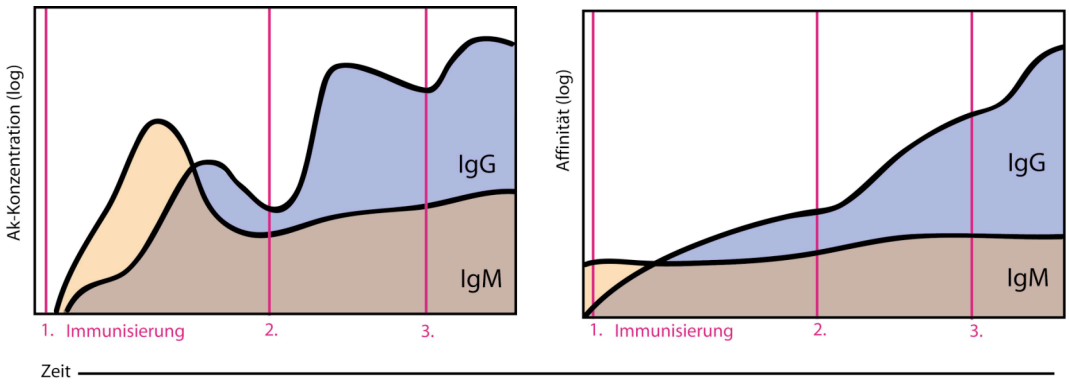

Abb. 1: Schematische Darstellung von Antikörperkonzentration und Antikörperaffinität nach Immunisierungen. Gezeigt ist die Änderung der Konzentration spezifischer IgG bzw. IgM Antikörper nach der ersten Immunisierung und Sekundär- sowie Tertiärimmunisierung (links) und die gleichzeitig stattfindende Erhöhung der Affinität vor allem der IgG Antikörper (rechts). Konzentration und Affinität sind logarithmisch aufgetragen, Einzelheiten werden im Text erläutert. Nach (55), verändert.

Aus der durchlaufenen Keimzentrumsreaktion und der dort stattfindenden somatischen Hypermutation (49, 54) ist auch die viel höhere Affinität der sezernierten IgG-Antikörper zu erklären (Abb.1). Zusätzlich werden in der sekundären Immunantwort nur die höher affinen Gedächtnis-B-Zellen zu einer weiteren Proliferation stimuliert. Das wird möglich durch die Antikörper, die aus der primären Immunantwort hervorgegangen waren. Sie binden das eingedrungene Antigen, so dass die BCR der Gedächtnis-B-Zellen mit den Antikörpern um die Bindung des Antigens konkurrieren. Nur die BCR mit höherer Affinität können das Antigen binden und prozessieren, um nach T-Zellerkennung Hilfe zur Proliferation und Differenzierung zu erhalten. Eine weitere Aufgabe der präexistierenden Antikörper in einer Sekundärantwort ist die Verhinderung einer Aktivierung naiver B- und T-Lymphozyten. Dieser Mechanismus

gewährleistet eine Ökonomisierung der Immunreaktionen, die im Falle einer Sekundärantwort nur den Gedächtniszellen zufällt, die schneller und effizienter reagieren können (55).

Die Frage der Lebensdauer von Gedächtnis-B-Zellen wird schon lange diskutiert. Transfer-Experimente von Gray et al. zeigten einen Verlust der transferierten spezifischen Gedächtnis-B-Zellen mit einer Halbwertszeit von 2-3 Wochen wenn kein Antigen mittransferiert wurde. Im Gegensatz dazu konnten durch die Applikation von Antigen beim Transfer noch 20 Wochen später reaktionsfähige Gedächtniszellen nachgewiesen werden (48). Daraus wurde die These abgeleitet, dass für die Aufrechterhaltung eines Gedächtniszellpools die wiederholte Stimulation durch Antigen, gebunden an FDC, erforderlich ist. Andere Studien wiederum konnten zeigen, dass Gedächtnis-B-Zellen lange Zeit ohne Teilung im Organismus persistieren (56), und für ihr Überleben kein Antigen benötigen (57).

2.4.2 Langzeit-Antikörpertiter

Nach vielen Infektionen und Impfungen sind noch Jahre später spezifische Antikörper im Serum nachweisbar und schützen so den Organismus vor einer neuen Infektion. Dass dieser Langzeit-Antikörpertiter nicht von einer wiederholten Infektion des Organismus abhängt, zeigen mehrere klassische Beispiele: Peter Ludwig Panum beschrieb 1846 seine Beobachtungen auf den Faroer Inseln im Nordatlantik (58). Die letzte Masernepidemie war dort 65 Jahre vorher zu verzeichnen gewesen, daraufhin waren die Faroer Inseln offensichtlich lange Zeit masernfrei. In einer Epidemie von 1846 erkrankten schließlich über 80% der Bevölkerung an Masern, aber alle Personen, welche vor 65 Jahren erkrankt gewesen waren, zeigten keine klinischen Symptome einer Erkrankung, bei der Antikörper die wichtigste Schutzaufgabe innehaben (29). Ein anderes Beispiel ist die Untersuchung an Bewohnern isoliert gelegener Inuitdörfern die ohne Kontakt zu fremden Individuen lebten. Bei diesen Menschen konnten mittels ELISA 40 Jahre nach einer Polioepidemie noch virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden (59). Auch im Falle einer Gelbfieberepidemie in Norfolk, USA im Jahr 1855 konnten 65 Jahre später aus immunen Individuen Seren entnommen werden, mit denen eine passive Immunisierung möglich war. Das heißt, dass die Übertragung der im Serum enthaltenen Antikörper ausreichte, um Affen vor einer Ansteckung zu schützen (60).

Auch nach Impfungen sind lange Zeit später noch zirkulierende Antikörper nachzuweisen. Obwohl der Antikörpergehalt im Anschluss an eine Immunisierung nach einem anfänglichen Maximum stark abfällt und sich auf einem Plateau bei ungefähr einem Zehntel des Ausgangswertes einpendelt (61), sind 25-30 Jahre nach einer Tetanus- oder

Diphterieimmunisierung die Titer gegen diese Antigene noch erhöht (62, 63, 64, 65), wie auch 40-60 Jahre nach Immunisierung gegen Pocken (61, 66). In Tierstudien fanden Gray und Kollegen nach Injektion von Tetanustoxoid oder einem immunogenen Schneckenprotein (keyhole limpet hemocyanin, KLH) in Mäusen einen Serum-Antikörpertiter, der das ganze Leben der Maus aufrechterhalten werden konnte (54). Auch Ovalbumin-spezifische Antikörper sind 21 Wochen nach einer Sekundärimmunisierung von Mäusen noch auf einem stabilen Niveau nachweisbar (37, 40).

2.4.3 Gedächtnisantikörper nach unterschiedlichen Immunantworten

Nicht alle Immunantworten führen zu einem Antikörpertiter der noch lange Zeit nach Kontakt mit dem Antigen nachweisbar ist. Unterschiede bestehen zum einen aufgrund der Art des Erregers bzw. Antigens und zum anderen aufgrund des Weges, den dieser/dieses benutzt um in den Körper zu gelangen.

Viele Viren induzieren nach einmaligem Kontakt einen Langzeitschutz mit Antikörpern. Dieses Phänomen ist zu beobachten bei Impfungen mit lebenden attenuierten Viren wie der Masern-, Polio- oder Gelbfieberimpfung (31). Ebenso sind im Tiermodell bereits nach einmaliger Infektion über ein Jahr später noch schützende Antikörper in großen Mengen vorhanden (31, 67), auch wenn der Virus bereits nach 2 Wochen vollständig aus dem Organismus eliminiert ist (67).

Im Gegensatz dazu sind bei sich nicht replizierenden Antigenen mehrere Kontakte nötig, um einen Langzeit-Antikörpertiter aufzubauen (54). Das gilt für die meisten Impfungen mit Toxoiden, d.h. unschädlich gemachte Toxine, z.B. im Falle von Tetanus oder Diphterie. Nur wenn den Menschen im ersten Jahr nach Primärimmunisierung zwei weitere Immunisierungen gegeben wurden, hielt der Antikörpertiter für lange Zeit (68). Genauso sind die oben beschriebenen langen Zeiträume nach Ovalbumin-Immunisierung erst nach einer Sekundärimmunisierung zu erreichen (37, 40).

Ein weiterer Unterschied besteht zwischen mukosalen und systemischen Infektionen. Die aufgezählten Beispiele entsprechen systemischen Infektionen, bei denen die Immunreaktionen in der Milz und den Lymphknoten ablaufen. Im Gegensatz dazu sind die meisten mukosalen Antikörperantworten relativ kurzlebig, d.h. im Menschen sind Antikörper nur wenige Monate bis ein Jahr nachzuweisen (54). Als Beispiele für diese lokalisierten mukosalen Infektionen sind Erreger aus der Gruppe der Rhinoviren, Rotaviren oder Respiratory syncitial viren (RSV) zu nennen. Auf der anderen Seite konnten auch nach einer Infektion junger Mäuse mit Rotaviren über ein Jahr später noch Antikörper in Stuhl und Serum nachgewiesen werden (69). Meist ist

dies jedoch nicht der Fall. Die nur kurze Immunität durch Antikörper könnte eine Erklärung sein, warum wiederkehrende respiratorische oder intestinale so Infektionen häufig sind (70).

2.4.4 Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters

Nach Aktivierung von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen sezernieren diese Zellen Antikörper, die spezifisch gegen das für ihre Aktivierung verantwortliche Antigen gerichtet sind. Über viele Monate bis Jahre hinweg können Antikörper dieser Spezifität noch im Serum nachgewiesen werden (54, 70). Die Halbwertszeit der Antikörper im Serum beträgt jedoch höchstens 2-3 Wochen (71-73). Daraus ergibt sich, dass Antikörper kontinuierlich nachproduziert werden müssen, um einen Antikörpertiter über längere Zeit aufrechterhalten zu können.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Mechanismen diskutiert, die gewährleisten, dass über lange Zeit hinweg spezifische Plasmazellen vorhanden sind, welche Antikörper produzieren. Im Allgemeinen geht man heute davon aus, dass nicht einer dieser Mechanismen alleine, sondern deren Zusammenspiel für die Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters verantwortlich zu machen sind (41, 68, 70).

1. Antigenabhängige Mechanismen

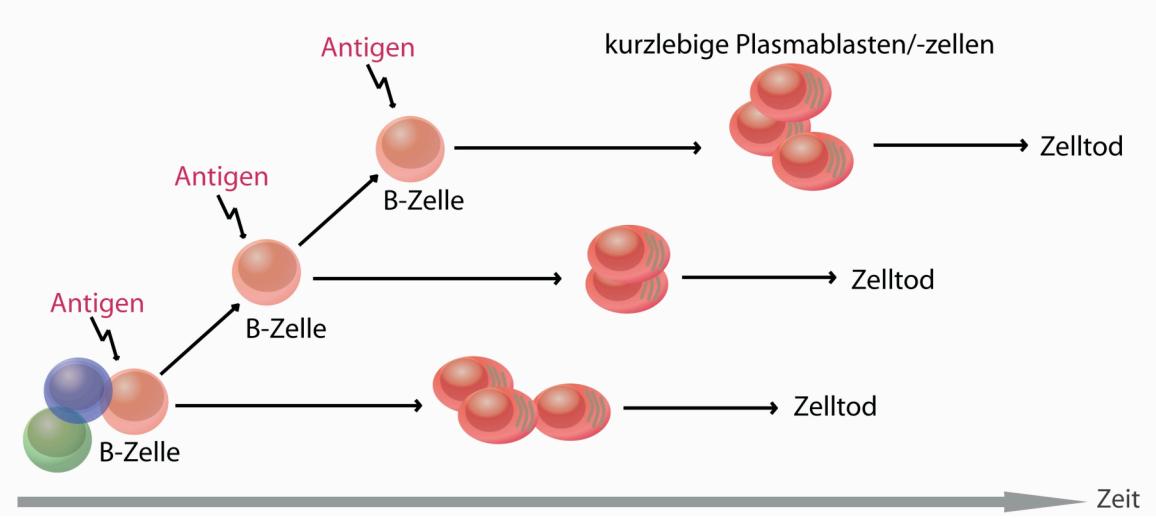

Abb. 2: Antigenabhängige Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters. Durch eine persistierende Immunreaktion oder wiederholten Antigenkontakt werden kontinuierlich B-Zellen stimuliert, die sich zu kurzlebigen Plasmablasten und Plasmazellen entwickeln. (Nach: (41), verändert)

Durch chronische Infektion, wiederholten Antigenkontakt oder durch persistierendes Antigen im Körper kann es zu einer kontinuierlichen Stimulation des Immunsystems kommen.

Vor allem von viralen Infektionen ist bekannt, dass die Erreger lange Zeit im Körper verbleiben (chronische Infektion), auch wenn die Krankheit als akut eingestuft wird, d.h. die klinischen Krankheitssymptome nach einiger Zeit verschwinden. Das ist der Fall bei Masern (74) oder Röteln, deren auslösende Paramyxoviren noch Jahre nach der ursprünglichen Infektion in Zellen des Gehirns (Masern) (75) bzw. die Rubiviren in peripheren mononukleären Zellen (Röteln) (76) in Einzelfällen nachgewiesen werden konnten.

Ebenso ist es möglich, dass erneute Kontakte mit dem Antigen aus der Umwelt die Immunantwort aufs Neue stimulieren und so Plasmazellen entstehen, die die spezifischen Antikörper sezernieren.

Einen weiteren antigenabhängigen Mechanismus stellt die wiederholte Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen durch persistierendes Antigen (im Gegensatz zum vollständigen Erreger) dar. Es konnte gezeigt werden, dass Antigen-Antikörperkomplexe an der Oberfläche von follikulären dendritischen Zellen (FDC) festgehalten werden, und so in der Lage sind, Gedächtnis-B-Zellen zur Bildung von Keimzentren anzuregen (77-81).

Gegen eine absolute Abhängigkeit von Antigen argumentieren die Wissenschaftler mit den Ergebnissen ihrer Untersuchungen und einigen empirischen Beobachtungen .

Klassischerweise wird der Langzeitantikörpertiter gegen Masern der Bewohner der Faroer Inseln (58), oder die Gelbfieberepidemie in Norfolk (60)) genannt (siehe oben). Dazu zählt auch die Untersuchung von Antikörpertitern pockengeimpfter Menschen in den U.S.A. Nachdem dort das Immunisierungsprogramm gegen Pocken im Jahre 1972 beendet worden war, und 1980 die Welt von der WHO als pockenfrei erklärt wurde, fanden die Wissenschaftler noch hohe Titer pockenspezifischer Antikörper bei Menschen, die vor über 50 Jahren gegen Pocken geimpft worden waren (61). Inwieweit bei den genannten Fällen viraler Erkrankungen mit einer möglichen Persistenz der Viren und somit für Antigenabhängigkeit argumentiert werden kann, ist schwierig einzuschätzen.

Die Dauer der Verfügbarkeit von persistierendem Antigen auf FDC hängt von der Lebenszeit der FDC ab und von der Halbwertszeit des Antigens. Während FDC wahrscheinlich sehr lange leben können (68), wurde die Halbwertszeit des Antigens auf der Oberfläche der FDCs von Slifka und Ahmed auf nur 8 Wochen geschätzt (70). Daraus ergäbe sich die Anzahl von einem Molekül Antigen pro FDC nach 3 Jahren, so dass eine alleine davon abhängende Stimulation des Immunsystems unwahrscheinlich erscheint.

Nicht zuletzt zeigten auch mehrere Transferstudien die Unabhängigkeit der Langzeitantikörpertiter von persistierendem Antigen. Der Transfer Ovalbumin- bzw. LCMV-spezifischer Plasmazellen in antigenfreie Mäuse ergab im Serum der Rezipienten einen antigenspezifischen Antikörpertiter, der bis zu ein Jahr aufrechterhalten wurde (30, 31).

2. Antigenunabhängige Mechanismen

Mechanismen zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters, die nicht von der Vorraussetzung einer wiederholten Stimulation durch das spezifische Antigen ausgehen, sind die kontinuierliche Sekretion von Antikörpern durch langlebige Plasmazellen im Knochenmark und die Aktivierung von spezifischen Gedächtnis-B-Zellen durch unspezifische Stimuli, sowie die Möglichkeit der Kreuzreaktivität mit Umwelt- oder Selbstantigenen.

Langlebige Plasmazellen

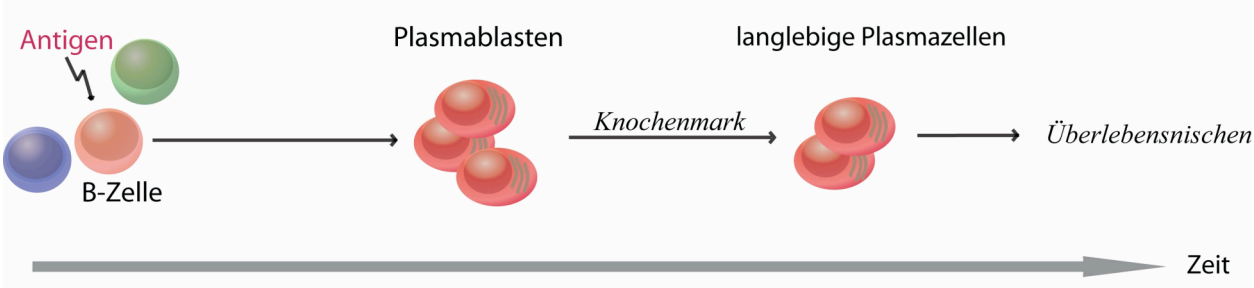

Abb. 3: Antigenunabhängige Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters durch langlebige Plasmazellen. Langlebige Plasmazellen können einen Antikörpertiter auch ohne kontinuierliche Antigenstimulation aufrechterhalten. (Nach: (41), verändert)

Es konnte gezeigt werden, dass das murine Knochenmark den wesentlichen Ort der Langzeitantikörper-Produktion nach einer viralen Infektion, Impfungen mit Lebendimpfstoffen sowie mit Proteinantigenen darstellt (67, 82, 83). Die Plasmazellen im Knochenmark sezernieren spezifische Antikörper hoher Affinität (84, 85), und sind zumeist aus einer Keimzentrumsreaktion hervorgegangen (25, 28).

Nach einer Immunisierung mit Ovalbumin konnten Manz et al. im Knochenmark von Mäusen eine Lebensdauer der Plasmazellen von mindestens 90 Tagen nachweisen, ohne dass eine Proliferation dieser Zellen zu beobachten war (37). Diese Plasmazellen können in antigenfreie Rezipienten transferiert werden und sezernieren auch dann weiterhin Antikörper für viele

Wochen (30). Die Halbwertszeit langlebiger Plasmazellen im Knochenmark in der Maus wurde von Slifka und Ahmed auf ungefähr 5 Monate geschätzt (31). Möglicherweise überleben Plasmazellen unter physiologischen Bedingungen länger als hier geschätzt, da eine Beeinträchtigung der Zellen durch die in dieser Studie angewandte Bestrahlung nicht auszuschließen ist.

Einen weiteren Hinweis auf den Stellenwert langlebiger Plasmazellen im Knochenmark im Rahmen der Langzeitantikörper-Produktion lieferte eine Untersuchung von Patienten, die mit Antikörpern gegen CD20 (Rituximab) behandelt wurden. Diese Behandlung zerstört B-Lymphozyten, aber nicht Plasmazellen, da diese kein CD20 mehr exprimieren. Eine Behandlung mit Rituximab änderte den Gehalt des Serums an Antikörpern gegen Tetanus oder Mikrobielle Antigene, als Beispiele für Geächtnisantikörpertiter, nicht signifikant (86, 87). Da auch humane Gedächtnis-B-Zellen durch ihre Expression von CD20 depletiert worden waren, ist es sehr wahrscheinlich, dass die CD20 negativen Plasmazellen im Knochenmark den Langzeitantikörpertiter gewährleisten.

Das Überleben der Plasmazellen im Knochenmark hat den Vorteil, dass die Zellen dort in der geschützten Umgebung weniger Einflüssen aus der Peripherie ausgesetzt sind und kontinuierlich Antikörper produzieren können. Zudem können die peripheren lymphatischen Organe wie die Milz oder Lymphknoten nach einer akuten Infektion wieder in ihren Ausgangszustand zurückkehren, nachdem die Plasmazellen in das Knochenmark gewandert sind, und sind so bereit für neue Immunantworten (70).

Idiotypische Netzwerke

Eine Theorie zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters, die heute weitgehend verlassen wurde, ist die Möglichkeit einer gegenseitigen Stimulation des Immunsystems durch so genannte idiotypische Netzwerke. Dieser Mechanismus ist ebenfalls unabhängig von spezifischem Antigen. Vereinfacht geht die von Jerne (88) aufgestellte Theorie davon aus, dass sich Antikörper (antiidiotypische Antikörper) gegen die variablen Regionen von Antikörpern (idiotypische Antikörper) im Serum bilden. Durch die Interaktion der antiidiotypischen Antikörper mit ihren Idiotypen, bzw. deren gebundener Form als BCR, kommt es zur kontinuierlichen Stimulation von B-Zellen. Deren Differenzierung zu Plasmazellen gewährleistet eine Aufrechterhaltung des Langzeitantikörpertiters (89).

Bystander-Aktivierung bzw. polyklonale Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen

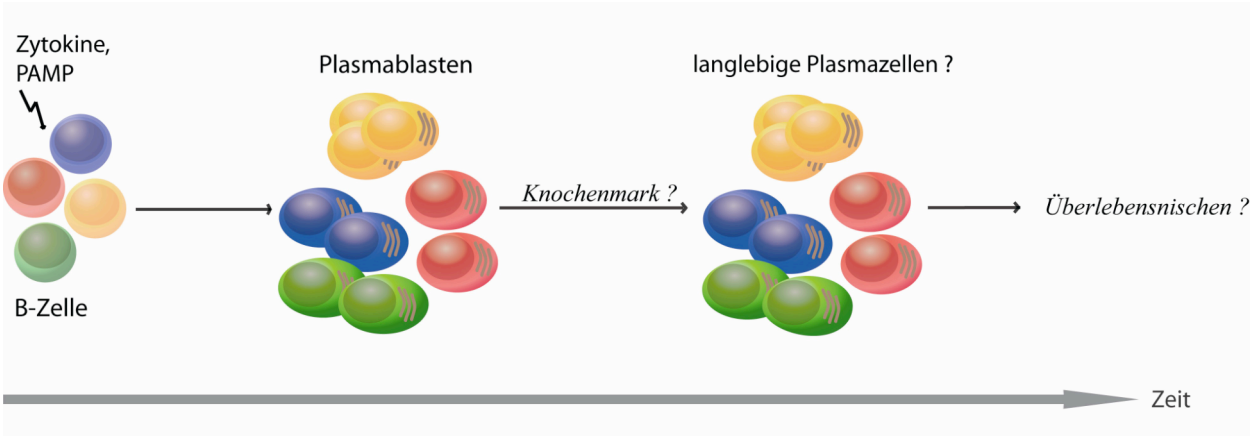

Abb. 4: Antigenunabhängige Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters durch polyklonale-/bystander-Aktivierung. Gedächtnis-B-Zellen werden nicht durch ihr spezifisches Antigen aktiviert, sondern durch polyklonale-/bystander-Stimuli. Diese Aufgabe können unterschiedliche Antigene, Zytokine oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) übernehmen. Ob daraus Plasmazellen entstehen, die ins Knochenmark wandern und lange überleben ist nicht bekannt.

Mit ihren Untersuchungen an humanen Lymphozyten schlugen Bernasconi und Lancaveccia kürzlich einen weiteren Mechanismus vor, der es ermöglicht, über viele Jahre hinweg spezifische Antikörper zu erzeugen (51). Sie stellten fest, dass humane Gedächtnis-B-Zellen in vitro durch unspezifische Stimulation mit mikrobiellen Bestandteilen wie z.B. CpG von Bakterien, oder Zytokinen von T-Zellen aktiviert werden können, ohne dass eine Triggerung durch den BCR notwendig ist.

Diese Art der Stimulation wird polyklonale Aktivierung bzw. bystander-Aktivierung genannt (vgl unten *Begrifflichkeit*). CpG, das sind unmethylierte DNA-Oligonukleotide, wird von einem Mitglied der Toll-like-Rezeptorfamilie erkannt, dem TLR-9 (5, 90). Da der TLR-9 im Menschen auf naiven B-Zellen nicht oder kaum exprimiert wird, während er auf Gedächtnis-B-Zellen in hohem Masse vorhanden ist, werden durch CpG nur Gedächtnis-B-Zellen stimuliert (51). Auf diese Weise können im Laufe von Immunreaktionen durch polyklonale-/bystander-Aktivierung von Zellen des Gedächtnis-B-Zell-Pools neue Plasmablasten entstehen, die alte Plasmazellen ersetzen (50, 51, 91). Dazu ist das spezifische Antigen nicht erforderlich. In in vivo Untersuchungen an Menschen nach Immunisierung mit Tetanustoxin konnten Bernasconi et al. feststellen, dass sich 6-8 Tage nach der Immunisierung eine Erhöhung von Plasmazellen anderer Spezifitäten aus alten Immunreaktionen im Blut feststellen ließ. Während dieser Zeit waren

ungefähr 10-Mal mehr dieser Plasmazellen im Blut vorhanden als vor der Immunisierung, insgesamt aber in äußerst niedrigen Frequenzen, d.h. 0,1 Plasmazelle vor und 1 Plasmazelle je 1 Million peripheren mononukleären Zellen nach der Immunisierung (51). Diese Beobachtung führte er auf eine polyklonale-/bystander-Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen aus zurückliegenden Immunreaktionen durch die Tetanusimmunisierung zurück. Eine andere Erklärung für das Auftauchen dieser Plasmazellen im Blut könnte jedoch in einer Verdrängung residenter Plasmazellen im Knochenmark zu finden sein, die den in der Tetanusimmunisierung entstandenen Plasmazellen weichen mussten (44).

Begrifflichkeit

Der Begriff „polyklonaler Stimulus“ ist in der Literatur nicht eindeutig definiert. Teilweise wird hierunter ein Stimulus, ausgehend von mikrobiellen Bestandteilen wie LPS oder CpG (vermittelt über TLR4 bzw.9) verstanden, in Abgrenzung zu dem anderen Begriff „Bystander-T-Zellhilfe“, der einen antigenunabhängigen, nicht BCR-vermittelten Stimulus beschreibt, der wahrscheinlich über T-Zell-produzierte Zytokine wirkt (51, 91). An anderen Stellen wird der Begriff „polyklonaler Stimulus“ als Überbegriff für jeden antigenunabhängigen Stimulus auf B-Zellen angewandt, oder der Ausdruck „polyklonale Stimulation“ verwendet, wenn eine BCR-unabhängige, aber MHCII vermittelte T-Zellhilfe beschrieben wird (92). In dieser Arbeit wurde darum die Kombination polyklonaler/bystander-Stimulus verwendet.

3 Zielsetzung

Pathogene oder Impfstoffe lösen im Körper die Produktion und Sezernierung von Antikörpern aus. Diese Antikörper können oft für viele Jahre, manchmal ein Leben lang, im Serum nachgewiesen werden, auch wenn die Halbwertszeit der Antikörpermoleküle nur 2-3 Wochen beträgt. Daraus ergibt sich, dass die Antikörper kontinuierlich nachproduziert werden müssen, um einen Antikörpertiter über lange Zeit aufrechtzuerhalten. Die Mechanismen der Aufrechterhaltung dieses Langzeitantikörpertiters sind bis heute nicht genau bekannt. Man weiß, dass die Antikörper von Plasmazellen im Knochenmark sezerniert werden, für deren Vorhandensein es jedoch mehrere Erklärungsversuche gibt.

Eine Hypothese geht von langlebigen Plasmazellen aus, die kontinuierlich Antikörper sezernieren. Die zweite Hypothese geht von einer wiederholten antigenabhängigen Aktivierung von B-Zellen aus. Hierbei spielen Mechanismen wie persistierende Infektion, Reinfektionen oder Antigenpersistenz eine Rolle. Eine dritte, kürzlich aufgestellte Hypothese geht davon aus, dass Gedächtnis B-Zellen durch unspezifische Stimulantien wiederholt dazu aktiviert werden, sich zu Plasmazellen zu differenzieren. Unspezifische Stimulantien können T-Zell Zytokine oder mikrobielle Produkte wie z.B. LPS oder bakterielle DNA sein, die die Gedächtnis B-Zelle ohne Triggerung durch den BCR aktivieren. Dieser Mechanismus wird als polyklonale-/bystander-Aktivierung bezeichnet und beruht im Wesentlichen auf der in Zellkultur beobachteten leichten Stimulierbarkeit von Gedächtnis B-Zellen mit den oben genannten Stimulantien.

In der vorliegenden Studie soll das dargestellte Phänomen an Mäusen untersucht werden. Dabei soll getestet werden, ob polyklonale-/bystander-Aktivierung unter physiologischen Bedingungen eine Rolle für die Aktivierung von B-Zellen und die Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters spielt.

Hierzu soll ein Mausmodell etabliert werden, welches qualitative und quantitative Aussagen über eine polyklonale-/bystander-Aktivierung möglich macht. Ein besonderes Augenmerk soll auf eine nähere Charakterisierung der aus polyklonaler-/bystander-Aktivierung entstandenen Zellen gelegt werden, deren Zahl, Morphologie und Wanderungsfähigkeit ins Knochenmark, sowie mögliche Effekte auf den Serumantikörpertiter.

4 Material und Methoden

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Puffer und Reagenzien wird den einzelnen Methoden vorangestellt, da sie die Grundlage der durchgeführten Experimente waren. Die im Einzelnen verwendeten Materialien sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt.

4.1 Material

4.1.1 Medien, Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	**Zusammensetzung**	**Hersteller**
PBS (Phosphat buffered saline)	8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44 g/l Na2HPO4 pH auf 7,2 eingestellt, Lösung autoklaviert	Roth Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
PBS/BSA (PBS mit Bovinem Serum-Albumin)	PBS 0.5% BSA	Biomol
FACS- Flow Puffer	PBS 0.05% Azid	DRFZ
CASI-Flow Puffer	PBS 0.05% Azid, Lösung steril filtriert (0.2µm Ø)	DRFZ
Spezielle Medien und Puffer für den ELISPOT Assay		
Komplettes Zellkulturmedium	Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 10% Fetales Kälberserum (FCS) 10mM L-Glutamat 20µM ß-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100µg/l Streptomycin	Life Technologies Invitrogen “ “ “ “
Blockierungspuffer	PBS 3% BSA Lösung steril filtriert (0,2µm Ø)	Biomol
Waschpuffer	PBS 3% BSA 0.01% Tween20	Biomol Sigma-Aldrich
AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)	Sigma-Aldrich

	0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl2 900 ml Wasser pH 10,25 eingestellt mit HCl steril filtriert und bei 4˚C gelagert	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Entwicklungs-Puffer	8 mg BCIP(5-Bromo-c-chloro-indolyl-phosphat), 8 ml AMP-Puffer, -20 min bei 65˚C im Wasserbad 2 ml 3% Agarose, niedriger Elektroendosmosewert (in Mikrowelle geschmolzen) -10 min bei 65˚C im Wasserbad	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Substrat (BCIP)	5- Bromo-4-chloro-3-indonyl-phosphat	Sigma-Aldrich
Spezielle Puffer und Lösungen für den ELISA		
PBS/BSA-Acid	PBS 0.5% BSA, 0,2% NaN3	 Roth
Substratlösung	Substrat: 99,5 mmol/l p-Nitrophenylphosphat, pH8.5 Konservierungsmittel Puffer/Aktivatoren: 1,12 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol 2,49 mmol/l Magnesiumacetat 0,5 mmol/l Zinksulfat 2,49 mmol/l N-(2-Hydroxyethyl) ethylendiamintriessigsäure	Roche Roche

4.1.2 Übersicht über die verwendeten Färbereagenzien und Antikörper

Antikörper-Konjugat	Klon	Funktion	Verwendung	Herkunft
Färbereagenzien				
OVA–Cy5		Detektion ovalbuminbindender Zellen, s.f. und i.c.	FACS	Kopplung durch DRFZ

Antikörper				
anti CD16/CD32 (Ratte-anti-Maus)	2,4G2	Blockierung der Fc-Rezeptoren, s.f.	FACS	DRFZ
anti CD138–PE (Syn-1)	281-2	Färbeantikörper, s.f.	FACS	BD Pharmingen
anti B220 – Biotin	RA 36 B2	Färbeantikörper, s.f.	FACS	DRFZ
anti B220 Microbeads	RA3-6B2	magnetische Markierung, s.f.	MACS	Miltenyi-Biotec
anti MHCII-Biotin	M15/114	Färbeantikörper, s.f.	FACS	DRFZ
anti CD22-Biotin		Färbeantikörper, s.f und i.c.	FACS	Miltenyi-Biotec
anti BrdU-FITC	3D4 PRB-1	Färbeantikörper, i.c.	FACS	BD Pharmingen
Anti Kappa-Leichteketten	187.1	Färbeantikörper, s.f. und i.c.	FACS	BD Pharmingen
anti IgG	polyklonal	Coatingantikörper	ELISPOT,ELISA	Southern Biotech
anti IgM	polyklonal	Coatingantikörper	ELISPOT,ELISA	"
anti IgG – Biotin (Ziege-anti-Maus)	polyklonal	Detektionsantikörper	ELISPOT,ELISA	"
anti IgM – Biotin (Ziege-anti-Maus)	polyklonal	Detektionsantikörper	ELISPOT,ELISA	"
Sekundärreagentien				
Streptavidin - PerCP	-	Bindet spezifisch an Biotin	FACS	BD Pharmingen
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (SAAP)	-	Bindet spezifisch an Biotin	ELISPOT,ELISA	Roche

4.1.3 Kommerziell erworbene Assays („Kits“)

Name	Inhalt	Hersteller
BrdU Flow Kit	anti-BrdU Antikörper, Cytofix/CytopermTM Buffer, Cytofix/CytopermTM Buffer, Cytoperm PlusTM Buffer DNAse in PBS-BSA (300µg/ml)	BD Pharmingen

4.1.4 Besondere Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Zweck	Hersteller
Pipetten	Zellbiologisches Arbeiten	Abimed
Pipettenspitzen	Zellbiologisches Arbeiten	Corning Costar
Mehrkanalpipette	ELISA, ELISPOT-Assay	Thermo Labsystems
Zellröhrchen 15ml, 50ml	Zellbiologisches Arbeiten	Corning Costar
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Zellbiologisches Arbeiten	Corning Costar
Sterilfilter (Ø 0,2µm)	Zellbiologisches Arbeiten	Millipore
Zellsiebe (Ø 70µm)	Gewebedesintegration	Becton Dicinson
Petrischalen	Zellbiologisches Arbeiten	Corning Costar
96-er Mikrotiterplatte (flachbodig,hochbindend)	ELISA, ELISPOT-Assay	Corning Costar
Spritzen	Immunisierung, Gewebedesintegration	Braun
Kanülen	Immunisierung	Braun

4.1.5 Geräte und Software

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Brutschrank	_____	Heraeus
Zellzählgerät	Casy® Model TT	Schärfe System
Mikroskop	CK30	Olympus
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	Becton Dickinson

FACS-Software	Cell QuestTM Research Software Version	Becton Dickinson
ELISA-Reader	E-Max	MWG-Biotech
ELISA-Software	SOFTmax-Pro 3.0	Molecular Devices Corp

4.2 Mäuse und Immunisierungen

4.2.1 Mäuse

Verwendet wurden weibliche Mäuse des Stammes Balb/c (B: Bragg, alb: albino), einem der ältesten Mausinzuchtstämme (1913). Durch vielfache, mindestens 20 fache Bruder x Schwester Verpaarung entstehen homozygote, syngene Tiere (d.h. identische Autosomen, wie eineiige Zwillinge). Dadurch sind die einzigen Unterschiede zwischen den Tieren auf verschiedene Umweltfaktoren zurückzuführen. Diese Tiere wurden von der Versuchstierzuchtanlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin bezogen und sowohl Aufzucht als auch Haltung erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen (spf). Zu Anfang der jeweiligen Experimente waren die Mäuse 6-10 Wochen alt.
Tierversuchs-Genehmigungsnummer: G0190/03.

4.2.2 Übersicht über die zu Immunisierungen verwendeten Proteine, Oligonucleotide und Adjuvantien

Bezeichnung	Bemerkung	Hersteller
Ovalbumin (OVA)	Protein aus Hühnerei	Sigma-Aldrich
Imject®-Alum	Aluminium-Magnesium-Hydroxid	Pierce
4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)	Haptenantigen, daher gekoppelt an KLH (30 NP-Gruppen je KLH)	Biosearch Technologies
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	Respiratorisches Protein der Schlüssellochschnecke	Biosearch Technologies
CpG 1668	Basensequenz: 5´ TsCsC sAsTsg sAsCsg sTsTsC sCsTsg sAsTsg sCsT, (s =Thiobindung)	TIB Molbiol

4.2.3 Immunisierungen

Für eine Primärimmunisierung mit Ovalbumin wurde zunächst das kristalline Protein in sterilem PBS gelöst (c= 1mg/ml), und anschließend 20 min mit gleichem Volumen Imject®-Alum verrührt. Von dieser Antigen-Adjuvans Mischung erhielten die Mäuse 200µl intraperitoneal appliziert, d.h. jeweils 100µg Proteinantigen. Durch das mitinjizierte Alum als Adjuvans (lat. adiuvare=unterstützen,helfen) wird das Antigen länger im Bauchraum festgehalten und vergrößert so die Zeitspanne, in der Immunzellen mit dem Antigen in Kontakt treten können (Depotwirkung). Außerdem lockt Alum Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen oder Antigen-präsentierende Zellen an, um mit dem Antigen zu interagieren.
Nach drei Wochen erfolgte eine sekundäre Immunisierung mit 100µg in 100µl PBS gelöstem Ovalbumin wiederum intraperitoneal injiziert. In einigen Experimenten wurde weitere drei Wochen später den Tieren noch einmal die gleiche Menge Ovalbumin in eine laterale Schwanzvene injiziert. Für die Untersuchung der Auswirkungen eines polyklonalen-/bystander-Stimulus auf die spezifisch in einer gegen Ovalbumin gerichteten Immunantwort gebildeten Zellen war eine weitere Immunisierung notwendig. Hierfür wurde den Mäusen 2 Wochen nach dieser letzten Ovalbumininjektion eine Mischung aus 100µg des Haptens NP, gekoppelt an KLH, und 10µg CpG, gelöst in 110µl PBS intraperitoneal verabreicht. Wenn im Falle des NP von einem Hapten (griech. beschleunigen) gesprochen wird, so bedeutet dies, dass es sich hierbei um ein sehr kleines chemisches Molekül handelt, welches alleine keine Immunantwort auszulösen vermag, jedoch Antikörper bindet. Immunogen wird es nach Kopplung an ein Trägerprotein. Die Funktion des Trägerproteins übernahm in der vorliegenden Arbeit KLH.
Im Gegensatz zur DNA von Prokaryonten enthält Säugetier-DNA nur sehr wenige unmethylierte cytidyl-guanosyl-Sequenzen (CpG). Vermittelt über den TLR9 auf Lymphozyten kann CpG immunstimulatorische Effekte ausüben. Beschrieben sind eine Proloferationsinduktion von Gedächtnis-B-Zellen bei Inkubation mit CpG (50, 51, 94), Produktion von TNF-α und Interleukinen durch Makrophagen und Zytokinproduktion durch dentritische Zellen (5).

4.2.4 DNA-Markierung proliferierender Zellen mittels BrdU

BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon und wird an dessen Stelle von der DNA-Polymerase während der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus in den neuen Strang inkorporiert. Somit ist es möglich, jede Zelle mit neu gebildeter DNA mit gegen BrdU gerichteten, fluoreszensmarkierten Antikörpern unter anderem im FACS nachzuweisen. Zwar kann BrdU Basentransition verursachen und somit mutagen wirken, hat aber dennoch weniger starke Auswirkungen auf den Organismus als z.B. radioaktiv markierte Nukleotide.

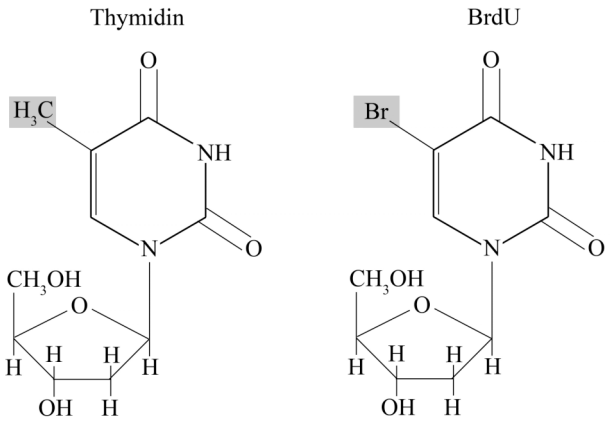

Abb. 5: Das Nucleosid Thymidin und sein Basenanalogon BrdU.

In den BrdU- Experimenten wurde gleichzeitig mit der intravenösen Ovalbumininjektion begonnen, den Mäusen BrdU oral zuzuführen. Hierzu wurde für 5 Tiere BrdU in einer Konzentration von 1mg/ml in 200 ml Wasser gelöst. Als Geschmackszusatz wurde 200mg Zucker beigefügt. Da BrdU nach dem Lösen in Wasser lichtempfindlich ist, wurde sorgfältig auf eine Lichtprotektion der Wasserflaschen geachtet und alle 3 Tage die Lösung ausgewechselt.

4.2.5 Gewinnung der Seren

Zunächst wurde die Maus unter eine 100W Rotlichtlampe gesetzt. Die Erwärmung führt zu einer Dilatation der peripheren Gefässe, wodurch die Blutabnahme wesentlich erleichtert wird.
Aus einer lateralen Schwanzvene konnte so ca. 150µl Blut gewonnen werden. Nach vollständiger Gerinnung bei Raumtemperatur über Nacht wurde das Serum abpipettiert und bei -20°C gelagert.

4.3 Zellisolierung und Zellquantifizierung

4.3.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension

Die zu untersuchende Maus wurde durch Genickbruch getötet und mit 70% Ethanol desinfiziert um eine Kontamination der Organe zu vermeiden. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde die Milz im linken oberen Bauchraum aufgesucht, mit Pinzette und Skalpell vorsichtig entfernt, und sofort in eine Petrischale mit kaltem RPMI Medium überführt. Alle folgenden Schritte wurden zur Vermeidung des Absterbens der Zellen auf Eis durchgeführt. Zur Gewebsdesintegration diente ein Zellsieb, durch das die intakte Milz gestrichen wurde, so dass die Zellen von Milzkapsel und Bindegewebe getrennt wurden und eine klümpchenfreie Suspension der Zellen entstand. Die Femuren wurden durch Abtrennung der Knochen am Hüft- und Kniegelenk freigelegt und das anhaftende Muskelfleisch entfernt. Nach Eröffnung der Markhöhle medial der Epiphysen mit einer kleinen Schere konnte mittels dünner Kanüle in die Markhöhle eingegangen und das Knochenmark durch den Flüssigkeitsstrom behutsam in eine Petrischale ausgespült werden. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) mit Medium gewaschen, und die Pellets je nach Weiterverwendung in Medium oder PBS/BSA resuspendiert.

4.3.2 Zellquantifizierung mittels CASY®-Technology

Der CASY®-Technology liegt das Prinzip der elektronischen Zellvolumenbestimmung mittels Pulsflächenanalyse zugrunde. Dabei wird jede Zelle beim Durchgang durch den Sensor, basierend auf der physikalischen Grundlage der Widerstandsmesstechnik, mit einer sehr hohen Frequenz, die bis zu 1 000 000 Messungen pro Sekunde beträgt, erfasst. Sowohl Partikel als auch intakte Zellen verdrängen eine ihrem Volumen entsprechende Menge einer Elektrolytlösung und durch die resultierende Widerstandserhöhung ist eine Berechnung deren Volumen möglich. Durch die hohe Messfrequenz wird die Pulsamplitude jeder Zelle nicht nur einmal, sondern mehrere hundert Mal erfasst, und so diffizile Aussagen über Form, Breite, und Zellvolumen möglich gemacht. Durch einen nachgeschalteten, fest kalibrierten Vielkanalanalysator ist eine Verrechnung der Messdaten möglich, und man erhält standardisierte und reproduzierbare Ergebnisse. Die zu messende Einzellzellsuspension wurde für eine genaue Messung mit CASY-Flow Puffer verdünnt, der Bereich der Zellgröße mit zwei frei beweglichen Cursorn festgelegt, innerhalb der das Gerät die Zellzahl berechnet, und die Probe gemessen. Dabei entstanden für

Suspensionen aus der Milz und aus dem Knochenmark zwei unterschiedliche charakteristische Ergebnissdiagramme.

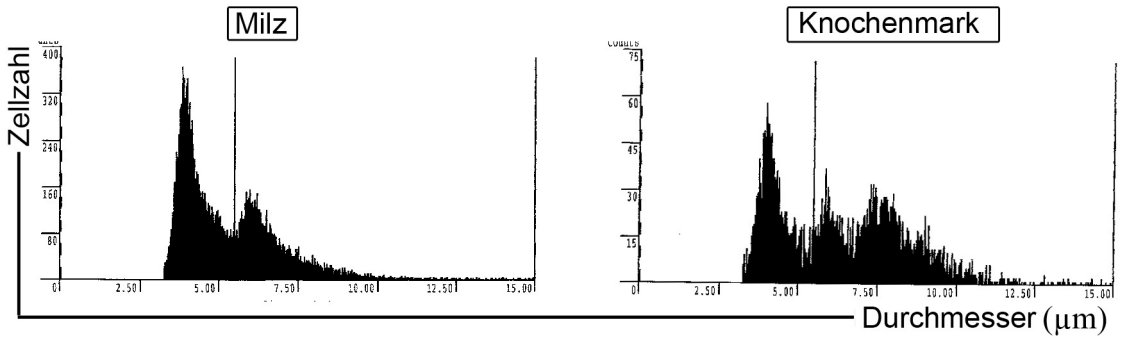

Abb. 6: Ergebnisdiagramme der Zellzahlbestimmung mittels CASY-Technologie. Dargestellt sind Proben von Mauszellen aus Milz und Knochenmark. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark erkennt man eine Zellpopulation aus kleinen Zellen, die hauptsächlich aus Erythrocyten und Zelldebris besteht. Aufgrund ihres größeren Durchmessers lassen sich mononukleäre Zellen (Leukozyten) hiervon abgrenzen. Die Zellen größer als 5,48µm, rechts vom Cursor, wurden in die Zellzahlbestimmung einbezogen. Im Knochenmark sind diese des Weiteren in zwei Populationen unterschiedlicher Größe aufgeteilt, die die verschiedenen Vorläuferzellen im Knochenmark repräsentieren. Der Gesamtzahlbestimmung mononukleärer Zellen, als auch der Plasmazellzahlbestimmung aus ELISPOT-Experimenten im Knochenmark wurde zugrunde gelegt, dass in beiden Femuren der Maus 12,6% des gesamten Knochenmarks enthalten sind (82), und somit die in den Experimenten erhaltenen Zahlen mit dem entsprechenden Faktor multipliziert.

4.4 Durchflusszytometrische Messungen

4.4.1 Prinzip des Durchflusszytometers

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, durch laservermittelte Anregung fluoreszensmarkierter Moleküle eine sowohl qualitative als auch quantitative Zuordnung einzelner Zellen zu definierten Zellpopulationen zu treffen.

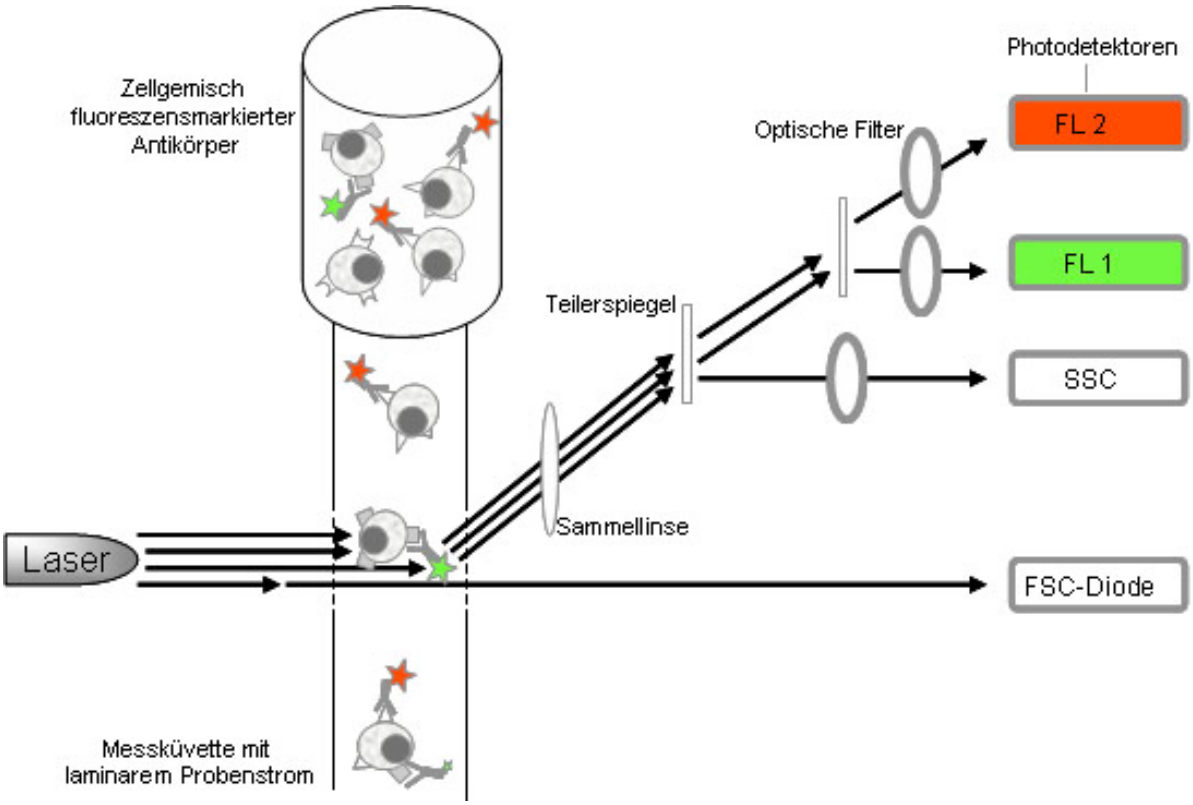

Abb. 7: Prinzip einer durchflusszytometrischen Messung. Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass diese in einem ersten Schritt durch fluoreszensgekoppelte Antikörper markiert werden, welche gegen ausgewählte Zellantigene gerichtet sind. Es folgt die Anregung der Fluorochrome durch Laserlicht, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Auf diese Weise erhält man für jeden eingesetzten Fluoreszensfarbstoff ein spezifisches Signal. Einzelheiten sind im Text erläutert (nach (55), verändert).

Am Anfang einer zytometrischen Messung steht die Markierung der Zellen mit Antikörpern, welche zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt wurden. Die Antikörper sind gegen ausgewählte Moleküle gerichtet, meist Proteine, die auf der Zelloberfläche lokalisiert und den Differenzierungs-/ CD-Antigenen (cluster of differentiation) zuzuordnen sind. Das Gemisch aus markierten Zellen wird mittels hydrodynamischer Fokussierung (95) in feinste Tröpfchen zerlegt, so dass ein laminarer Probenstrom einzeln hintereinander aufgereihter Zellen entsteht. Diese Zellen werden vom monochromatischen Licht eines Lasers, im verwendeten Gerät ein Argonlaser der Wellenlänge 488nm und einem Diodenlaser, 635nm, getroffen. Durch die Streuung des Lichtes entstehen verschiedene Informationen: Unmarkierte Zellen lenken die Strahlen zum einen nach vorne ab, wodurch das Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC)

entsteht, und Aussagen über die Größe der Zellen möglich macht. Zum anderen wird ein im 90˚-Winkel an Strukturen innerhalb der Zelle abgelenktes Seitwärtsstreulicht (SSC) registriert und stellt ein Maß für die Zellgranularität, Membranoberfläche und Zellform dar. Trifft der Laserstrahl auf eine fluoreszenzmarkierte Zelle, wird ein Teil der Lichtenergie absorbiert und Fluoreszenslicht einer höheren Wellenlänge emittiert. Sammellinsen bündeln dieses Licht, zwischengeschaltete Spiegel teilen es auf und optische Filter erlauben eine spezifische Detektion der einzelnen Fluoreszenzen. Nachgeschaltete Photodetektoren und Photodioden wandeln die optischen Signale in elektrische Impulse um, die mit der Intensität des Lichtsignals korrelieren. Die Daten von FCS, SSC und den verschiedenen Fluoreszenzen können für jede Zelle einzeln erfasst, von einem Computer gesammelt, und anschließend mit einer speziellen Software ausgewertet werden.

4.4.2 Probenmessung und Datenauswertung

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen an einem Durchflusszytometer vom Typ FACS-Calibur™ und die Daten wurden mit Cellquest™ Research Software ausgewertet. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Darstellung der Daten. Grundsätzlich werden FSC und SSC linear, die Fluoreszenzen jedoch in logarithmischer Darstellung aufgetragen, was eine bessere Auflösung schwacher Signale garantiert. Bei dem eindimensionalen Histogramm handelt es sich um eine einfache Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenssignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird. Soll die Beziehung zweier verschiedener Fluoreszenzen auf einer Zelle gezeigt werden, eignet sich die Darstellung in Form eines Dot-Plots. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle, die durch ihre Lage in der zweidimensionalen Darstellung als unmarkierte, einfach positive oder doppelpositive Zelle erkennbar wird.

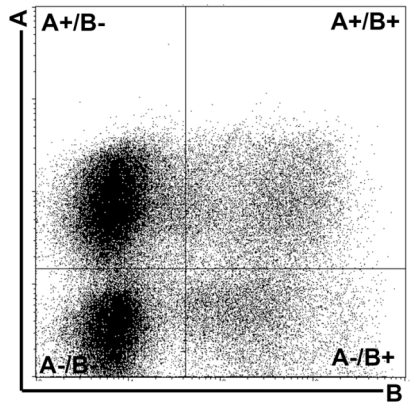

Abb. 8: Darstellung einer FACS-Messung von murinen Milzzellen. Aus der doppelten Markierung mit „A“ und „B“ ergibt sich ein charakteristischer Dot-Plot. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Eine Schwierigkeit bei der Messung mehrfach markierter Zellen kommt durch spektrale Überlappungen der eingesetzten Fluorochrome zustande. Zwar ist diese zum einen durch die Auswahl von Fluorochromen mit möglichst entfernten Emissionsspektren, zum anderen durch den Einsatz der Filter möglich, die entweder ein definiertes Wellenlängenband (Bandpassfilter) oder nur Licht ab einer bestimmten Wellenlänge (Longpassfilter) passieren lassen (96). Dennoch ist bei Mehrfachfärbung regelmäßig vor der eigentlichen Messung eine so genannte Kompensation nötig, um Fluoreszenssignale, die in einem anderen Kanal als in dem für sie vorgesehenen registriert werden, zu minimieren. Dazu werden einfach gefärbte Zellen gemessen und ein gewisser Anteil des jeweiligen Fluoreszenssignals in den Kanälen proportional zur Fluoreszensintesität im eigentlich zugehörigen Kanal subtrahiert (95).

4.4.3 Markierung der Zellen mit Antikörpern

Die vorbereitete Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet aus 10^6-10^7 Zellen vorsichtig mit PBS-BSA und den darin enthaltenen jeweiligen Antikörpern resuspendiert. Alle Schritte wurden auf Eis und unter Lichtschutz in einem Volumen von 50-200µl in Eppendorf-Zellröhrchen durchgeführt, gewaschen wurde grundsätzlich in 10-fachem Überschuss mit PBS-BSA oder Waschpuffer. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von Fc-Teilen der Färbeantikörper an Fc-Rezeptoren anderer Zellen (z.B. Phagozyten) wurde zunächst 15 min mit anti-CD16/CD32 (10µg/ml) inkubiert, mit dem die Fc-Teile blockiert wurden. Es schloss sich ein Waschschritt an, bevor die eigentlichen fluoreszensmarkierten Antikörper in einer zuvor aus Titrationsversuchen ermittelten Konzentration zugefügt und für eine 20 minütige Inkubation belassen wurden. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurde erneut gewaschen. Manche Primärantikörper sind nicht direkt mit einem Fluorochrom markiert, sondern mit der nur 0,24 kDa großen Verbindung Biotin (prosthetische Gruppe, die als Cofaktor vieler Enzyme wirkt). Wurde ein solcher Antikörper eingesetzt, war eine erneute Inkubation mit einem fluorochrommarkierten Protein nötig. Markiertes Streptavidin aus dem Bakterium Steptomyces avidinii, welches sehr spezifisch an Biotin bindet, wurde in einer Konzentration von 1µg/ml für weitere 15 min zum Zellpellet hinzugefügt und anschließend gewaschen. War für die Analyse nur die Markierung oberflächlich exprimierter Moleküle notwendig, war die Färbung hier beendet, die Zellen wurden in 500µl PBS-BSA aufgenommen und gemessen.

Sollten mit der Durchflusszytometrie Ovalbumin-spezifische B-Zellen oder inkorporiertes BrdU nachgewiesen werden, war zusätzlich eine intrazelluläre Antikörpermarkierung notwendig. Für die vorliegenden Daten wurde die Fixation der Zellen, Permeabilisierung und intrazelluläre

Färbung mit dem BrdU-Flow Kit und zugehörigem Protokoll durchgeführt. Nach Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen fixiert. Hierdurch sollen die exprimierten Antigene über einen längeren Zeitraum stabil gehalten, die Zellmorphologie aufrechterhalten, und der Antigenverlust minimiert werden. Dazu wurden die Zellpellets zunächst mit 100µl Cytofix/CytopermTM Buffer 15 min inkubiert (enthält 4% Paraformaldehyd und Saponin). Durch das enthaltene Saponin (lat.sapo-Seife) werden die Zellen im gleichen Schritt durchlässig gemacht, indem dieses pflanzliche Detergenz mit dem Cholesterol der Zellmembran reagiert und dadurch für Antikörper passierbar macht. Da diese Permeabilisierung reversibler Natur ist, muss in jedem folgenden Schritt ebenfalls Saponin enthalten sein. Anschließend wurde mit einem speziellen Waschpuffer (enthält fetales Rinderserum und Saponin) gewaschen.
Eine 10 minütige Re-Fixation mit 100µl CytopermTM Plus Buffer (enthält 10% Dimethylsulfoxid), ein Waschschritt und eine weitere 5 minütige Fixation mit Cytofix/CytopermTM Buffer zur Verstärkung der intrazellulären Färbung vervollständigten die Fixation der Zellen. Für den Nachweis des Thymidinanalogons BrdU war vor der Antikörperzugabe noch der Verdau der DNA nötig um die Freilegung der BrdU-Moleküle zu gewährleisten. Die Zellen wurden für 1h bei 37˚C mit 100µl DNAse in PBS (300µg/ml) inkubiert, gewaschen und anschließend weitere 20 Minuten mit den Antikörpern gegen BrdU bzw. fluoreszensgelabeltem Ovalbumin inkubiert. Die Zellen konnten nun in 500 µl PBS-BSA aufgenommen gemessen, oder bei 4˚C gelagert werden.

4.5 Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISPOT-Assay

4.5.1 Prinzip des ELISPOT Assays

Der Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT-Assay) bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen einer Zellsuspension, die ein spezifisches Protein sezernieren, zu detektieren. Dieses Protein kann ein Zytokin sein, oder ein Antikörper, wodurch im letzteren Fall die Bestimmung der Anzahl von Plasmablasten bzw. Plasmazellen in der eingesetzten Zellpopulation möglich wird. Eine quantitative Auswertung des sezernierten Antikörpers ist mit diesem Test jedoch nur sehr begrenzt möglich. Obwohl in der Literatur eine Nachweisgrenze bei einer ASC pro 500000 Milzzellen angegeben wird (97) ist es prinzipiell möglich, jede ASC im ELISPOT nachzuweisen, wenn das ganze Organ in die Testung einbezogen wird.

Auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs basierend, wird zunächst eine hochbindende Polystyrolplatte mit einem Antigen beschichtet. Um spätere Lichtspiegelungen bei der Detektion unter dem Mikroskop zu vermeiden, werden spezielle „flat-bottom“ Platten eingesetzt. Durch Adsorption wird das Antigen bzw. der Antikörper aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an den Plattenboden gebunden. Ist die Platte solcherart „gecoatet“ und nicht gebundenes Antigen entfernt, folgt zunächst das Abblocken freier Proteinbindungsstellen und anschließend die Überschichtung der zu untersuchenden Zellsuspension und Inkubation unter optimalen Bedingungen (37˚C mit 5 % CO_2).

Während der Inkubationszeit sezernieren die enthaltenen Plasmazellen Antikörper. Ist eine Plasmazelle spezifisch für das zum coaten verwendete Antigen, so binden deren sezernierte Antikörper im Umkreis der Plasmazelle an ihr Antigen und bilden die Grundlage für den später detektierbaren Spot. Darum ist besonders darauf zu achten, eine Erschütterung der Platten zu vermeiden, um ein Verrutschen der Zellen, und damit der Spots, zu verhindern.

Die Zellen werden durch gewissenhaftes Waschen entfernt, und Detektionsantikörper zugegeben. Dieser ist gegen die konstanten Fc-Teile der sezernierten Antikörper gerichtet und biotinyliert. Nach erneuter Inkubation und einem Waschschritt wird das an Streptavidin konjugierte homodimere Enzym alkalische Phosphatase zugegeben. Streptavidin bindet an Biotin in der nächsten Inkubationsphase, und die alkalische Phosphatase setzt das im letzten Schritt zugegebene Substrat BCIP in einem speziellen Entwicklungspuffer zu einem stabilen präzipitierenden farbigen Produkt um. Durch die gleichzeitig flüssig zugegebene, und im Verlauf der Entwicklung bei 37˚C fest werdende Agarose entsteht ein durchsichtiger Film, der die farbigen Spots fixiert. Unter einem Invertmikroskop können die Spots im Anschluss ausgezählt werden.

In dieser Studie wurde die Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Ovalbumin gewählt. Dies war in der Arbeitsgruppe bereits zuvor etabliert worden, und sowohl im Durchflusszytometer als auch im ELISPOT-Assay und im ELISA war der sichere Nachweis von Ovalbumin-spezifischen ASC oder ihrer Sekretionsprodukte möglich. Ovalbumin ist ein 65 KD großes Proteinantigen, welches in der Primärantwort zunächst die Bildung von IgM-ASC, in der Sekundärantwort fast ausschließlich IgG_1-ASC hervorruft (30, 98). Im ELISPOT wurden daher IgM-ASC nachgewiesen, wenn eine Primärantwort betrachtet werden sollte, und IgG-ASC im Falle der Sekundärantwort. Da in dieser Studie nach einer zweimaligen Immunisierung, im Gegensatz zu dem in der Arbeitsgruppe etablierten Schema, nur wenige Ovalbumin-spezifische ASC nachzuweisen waren, wurden die Tiere dreimal mit Ovalbumin immunisiert.

4.5.2 Vorgehensweise beim ELISPOT

Eine 96-well Platte wurde zunächst mit dem zu detektierenden Antigen, in der vorliegenden Arbeit Ovalbumin oder IgG und IgM, in PBS gelöst und mit einer Konzentration von 5µg/ml beschichtet (coating). Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Lösung zunächst ausgeschlagen und dann mit 3%PBS/BSA gewaschen. Mit dem gleichen Puffer wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur geblockt, anschließend mit PBS gewaschen, und im Anschluss die vorbereitete Einzelzellsuspension in komplettem Zellkulturmedium ausgesät. Um eine optimale Auszählung der Spots zu erreichen, wurde dieses in absteigender Zelldichte und Doppelansätzen durchgeführt.

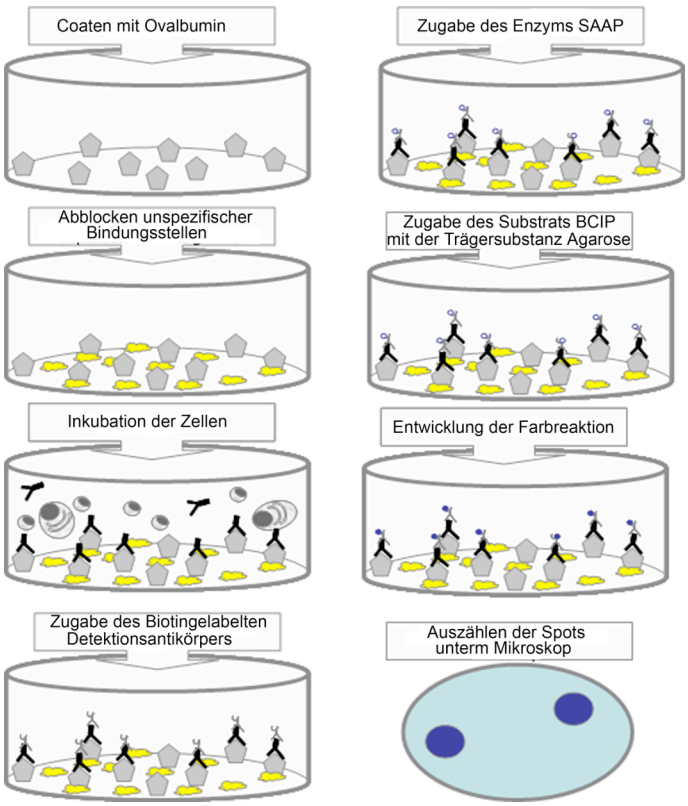

Abb. 9: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei einem ELISPOT. Beispielhaft wird hier die Detektion Ovalbumin- Antikörper sezernierender Zellen gezeigt.

Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank, danach mehrmaliges Waschen mit einem speziellen Waschpuffer (3% PBS/BSA und zugesetztes Tween, einem nichtionischen Detergenz). Daraufhin wurden die biotinmarkierten Detektionsantikörper in Waschpuffer (c=1µg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur zugegeben, erneut mehrmals gewaschen, und als nächstes an Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase in Waschpuffer für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Waschpuffer wurde in jedes Well vorsichtig Developmentpuffer pipettiert (Zusammensetzung und Herstellung im Materialteil beschrieben), entstandene Luftblasen mittels Kanüle entfernt, die Platte dann 10 min bei 4°C, und zuletzt 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um eine vollständige Entwicklung der Farbreaktion zu gewährleisten.

4.6 Quantifizierung von Immunglobulinen in Serum mittels ELISA

4.6.1 Prinzip und Durchführung des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Wie auch beim ELISPOT-Assay handelt es sich bei dem ELISA um einen quantitativen Immunoassay der ebenfalls auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert, um mit hoher Sensitivität Konzentrationen von Biomolekülen in den zu untersuchenden Lösungen zu messen. 96-well Platten wurden mit in PBS gelöstem Ovalbumin (c=5µg/ml) beschichtet und wie beim ELISPOT über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschgänge mit H_2O, eine Abblockung unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/BSA+Azid für 30 min bei 37°C und daraufhin die Inkubation der zu untersuchenden Seren, die in einer Verdünnungsreihe mit absteigenden Konzentrationen und in Doppelansätzen eingeschichtet worden waren. Zusätzlich wurde in den Experimenten ein Standart mit der bekannten Konzentration von 2µg/ml anti-Ovalbumin IgG_1 mitgeführt, so dass später die Konzentrationen der Probeseren genau berechnet werden konnten. Nach der 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die in den Überständen enthaltenen, nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit H_2O entfernt. Im nächsten Schritt wurden biotinmarkierte IgG-Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml 60 Minuten inkubiert, und im Anschluss wiederum drei mal gewaschen. Daraufhin erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase und schließlich die Zugabe des Substrates p-Nitrophenylphosphat in einer Pufferlösung. Durch die Umsetzung dieses Substrates durch die an die Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase wird das Substrat in Phosphat und p-Nitrophenol abgespalten. Das freigesetzte p-Nitrophenol ist proportional der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität und damit der Menge der Antikörper im eingesetzten Serum, und kann photometrisch gemessen werden. Im Elisa-Reader konnte anschließend bei der für das verwendete Substrat spezifischen Wellenlänge, hier 430nm, die Absorption der Platten gemessen, und mithilfe der Standartkurve die Titer der Seren berechnet werden.

4.7 Zelltransfer-Experimente

Für die Zelltransfer-Experimente wurden Einzellzellsuspensionen von Milzzellen Ovalbumin-immunisierter Mäuse hergestellt. Diese wurden mittels MACS-Zellsortierung (siehe 4.7.1) in B220+ und B220- Zellen aufgetrennt, und die B220+ Zellen in PBS auf eine Konzentration von $1{,}7 \times 10^7$ Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 200µl in die laterale

Schwanzvene eines jeden Rezipienten injiziert. 20 Minuten später erhielten die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 100µg Ovalbumin und 10µg CpG, oder 100µg NP und 10µg CpG intraperitoneal appliziert, oder wurden nicht weiter behandelt.

4.7.1 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Mit der magnetischen Zellsortierung können Zellen nach Oberflächenmolekülen getrennt werden. Zunächst ist eine Markierung der Oberflächenmoleküle, nach denen getrennt werden soll, nötig. Dafür werden Antikörper gegen diese ausgewählten Moleküle an so genannte Microbeads gekoppelt, sehr kleine supramagnetische Partikel, die nur in einem Magnetfeld magnetisch wirken, also untereinander nicht verklumpen. Die Zellen der Ausgangspopulation werden nach Inkubation mit den markierten Antikörpern durch eine mit Eisenkügelchen befüllte Säule geschickt, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. So werden alle markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten am Ende der Säule aufgefangen werden können.Für die Durchführung der magnetisch-assoziierten Zellsortierung wurden die Milzzellen in einem Verhältnis von 1:10 mit den markierten anti-B220 Antikörpern für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS/BSA und Zentrifugation wurden die Zellen in PBS/BSA resuspendiert, und über eine LS-Säule gegeben, die vorher ebenfalls mit PBS/BSA äquilibriert worden war. Zum Abschluss wurde die Säule zweimal mit je 4ml PBS/BSA gespült, um verbleibende unmarkierte Zellen aus der Säule zu entfernen. Zur Gewinnung der B220+ Zellen, die aufgrund ihrer magnetischen Markierung in der Säule verblieben waren, wurde die Säule zunächst aus dem Magnetfeld entfernt und dann zweimal mit PBS/BSA gespült. So konnten die positiv markierten Zellen in einem Zellröhrchen aufgefangen, und nach Zentrifugation mit PBS auf die gewünschte Konzentration zur Weiterverwendung aufgenommen werden.

4.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Graphen wurden mit dem Programm Prism GraphPad Software 4.03 erstellt. Die statistische Auswertung sowie die Wahl der Darstellung wurden von Frau Dörte Huscher (DRFZ) unterstützt.

Um Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von 2 Gruppen unterschiedlich behandelter Tiere treffen zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Werte als zweiseitige Analyse mit dem Programm Prism GraphPad Software 4.03 durchgeführt. Als signifikant wurden Werte mit $p<0,05$ angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Immunantwort gegen das Antigen Ovalbumin

Das aus Hühnereiweiss stammende Ovalbumin stellt ein häufig verwendetes Antigen in Immunisierungsprotokollen dar, da es eine starke Immunantwort auszulösen vermag, und etablierte Methoden zur Verfügung stehen, sowohl Ovalbumin-spezifische Plasmazellen, als auch die sezernierten Antikörper mit zellbiologischen Methoden spezifisch nachzuweisen. Aus diesem Grund sind viele Faktoren des kinetischen Ablaufs einer Primär- oder Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin aus der Literatur bekannt (32). Um Aussagen über Zellzahlen und Titerentwicklung auch nach mehrmaliger Immunisierung mit dem gleichen Antigen treffen zu können, wurde eine Primärimmunisierung mit 100µg Ova und dem Adjuvans Alum intraperitoneal an einer größeren Gruppe von Balb/c Mäusen durchgeführt. Jeweils im Abstand von drei Wochen wurden die Tiere mit 100µg Ova in PBS intraperitoneal wiederholt immunisiert. Am 5.Tag nach der jeweils letzten Immunisierung wurden die Milz und das Knochenmark von drei bis fünf Tieren untersucht.

5.1.1 Mononukleäre Zellen in Milz und Knochenmark nach mehrmaliger Ovalbumin-Immunisierung

Die Anzahl mononukleärer Zellen in Milz und den Femuren jeweils 5 Tage nach der letzten Immunisierung wurde mit dem Casy-Zellzähler bestimmt. Dies war zum einen wichtig, um die im ELISPOT erhaltenen Frequenzen später in absolute Zellzahlen umrechnen zu können, zum anderen auch um zu sehen, ob die massive wiederholte Auseinandersetzung mit demselben Antigen eine quantitative Änderung des Pools der momonukleären Zellen bewirkt. Aus Abb.10 ist ersichtlich, dass sowohl in der Milz als auch im Knochenmark die Zellzahlen konstant blieben. In der Milz schwankten die Werte um die $1x10^8$ Zellen, im Knochenmark waren erwartungsgemäß mehr Zellen nachweisbar, gefunden wurden nämlich durchschnittlich etwa $2,5x10^8$ Zellen. Wie im Methodenteil beschrieben, ist es möglich, mit dem aus den beiden Femuren erhaltenen Knochenmarkanteil das gesamte Knochenmarkvolumen zu berechnen. Die in den folgenden Abbildungen angegebenen absoluten Zahlen beziehen sich darum immer auf das gesamte Knochenmark, errechnet aus der Zellzahlbestimmung der Femuren.

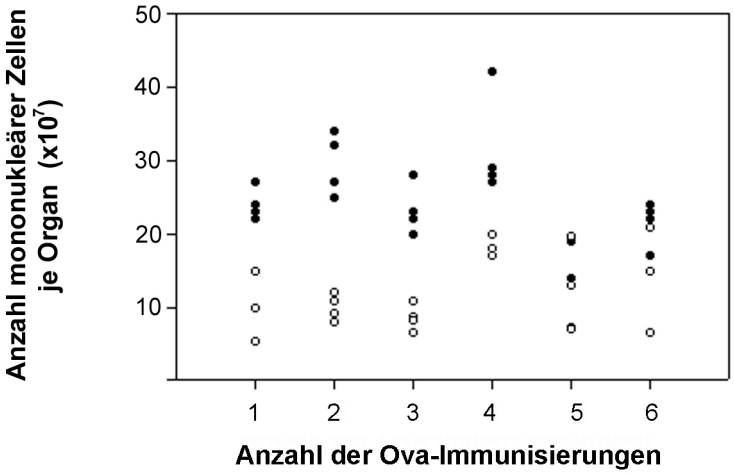

Abb. 10: Anzahl mononukleärer Zellen in Milz und Knochenmark nach wiederholter Ova-Immunisierung. Nach Primärimmunisierung mit Ova et Alum wurden im Abstand von drei Wochen wiederholte Immunisierungen mit Ova intraperitoneal durchgeführt. Fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde die Gesamtzahl der mononukleären Zellen in Milz und den Femuren durch Auszählung mit dem Casy-Zellzähler bestimmt. Mit den Daten aus 2 Femuren konnte so die Anzahl im gesamten Knochenmark errechnet werden. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen, wobei die geschlossenen Kreise (●) Messwerte aus dem Knochenmark, die offenen (○) diejenigen aus der Milz anzeigen.

5.1.2 Kinetik der Anzahl Ovalbumin-spezifischer Antigen-sezernierender Zellen (ASC) in Milz und Knochenmark

In Reaktion auf ein Antigen bildet das Immunsystem spezifisch gegen dieses Antigen gerichtete Plasmablasten, die sich im Laufe der Zeit zu Plasmazellen differenzieren. Hat das Immunsystem zum zweiten Mal Kontakt zu einem Antigen, werden 10 bis 100-mal mehr dieser Zellen generiert, wie am Beispiel des Ovalbumin-Antigens gezeigt wurde (49, 99). Für die Fragestellung dieser Arbeit war es jedoch interessant zu wissen, wie sich die Zellzahlen nach weiteren Ovalbumin-Immunisierungen entwickeln. Daher wurde an Tag 5 nach jeder Immunisierung die Milz und das Knochenmark mehrerer Tiere jeweils zum einen auf Ovalbumin-spezifische IgG ASC und zum anderen auf Ovalbumin-spezifische IgM ASC mit der ELISPOT Technik untersucht. In Abb.11 sind die Ergebnisse für Ovalbumin-bindendes IgG in Milz und Knochenmark aus der Immunisierungsreihe gezeigt. 5 Tage nach der ersten Immunisierung waren noch keine IgG ASC in Milz oder Knochenmark nachzuweisen. Erst an Tag 5 nach der zweiten Ova-Immunisierung lag der Median der Gruppe bei 678 IgG ASC in der Milz und bei 1.990 Zellen im Knochenmark. Nach der dritten und vierten Immunisierung stiegen die Werte weiter über 4.023 IgG ASC auf 12.433 IgG ASC in der Milz und im gesamten

Knochenmark über 10.925 nach der dritten und 39.000 IgG ASC nach der vierten Ova-Immunisierung. Mit dieser vierten Immunisierung hatten die Zellzahlen ein Plateau erreicht. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark erfolgte nach der fünften und sechsten Immunisierung kein signifikanter Anstieg der für Ova spezifischen ASC mehr.

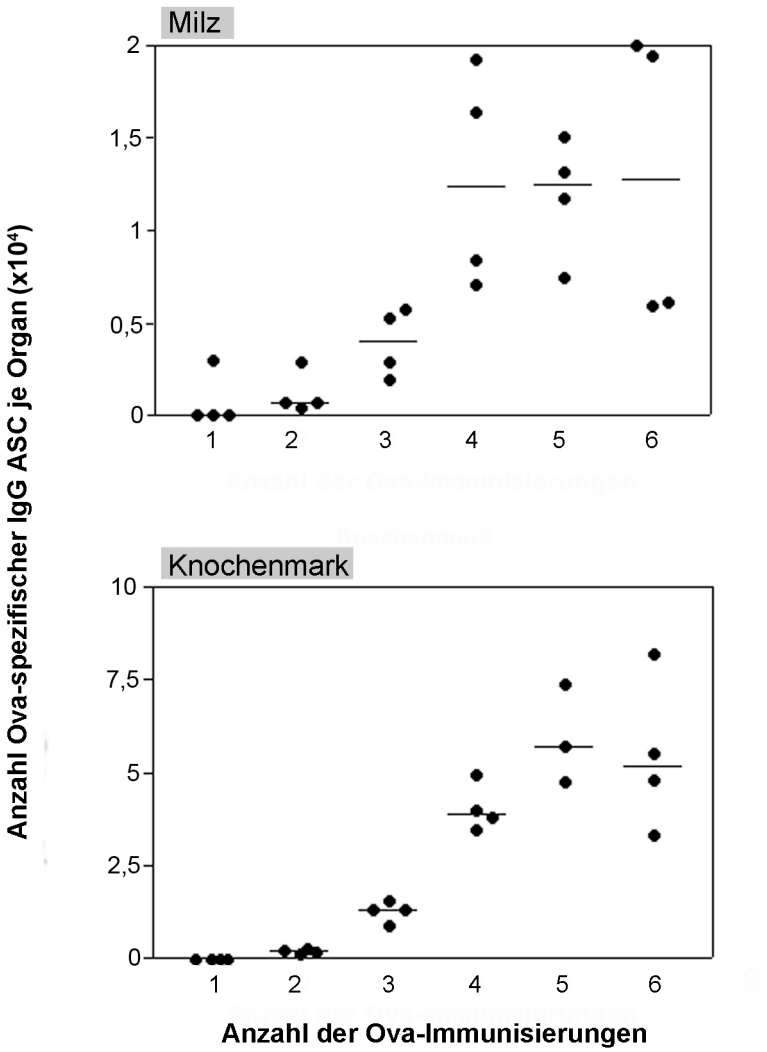

Abb. 11: Kinetik von Ovalbumin-spezifischen IgG ASC nach wiederholter Immunisierung mit Ovalbumin. Nach Primärimmunisierung mit Ovalbumin et Alum wurden im Abstand von drei Wochen wiederholte Immunisierungen mit Ova intraperitoneal durchgeführt. Fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde die Gesamtzahl der Ovalbumin spezifischen, IgG sezernierenden Zellen in Milz und Knochenmark mittels ELISPOT an einer Gruppe von drei bis fünf Mäusen ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen und die daraus errechneten Medianwerte

Anti-Ovalbumin IgM sezernierende Zellen wurden ebenfalls untersucht, hier waren insgesamt wesentlich weniger Zellen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Nach der ersten Immunisierung

waren in der Milz als Median der Gruppe aus vier Tieren 348 IgM ASC je Organ nachweisbar, dann fielen die IgM sezernierenden Zellen auf Medianwerte zwischen 155 und 165 IgM ASC ab. Im Knochenmark stiegen die Zahlen kontinuierlich von 144 IgM ASC nach der ersten auf 1000 IgM ASC je Knochenmarksorgan nach der sechsten Immunisierung an.

5.1.3 Kinetik von ASC nach wiederholter Ovalbumin-Immunisierung

Nicht nur die Anzahl von ASC, die gegen Ovalbumin gerichtete Antikörper sezernieren, sondern auch die Gesamtzahl aller, entweder IgG oder IgM sezernierenden ASC in Milz und Knochenmark nach den wiederholten Ovalbumin-Immunisierungen, ohne Rücksichtnahme auf deren Spezifität, sollte untersucht werden. Hierzu wurden die Platten im ersten Schritt des ELISPOT-Assay nicht mit Ovalbumin, sondern mit einem Pool aus IgG und IgM als Antigen gecoatet, und die Milz und das Knochenmark wie vorher beschrieben an Tag 5 nach jeder Immunisierung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.12 dargestellt. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark lagen die Anzahlen der ASC um eine Zehnerpotenz über den Ergebnissen der Ovalbumin-Antigen spezifischen ASC (Abb.7). In der Milz pendelten die Medianwerte der Gruppen 5 Tage nach jeder der 6 Immunisierungen um 154.300 (± 29.000) ASC je Organ, im Knochenmark stiegen die Medianwerte der Gruppen von 7.100 ASC nach der ersten Immunisierung über 228.000, 255.000, 382.500, 455.000 ASC nach den weiteren Immunisierungen, auf 897.500 ASC nach der sechsten Immunisierung an.

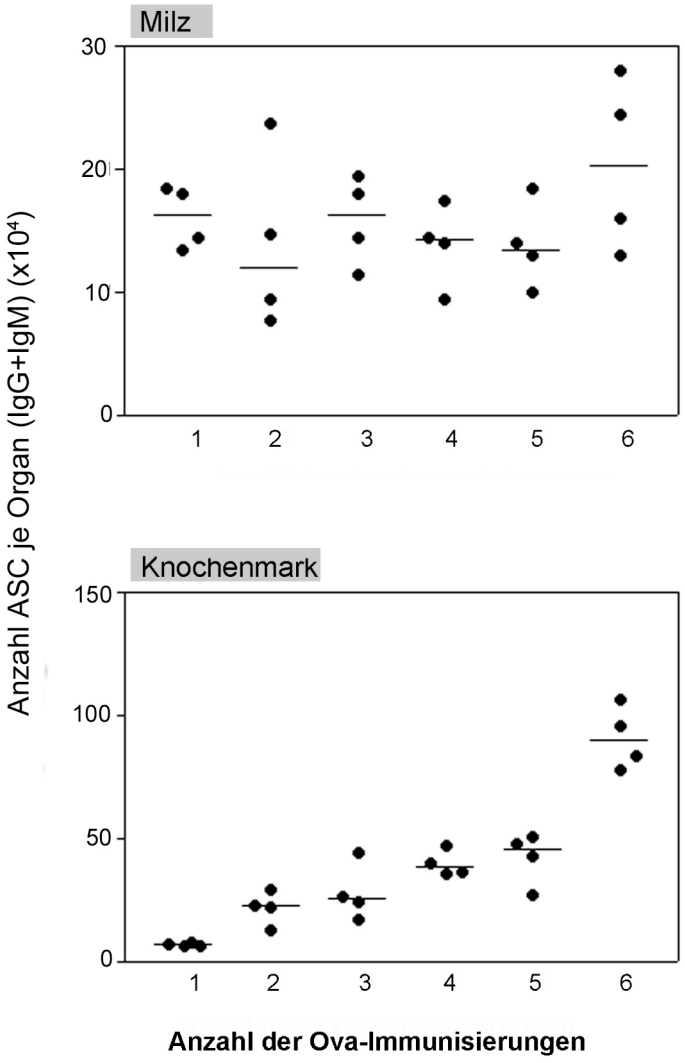

Abb. 12: Kinetik von ASC nach wiederholter Immunisierung mit Ova. Nach Primärimmunisierung mit Ova et Alum wurden im Abstand von drei Wochen wiederholte Immunisierungen mit Ova intraperitoneal durchgeführt. Fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde die Gesamtzahl von IgG und IgM sezernierenden Zellen ohne Rücksichtnahme auf deren Spezifität in Milz und Knochenmark mittels ELISPOT an einer Gruppe von drei bis fünf Mäusen je Zeitpunkt ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte von Mäusen und die daraus errechneten Medianwerte.

5.1.4 Anstieg der spezifisch gegen Ovalbumin gerichteten Antikörper im Serum im Verlauf mehrmaliger Ovalbumin-Immunisierung

Um in Korrelation zu den mittels ELISPOT erhobenen Daten über die Anzahl Ovalbumin-spezifischer ASC auch Aussagen zu den von diesen Plasmablasten/Plasmazellen produzierten Antikörpern im Serum treffen zu können, wurde jeweils 5 Tage nach jeder Immunisierung das

Serum der Mäuse gewonnen. In der Immunantwort gegen Ovalbumin werden hauptsächlich Antikörper vom Typ IgG_1 gebildet (40). Am Ende der Immunisierungsreihe konnten nun die Seren jeder Maus mittels ELISA auf Änderungen in der Menge von gegen Ovalbumin gerichtetem IgG_1 untersucht werden. In Abb.13 ist am Beispiel einer Maus der charakteristische Anstieg des Titers im Laufe von 6 durchgeführten Immunisierungen gezeigt. Durch Mitführen eines Standards mit definiertem anti-OVA IgG_1-Gehalt konnten zusätzlich absolute IgG_1 Mengen errechnet werden. Nach der ersten Immunisierung waren noch unter 2 µg/ml im Serum , der Mittelwert aller untersuchten Mäuse stieg nach der zweiten auf 160 µg/ml, nach der dritten auf 1060 µg/ml, nach der fünften auf 2260 µg/ml und nach der sechsten Immunisierung auf 2400 µg/ml anti-OVA IgG_1 im Serum an.

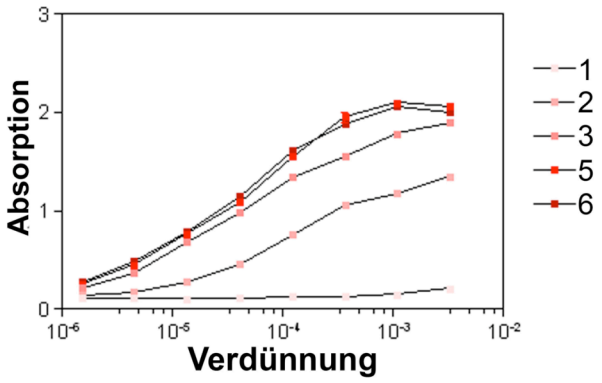

Abb. 13: Titeranstieg von gegen Ovalbumin gerichtetem IgG_1 nach wiederholter Ovalbumin-Immunisierung. Fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde das Serum der Mäuse auf anti-Ova IgG1 mittels ELISA untersucht. Zum Zeitpunkt nach der vierten Immunisierung sind keine Daten verfügbar. Dargestellt sind die Titrationskurven einer Maus nach der jeweils angegebenen Anzahl von vorhergegangenen Ovalbumin-Immunisierungen als repräsentatives Beispiel von 5 Tieren je Gruppe.

5.2 Polyklonale-/bystander-Aktivierung durch Ovalbumin-Immunisierung

Ovalbumin als Antigen verursacht im Körper eine Immunantwort, die antigenspezifische Immunzellen generiert. Als Effektorzellen der humoralen Immunität werden dabei Plasmablasten/Plasmazellen als ASC und Memoryzellen gebildet. Um die Frage zu klären, ob und in welchem Maße eine Ovalbumin-Immunisierung auch Einfluss auf die Population der ASC hat, die *nicht* Ovalbumin-spezifische Antikörper bilden, welche im Zellinneren nachzuweisen sind, wurde das in Abb. 14 schematisch dargestellte Experiment durchgeführt. Eine Gruppe von 10 Tieren wurde mit Ovalbumin grundimmunisiert. Dazu wurde jedes Tier im Abstand von drei Wochen zwei Mal mit 100µg OVA et Alum intraperitoneal immunisiert. Zwei Monate später wurden die bisher gleich behandelten Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt eine erneute Ovalbumin Boost-Immunisierung mit 100µg Ovalbumin i.v., wohingegen die andere Gruppe keine Immunisierung mehr erhielt. Gleichzeitig mit der Boost-Immunisierung der einen Gruppe wurde begonnen, beiden Gruppen über das Trinkwasser kontinuierlich BrdU zuzufüttern. Somit sollte es möglich werden, die ab diesem Zeitpunkt gebildeten Zellen im Durchflusszytometer nachzuweisen.

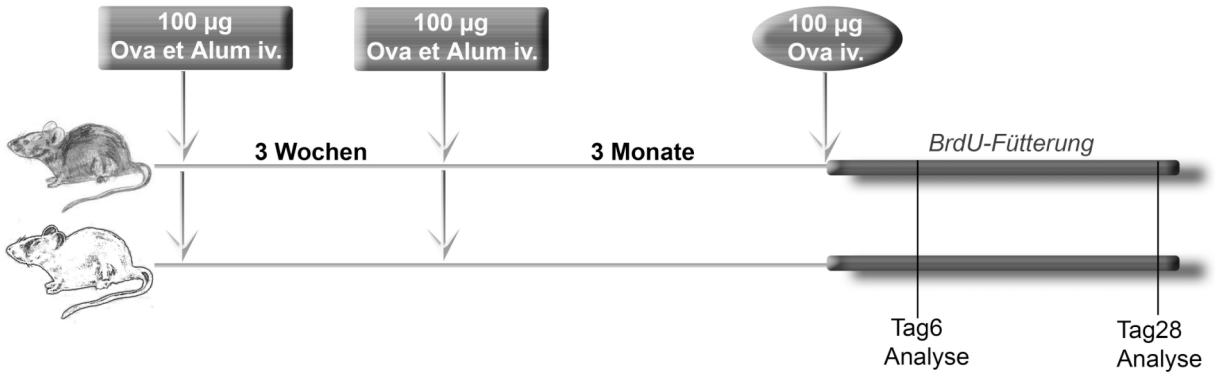

Abb. 14: Polyklonale-/bystander-Aktivierung durch Ovalbumin. Schematische Darstellung des Versuchsansatzes. Einzelheiten sind im Text erläutert.

5.2.1 Identifizierung von Plasmablasten/Plasmazellen in der Milz

Für durchflusszytometrische Analysen ist es notwendig, Marker zu finden, die eine Population mit hinreichender Sicherheit richtig identifizieren. Für ausgereifte Plasmazellen ist das Oberflächenmolekül CD138 (Syndecan) als charakterisierender Marker beschrieben (21). Syndecan-1 ist ein Proteoglykan und erkennt extrazelluläre Matrix und Wachstumsfaktoren (11).

Um sicherzustellen, dass es sich bei CD138 positiven Zellen um Plasmazellen handelt, wurden in der Vergangenheit Versuche durchgeführt, in denen CD138 postive Zellen mit einem Zell-Sorter auf ELISPOT-Platten gesortet worden waren (15), oder nach der Sortierung histologisch untersucht wurden (100). So konnten die Zellen auf die Fähigkeit überprüft werden, Antikörper zu sezernieren bzw. durch ihre histologische Morphologie als Plasmazellen identifiziert werden. Beide Autoren kommen zu dem Schluss, dass eine Identifizierung von Plasmazellen über die Expression von CD138 möglich ist, und über CD138 Expression sämtliche Plasmazellen identifiziert werden. In Abb.15 ist gezeigt, wie die Spezifität der Färbung der Plasmazellen in der Milz kontrolliert wurde. In die Analyse wurde zunächst über das Vorwärts /Seitwärtsstreulicht nur die Population kleiner, nicht granulärer Zellen eingeschlossen. Dann wurden über eine Färbung von CD138 auf der Oberfläche und intrazellulärer Ovalbuminfärbung die Plasmazellen identifiziert. Die so erkennbar gewordenen zwei Populationen stellen die für Ovalbumin spezifischen Plasmazellen dar (Ova+) und diejenigen anderer Spezifitäten (Ova-). Um weiter zu überprüfen, ob es sich bei diesen Zellen um Plasmazellen handelt, wurden die beiden gekennzeichneten Populationen auf die Expression von Leichtketten vom Typ Kappa untersucht. Indem der Kappa-Antikörper vor Permeabilisierung der Zellen mit Saponin zugegeben wurde, konnten die Immunglobuline auf der Oberfläche der Zellen selektiv markiert werden. Wurde der Antikörper nach dem Permeabilisierungsschritt zugefügt, war eine intrazelluläre Färbung möglich.

Die Population Ovalbumin-positiver Plasmazellen (linke Histogramme) zeigt in 92% keine Expression von Kappa-Leichtketten an der Oberfläche, wie es für die Morphologie reifer Plasmazellen gefordert wird (31), jedoch lässt sich in 99% der Zellen Kappa intrazellulär nachweisen, als Ausdruck der massiven Antikörperproduktion im ER der Zelle. In der Population der Ovalbumin-negativen Plasmazellen (rechte Histogramme) exprimierten 92% der Zellen Kappa in der Zelle. Durch die oberflächliche Kappafärbung wurde deutlich, dass diese Population 63% Zellen enthält, die keine Kappa-Leichtketten exprimiert und 47%, die auch auf ihrer Oberfläche positiv für Kappa sind. Dies kann zum einen darauf hinweisen, dass es sich bei dieser Population um Plasmablasten/Plasmazellen in unterschiedlichen Reifestadien handelt, oder um Plasmazellen, welche auch im ausgereiften Zustand IgG_1 auf ihrer Oberfläche tragen (15). Durch die Kombination der Marker war es somit möglich, Plasmazellen in der Milz zu identifizieren, und die Ovalbumin-spezifischen von denjenigen anderer Spezifitäten abzugrenzen.

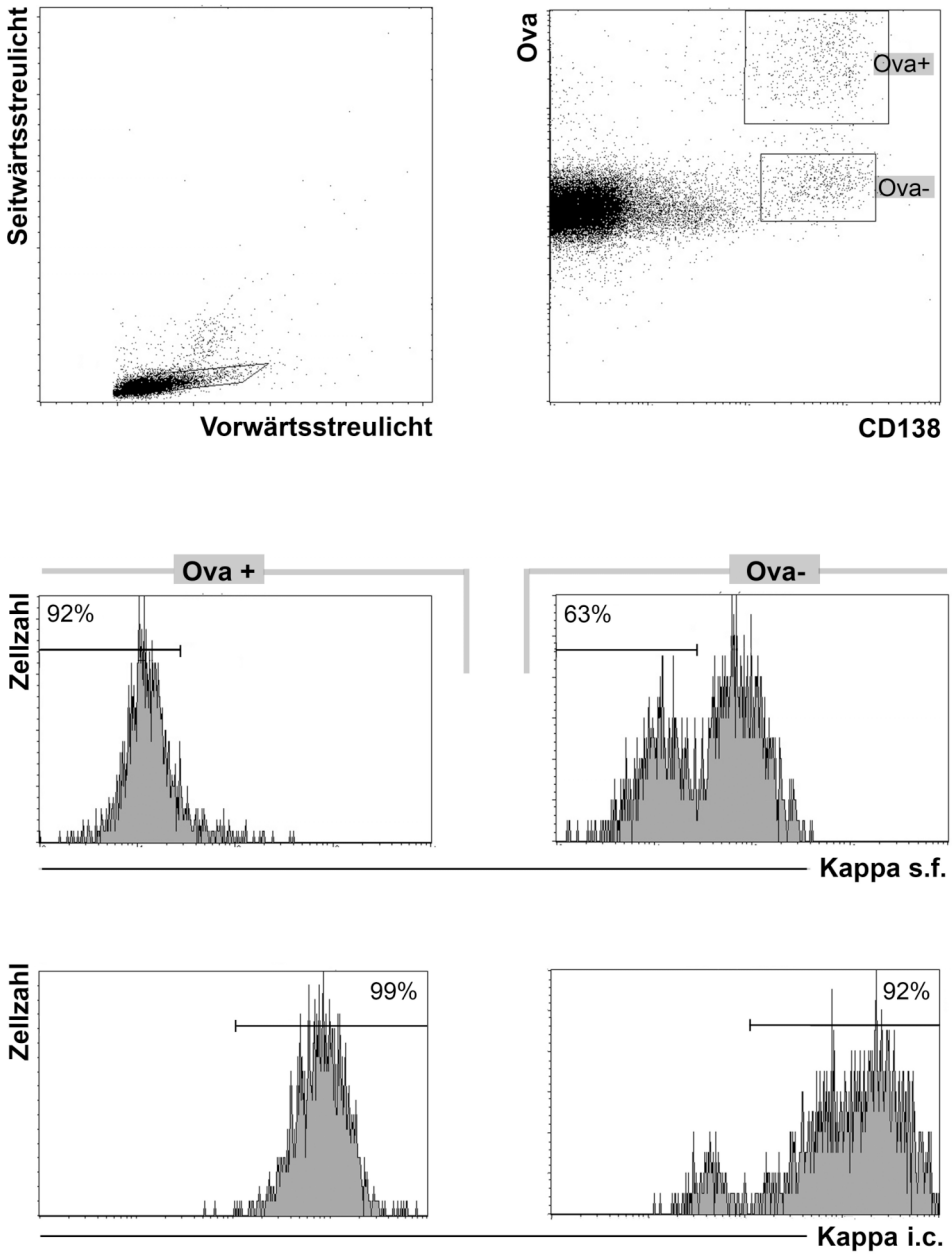

Abb. 15: Identifizierung von Ovalbumin-Antigen spezifischen und unspezifischen ASC in der Milz. 6 Tage nach Immunisierung mit Ovalbumin wurde zunächst die Lymphozytenpopulation über das Vorwärts/Seitwärtsstreulicht definiert (oben links). Durch oberflächliche CD138 Färbung und intrazelluläre Ovalbuminfärbung konnten ACS, die für Ovalbumin spezifisch sind, von ASC anderer Spezifitäten unterschieden werden (oben rechts). Zur weiteren Charakterisierung wurden die gezeigten Populationen der Ovalbumin-bindenden (Ova+) und nicht-bindenden (Ova-) Plasmazellen auf intrazelluläre oder oberflächliche Expression von Leichtketten vom Typ Kappa untersucht (Mitte und unten).

5.2.2 Identifizierung von Plasmablasten/Plasmazellen im Knochenmark

Analog zum spezifischen Nachweis von Plasmazellen bzw. deren Vorstufe der Plasmablasten in der Milz sollte auch im Knochenmark eine Kombination von Markern gefunden werden um diese Zellen eindeutig zu identifizieren. Da die alleinige CD138 Färbung zusammen mit Ovalbumin im Knochenmark nicht zu einer sicher abgrenzbaren Population CD138 positiver Zellen führte, musste ein weiterer Marker in jeder Färbung eingeführt werden (siehe Abb.16). Hierfür bot sich eine Färbung der in den Plasmazellen vorhandenen Antikörperbestandteile Kappa-Leichtketten an (Abb 16A). Als Kontrollen für die Ovalbuminfärbung wurden die Zellen einer Maus, die zuvor nicht mit Ovalbumin immunisiert worden war, durchflusszytometrisch untersucht. Wie zu erwarten fanden sich in dieser Maus keine Ovalbumin-positiven Plasmazellen (Abb.16B). Die Unterschiede nach Ovalbumin-Grundimmunisierung und Ovalbumin-Boost sind in Abb.16C verdeutlicht.

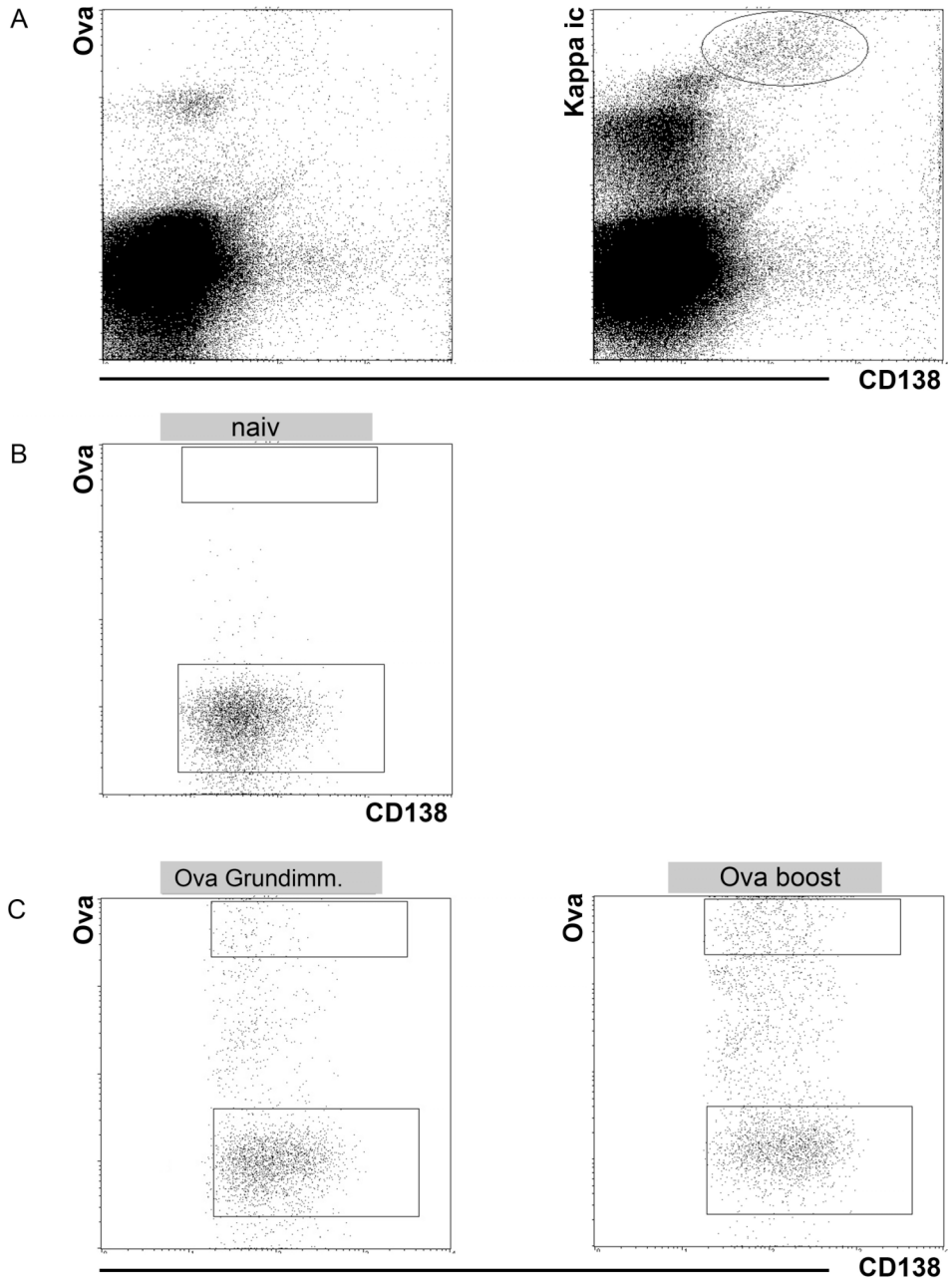

Abb. 16: Identifizierung von Ovalbumin-Antigen spezifischen und unspezifischen ASC im Knochenmark. 28 Tage nach Immunisierung mit Ovalbumin wurde analog zur Milz die Lymphozytenpopulation über das Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht definiert (nicht gezeigt). (A) Da eine Abgrenzung der Populationen nur durch die CD138 Expression zusammen mit Ovalbumin nicht eindeutig möglich war (oben links), wurde jede Zelle zusätzlich zur Expression von CD138 durch intrazelluläre Leichtketten vom Typ Kappa definiert (oben rechts). (B) In einer Maus, die zuvor nicht mit Ovalbumin immunisiert worden war, waren keine Ovalbumin-spezifischen ASC im Knochenmark nachzuweisen. (C) 16 Wochen nach Grundimmunisierung waren nur noch wenige Ovalbumin-spezifischen ASC nachzuweisen (unten links), 8 Wochen nach Ovalbumin-Boost ist eine Population Ovalbumin-spezifischer ASC im Knochenmark nachzuweisen (unten rechts).

5.2.3 Einfluss einer Ovalbumin-Immunisierung auf Plasmazellen in der Milz

Mit dem unter 5.2 beschriebenen und in Abb. 14 schematisch dargestellten Experiment sollte ein möglicher Einfluss einer Ovalbumin-Immunisierung auf Plasmazellen in der Milz untersucht werden. Wenn durch Immunisierung mit einem Antigen nicht nur ASC entstehen, die spezifisch für dieses Antigen sind, sondern auch polyklonal-/bystander-aktivierte ASC generiert werden, so sollten diese in der Population der Ovalbumin-negativen Plasmazellen nach der Immunisierung zu finden sein. Ausser den ASC, die spezifisch gegen Ovalbumin gerichtete Antikörper sezernieren, sind in dieser Gruppe alle ASC der anderen Spezifitäten vereint und Änderungen in der Zahl oder Zusammensetzung des Pools aller Ovalbumin-negativen ASC nach Ovalbumin-Immunisierung sollten hier nachzuweisen sein. Durch Beginn der BrdU-Fütterung am Tag der Ovalbumin-Boosterimmunisierung war es zusätzlich möglich, Zellen, die ab diesem Zeitpunkt neu gebildet worden waren, von vorher schon existierenden Zellen zu unterscheiden.

Das Oberflächenmolekül MHCII wird bei Aktivierung einer B-Zelle aufreguliert, und bleibt bis zu deren Differenzierung zum Plasmablasten exprimiert. Erst mit der endgültigen Reifung zur Plasmazelle verliert die Zelle MHCII auf ihrer Oberfläche (30). Aufgrund dieser Beobachtung wurden die ASC auch auf das Expressionsniveau von MHCII hin untersucht, um Aussagen über deren Reifegrad treffen zu können.

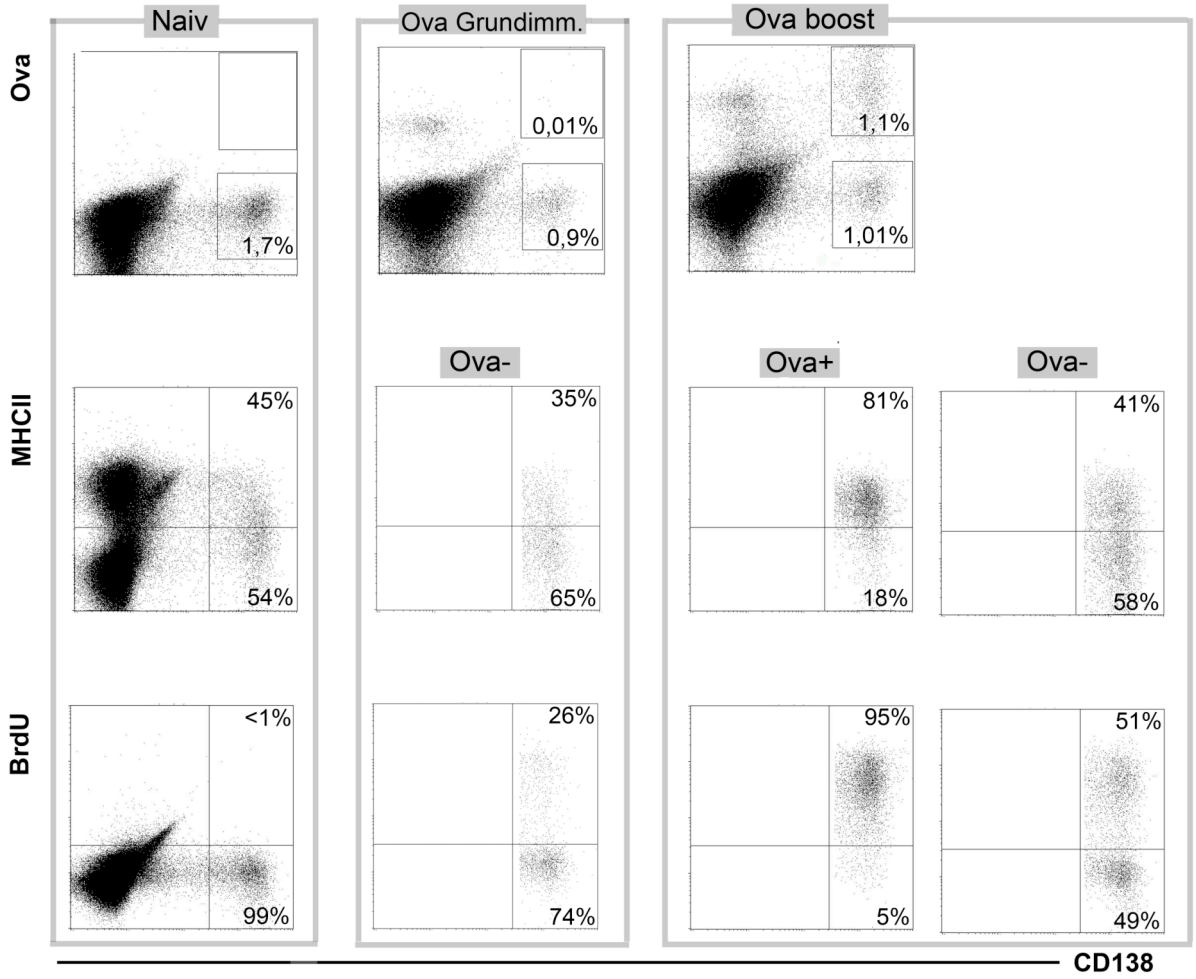

Abb. 17: Polyklonale-/bystander-Aktivierung nach Ovalbumin-Immunisierung in der Milz. Eine Gruppe der Balb/c Mäuse wurde mit Ovalbumin grundimmunisiert, die andere Gruppe erhielt zudem eine Booster-Immunisierung. Vom Tag der Boosterimmunisierung an wurde beiden Gruppen kontinuierlich BrdU per os zugeführt. Gezeigt sind die durchflusszytometrischen Färbungen von ASC in der Milz und Ihrer Expression von MHCII bzw. Aufnahme von BrdU beispielhaft an je einer von 5 untersuchten Mäusen je Gruppe. Als Kontrolle für die Spezifität von Ovalbumin und BrdU diente die Analyse einer für Ovalbumin naiven und nicht BrdU-gefütterten Maus. Je Probe wurde eine Million Zellen analysiert.

In der Abb.17 sind exemplarische Dot-Plots für die untersuchten Marker aus den beiden Gruppen und als Kontrolle von einer für Ovalbumin naiven und nicht BrdU gefütterten Maus gezeigt. Die naive Maus wies keinerlei für Ovalbumin spezifische ASC in der Milz auf, ebenfalls gab es keine mit anti-BrdU Antikörper anfärbbaren Zellen.

Mehr als 2 Monate nach der Ovalbumin Grundimmunisierung (Abb.17, mittlere Spalte) waren nur sehr wenige Ovalbumin-spezifische ASC in der Milz zurückgeblieben. In der Gruppe, die 6 Tage zuvor eine Boostimmunisierung erhalten hatte (rechte Spalte), war die Frequenz der

Ovalbumin-ASC rapide angestiegen auf 1,1% der Lymphozyten in der Milz. Ca. 1% der Lymphozyten waren Ovalbumin-negative ASC, wie auch schon vorher in der Literatur beschrieben (41). Im Falle der für Ovalbumin naiven Maus fiel die hohe Frequenz Ovalbumin-negativer ASC auf. Obwohl die Mäuse alle unter spf-Bedingungen gehalten wurden, kommen die Tiere dennoch über Futter und das Personal mit Antigenen in Kontakt, so dass Immunreaktionen ablaufen, die zu ASC in der Milz führen. Dass die Anzahlen von Effektor-B-Zellen in der Milz von Tieren aus spf-Bedingungen ähnlich denen in der Milz von Tieren aus konventioneller Haltung sind, ist in der Literatur beschrieben (101).

Für MHCII waren 2 Populationen auszumachen, deren Frequenzen sich je nach Immunisierungszustand änderten. 6 Tage nach der Immunisierung waren die Ovalbumin-positiven ASC zu 80% MHCII positiv (rechte Spalte). Kurz vorher entstanden, sind die ASC noch nicht vollständig ausgereift und im Stadium der Plasmablasten, was erklärt, warum innerhalb der Ovalbumin-negativen Plasmazellen der Anteil der MHCII positiven Zellen wesentlich geringer ist, nämlich nur noch weniger als die Hälfte. An der Inkorporation von BrdU liess sich feststellen, welche Zellen seit den 6 Tagen vor der Analyse neu entstanden waren. Die Ovalbumin-spezifischen Zellen der geboosteten Gruppe hatte zu 95% BrdU inkorporiert. Da davon auszugehen ist, dass diese Zellen, bis auf den geringen Anteil der Ovalbumin-spezifischen Zellen, die vermutlich noch aus der Grundimmunisierung vorhanden waren, alle innerhalb der letzten 6 Tage entstanden waren, kann auf eine hocheffiziente BrdU-Inkorporation geschlossen werden. Im Vergleich der Ovalbumin-negativen ASC der beiden Gruppen an diesem Beispiel ist zu sehen, dass die Frequenz neu gebildeter, BrdU+ Zellen durch die Ovalbumin-Immunisierung von 26% auf 51% angestiegen ist. Dies liefert einen Hinweis auf ASC, die seit der Boosterimmunisierung durch stattgefundene polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden sind.

5.2.4 Anzahl *nicht* Ovalbumin-spezifischer ASC nach Ovalbumin-Immunisierung in Milz und Knochenmark

An den Tagen 5, 6 und 28 wurden jeweils 3 bis 5 Mäuse je Gruppe, wie unter 5.2.3 dargestellt, durchflusszytometrisch untersucht. Aufgrund der sehr niedrigen Frequenz der zu untersuchenden ASC (im Bereich 1% aller Lymphozyten) war davon auszugehen, dass sich eine Änderung in der Anzahl der ASC zwischen den beiden Gruppen in noch niedrigeren Frequenzbereichen abzeichnen würde. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurden als Ergebnisse immer die absoluten Zellzahlen angegeben.

Das Ziel des Experiments war es, nachzuweisen, ob und in welchem Masse polyklonale-/bystander-Aktivierung im Rahmen einer Immunantwort auf Ovalbumin dazu fähig ist, einen nachweisbaren Anstieg in der Anzahl der *nicht* für Ovalbumin spezifischen ASC in Milz oder Knochenmark auszulösen. In Abb.18 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse an Tag 6 und 28 dargestellt. Die an Tag 5 erhaltenen Werte zeigen die gleiche Tendenz wie diejenigen von Tag 6 und sind deshalb hier nicht gezeigt.

Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark an Tag 6 und 28 waren in diesem Experiment keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl der Ovalbumin-negativen ASC feststellbar. Der Mittelwert der Gruppe ohne Immunisierung (offene Symbole,○) betrug an Tag 6 in der Milz $5{,}6x10^5$ ($\pm$ $2{,}1x10^5$) und derjenige der Gruppe mit Boosterimmunisierung (geschlossene Symbole, ●) $6x10^5$ ($\pm$ $2{,}0x10^5$). Im Knochenmark zum selben Zeitpunkt waren es im Mittel $13{,}1x10^5$($\pm$ $4{,}6x10^5$) Zellen ohne, und $10x10^5$($\pm$ $2{,}9x10^5$) mit Immunisierung. Die Mittelwerte an Tag 28 betrugen $2{,}0x10^5$ ($\pm$ $0{,}9x10^5$) vs. $2{,}3x10^5$ ($\pm$ $0{,}8x10^5$) in der Milz und $5{,}9x10^5$ ($\pm$ $1{,}3x10^5$) vs. $5{,}0x10^5$ ($\pm$ $0{,}5x10^5$) im Knochenmark.

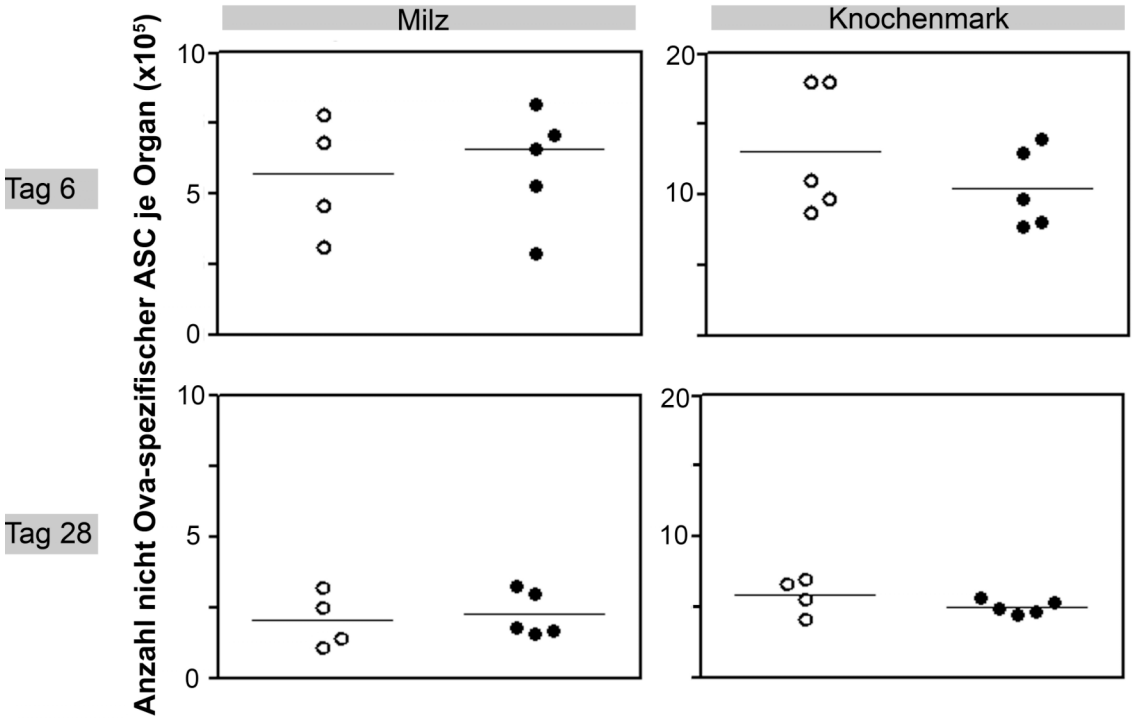

Abb. 18: Anzahl *nicht* Ovalbumin-spezifischer ASC nach Ovalbumin-Immunisierung in der Milz und im Knochenmark. An Tag 6 und 28 nach Ovalbumin-Immunisierung (geschlossene Symbole, ●) wurde die Anzahl von nicht Ovalbumin-spezifischen ASC mittels Durchflusszytometer bestimmt und verglichen mit der Gruppe, die keine Boosterimmunisierung erhalten hatte (offene Symbole, ○). Die in der durchflusszytometrischen Messung erhaltenen Frequenzen wurden auf die gesamte Zellzahl des jeweiligen Organs bezogen, in absolute Zellzahlen umgerechnet. Jedes Symbol steht für das Messergebnis eines Tieres, der Strich kennzeichnet den Mittelwert der jeweiligen Gruppe.

5.2.5 Weiterführende Analyse der Ovalbumin-negativen ASC in der Milz nach Ovalbumin-Immunisierung

Obwohl in der Gesamtzahl der Ovalbumin-negativen ASC sowohl in der Milz als auch im Knochenmark kein Unterschied zwischen geboosteten und nicht geboosteten Tieren festgestellt werden konnte, sollte eine mögliche Änderung des Phänotyps innerhalb der Population dieser Zellen untersucht werden. Die MHCII- Färbung machte eine Aussage über den Reifezustand der ASC, die BrdU-Inkorporation über deren Entstehungszeitraum möglich. Eine valide Färbung aller nötigen Marker im Knochenmark liess sich nicht etablieren, weswegen hier nur Ergebnisse aus der Milz gezeigt werden können (Abb.19).

Tatsächlich konnte an Tag 6 eine signifikante Änderung festgestellt werden. Durch den Ovalbumin-boost waren die MHCII-positiven, aber Ovalbumin-negativen Plasmablasten von 1,4

$x10^5$ (± 0,3 $x10^5$) auf 2,6 $x10^5$ (± 0,5 $x10^5$) angestiegen. Ebenso waren mehr Zellen nachzuweisen, welche BrdU inkorporiert hatten. Diese waren durch den Boost von 1,0 $x10^5$ (± 0,3 $x10^5$) auf 2,3 $x10^5$ (± 0,8 $x10^5$) angestiegen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die Ovalbumin-Immunisierung durchaus zu einer Aktivierung von Ovalbumin-negativen Zellen gekommen war. An Tag 6 sind mehr unreife Plasmablasten in der Milz und seit der Immunisierung haben sich mehrere Plasmablasten geteilt. Warum sich diese Aktivierung nicht im den absoluten Zahlen der Ovalbumin-negativen ASC zeigt, kann zum einen daran liegen, dass in Anbetracht der Streubreite der Werte innerhalb der Gruppen, der Effekt in jeder einzelnen Milz zu gering ausgeprägt ist um einen Anstieg deutlich zu machen. Zum anderen ist sowohl bei den MHCII-, als auch bei den BrdU- negativen Zellen eine Tendenz zur Verminderung durch den Ovalbumin-boost zu sehen. Es könnte also sein, dass die neu entstandenen ASC in der Milz reife Plasmazellen verdrängen und somit die gesamte Anzahl der ASC konstant bleibt.

An Tag28 ist keinerlei Unterschied zwischen den Gruppen mehr feststellbar. Dies gilt sowohl für BrdU als auch MHCII, die Daten für MHCII sind hier nicht gezeigt (Abb.19).

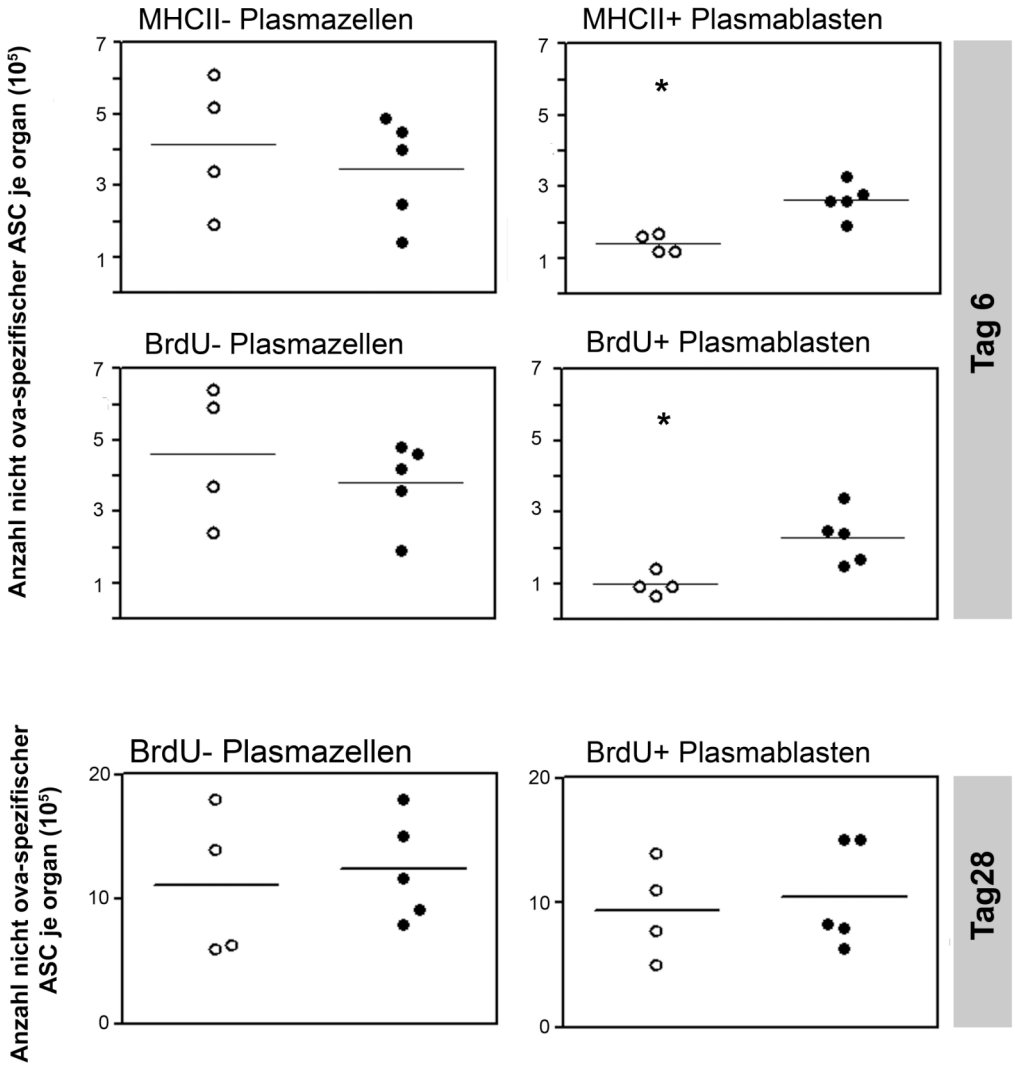

Abb. 19: Untersuchung der oberflächlichen MHCII Expression und Inkorporation von BrdU in nicht Ovalbumin-spezifischen ASC nach Ovalbumin-Immunisierung in der Milz. An Tag 6 und 28 nach Ovalbumin-Immunisierung (schwarze Symbole,●) wurde die Expression des Oberflächenmoleküls MHCII auf nicht Ovalbumin-spezifischen ASC mittels Durchflusszytometer bestimmt (vgl. Abb. 13) und verglichen mit der Gruppe, die keine Boosterimmunisierung erhalten hatte (weiße Symbole,○). Die in der durchflusszytometrischen Messung erhaltenen Frequenzen wurden auf die gesamte Zellzahl des jeweiligen Organs bezogen, in absolute Zellzahlen umgerechnet. Jeder Punkt steht für das Messergebnis eines Tieres, der Strich kennzeichnet den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Die Sterne kennzeichnen im Mann-Whitney-Test errechnete signifikante Unterschiede mit $p<0,05$.

Durch die oben beschriebenen Analysen war deutlich geworden, dass eine Immunisierung mit Ovalbumin eine polyklonale-/bystander-Aktivierung auszulösen vermag, auch wenn sich diese Aktivierung nicht in einer nachweisbaren Vergrösserung der Population Ovalbumin-negativer ASC niederschlägt.

Um weitere Aussagen über den möglichen Beitrag einer solchen Aktivierung auf einen Langzeitantikörpertiter treffen zu können, war es nötig, die Zellen weiter morphologisch zu beschreiben. Hierdurch sollte es möglich werden, herauszufinden, ob die unspezifisch aktivierten Zellen weitere phänotypischen Unterschiede zu den spezifisch Aktivierten aufweisen.
Das Oberflächenmolekül CD22 ist einer der inhibitorischen Co-Rezeptoren für den BCR. Nach Phosphorylierung eines Teils des Rezeptors wird durch verminderte Ca^{2+}-Mobilisierung in der Zelle die Schwelle für BCR-vermittelte Aktivierung der Zelle erhöht und so eine Überstimulation von B-Zellen verhindert (102). Außerdem bindet CD22 an bestimmte Zucker des Sinusendothels im Knochenmark und ist dadurch wahrscheinlich für das Knochenmarkhoming von B-Zellen mitverantwortlich (103).
An Tag 6 nach Ovalbumin-Immunisierung in der Milz waren 98% der Ovalbumin-spezifischen ASC CD22 negativ (Abb.20), in Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Verlust des CD22 nach Aktivierung (104). Die Population der Ovalbumin-*negativen* ASC bestand aus Zellen, die CD22 nicht exprimieren und Zellen, die CD22 in starker Ausprägung auf ihrer Oberfläche tragen. In einem Vergleich der beiden Gruppen (Vgl. Versuchsschema in Abb.14) wurde deutlich, dass bei den Tieren, welche den Ovalbumin Boost erhalten hatten, innerhalb der Ovalbumin-negativen ASC in der Milz signifikant mehr ASC Zellen CD22 exprimierten als in der Gruppe ohne Ovalbumin Boost (Abb.20).

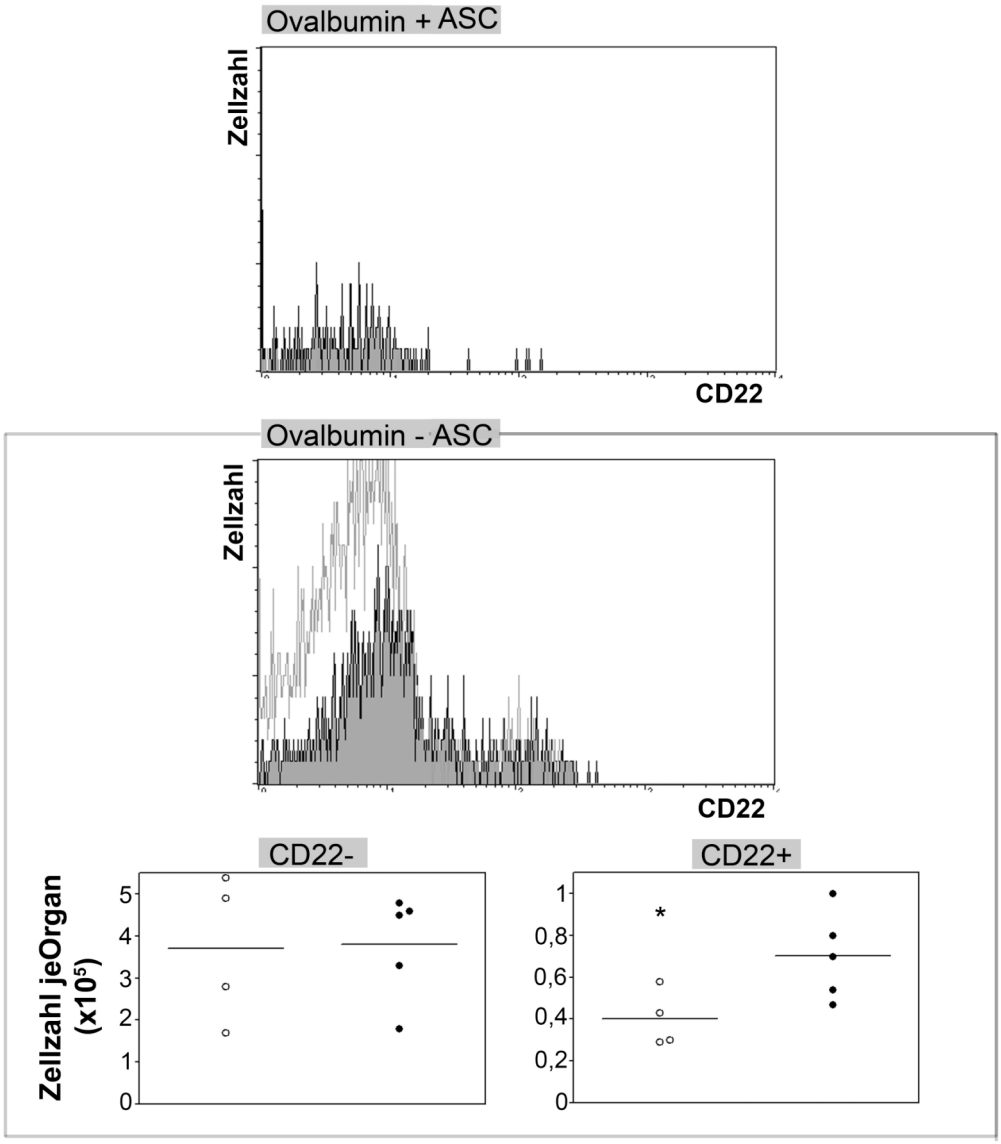

Abb. 20: Expression von CD22 auf Ovalbumin spezifischen und unspezifischen ASC an Tag 6 nach Ovalbumin-Immunisierung in der Milz. In den Histogrammen (oben) ist ein Beispiel für die CD22 Expression auf Ovalbumin-spezifischen bzw. -unspezifischen ASC an Tag 6 nach Booster-Immunisierung (graue Fläche) und ohne Boosterimmunisierung (graue Linie) dargestellt. Unten sind die erhaltenen Messwerte der Ovalbumin-negativen ASC aus den durchflusszytometrischen Messungen mit jeweils 1 Million erfassten Ereignissen aufgetragen. Die weißen Symbole (○) stehen für die Ergebnisse der Tiere ohne, die schwarzen Punkte (●) für diejenigen mit Boosterimmunisierung. Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Mann-Whitney-U-Test mit $p<0,05$.

5.3 Einfluss einer NP/CpG-Immunisierung auf Ovalbumin-spezifische B-Zellen

In den vorhergehenden Experimenten wurde der Einfluss von polyklonalen-/bystander- Stimuli auf den gesamten Pool ASC untersucht. Wie aber verhalten sich die ASC, die zirkulierenden Antikörper und die Memoryzellen einer bestimmten Spezifität nach Kontakt des Immunsystems mit polyklonalen-/bystander-Stimuli? NP, konjugiert an KLH, induziert eine T-Zell abhängige Immunantwort und müsste somit in der Lage sein, Bystander-Aktivierung auszulösen. CpG, als Bestandteil bakterieller DNA, stimuliert via TLR9 B-Zellen polyklonal. Mit diesen beiden Antigenen als Auslöser polyklonaler-/bystander-Aktivierung und dem nachfolgend beschriebenen Immunisierungsschema sollten für Ovalbumin-spezifische B-Zellen die gestellten Fragen beantwortet werden (Abb.21).

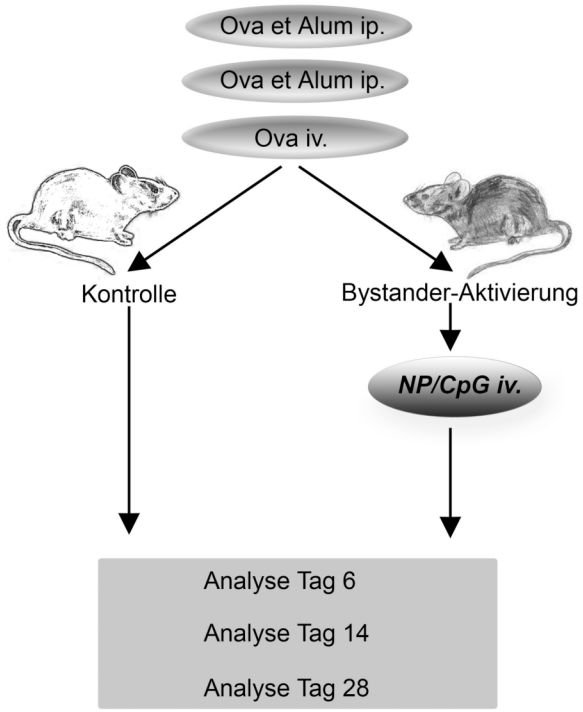

Abb. 21: Versuchsansatz zur Ermittlung des Einflusses einer NP/CpG-Immunisierung auf Ovalbumin-spezifische B-Zellen. Einzelheiten sind im Text erläutert

Zur Generierung von Ovalbumin-spezifischen ASC, Antikörpern gegen Ovalbumin im Serum, und Ovalbumin-Gedächtnis B-Zellen wurden zunächst mehrere Tiere zwei Mal im Abstand von 3 Wochen mit 100µg Ovalbumin und Alum intraperitoneal grundimmunisiert, und 3 Wochen später mit 75µg Ovalbumin i.v. geboostet. 14 Tage später wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt, und jedem Tier Serum entnommen. Eine Gruppe erhielt eine Mischung aus 100µg NP-KLH und 10µg CpG als polyklonalen-/bystander-Stimulus in eine laterale Schwanzvene injiziert, während die andere Gruppe als Kontrolle unbehandelt blieb. 6, 14 und 28 Tage nach diesem Stimulus wurde das Serum der Tiere untersucht,

und die beiden Organe Knochenmark und Milz von jeweils 5-7 Tieren je Gruppe mit einem ELISPOT-Assay und durchflusszytometrischen Analysen begutachtet.

5.3.1 Änderung der Anzahl von Ovalbumin-spezifischen ASC durch polyklonale-/bystander-Aktivierung

Die Anzahl der Zellen, die Ovalbumin-spezifische Antikörper sezernieren, wurde 6, 14 und 28 Tage nach dem unspezifischen Stimulus in Milz und Knochenmark bestimmt. Aus Abb.22 ist ersichtlich, wie viele IgG- und wie viele IgM-sezernierenden Zellen in den beiden Gruppen zu den angegebenen Zeitpunkten vorhanden waren. An Tag 6 war die Gesamtzahl der Zellen je Milz, die Ovalbumin-spezifische IgGs sezernieren, durch den unspezifischen Stimulus signifikant angestiegen. In der Kontrollgruppe waren im Mittel 443 (±265) solcher Zellen in der Milz vorhanden, durch die NP/CpG Immunisierung waren es mehr als doppelt so viele, nämlich im Mittel 971 (±370) je Organ. An den Daten der späteren Zeitpunkte wird aber auch deutlich, dass es sich bei dem beobachteten Anstieg um ein zeitlich auf wenige Tage beschränktes Phänomen handelt: Schon 8 Tage später, an Tag 14, waren keine Unterschiede mehr nachweisbar, ebenso wenig an Tag 28. Auch im Knochenmark war kein signifikanter Anstieg von Ovalbumin-spezifischen ASC durch den unspezifischen Stimulus zu erkennen. ASC, die Ovalbumin-spezifisches IgM sezernieren, wurden in insgesamt niedrigeren Zahlen gefunden. Diese erklären sich aus der Beobachtung, dass in einer Sekundärantwort auf Ovalbumin >90% der Plasmazellen vom Subtyp IgG_1 sind (30). Eine Vermehrung durch die NP/CpG-Immunisierung schien nicht stattgefunden zu haben.

Aus diesen Daten lässt sich vermuten, dass der Anstieg Ovalbumin-spezifischer ASC nach polyklonaler-/bystander-Aktivierung ein lokal auf die Milz beschränktes, kurzfristiges Phänomen der ASC vom Subtyp IgG ist, welches die Anzahlen der ASC im Knochenmark nicht beeinflusst.

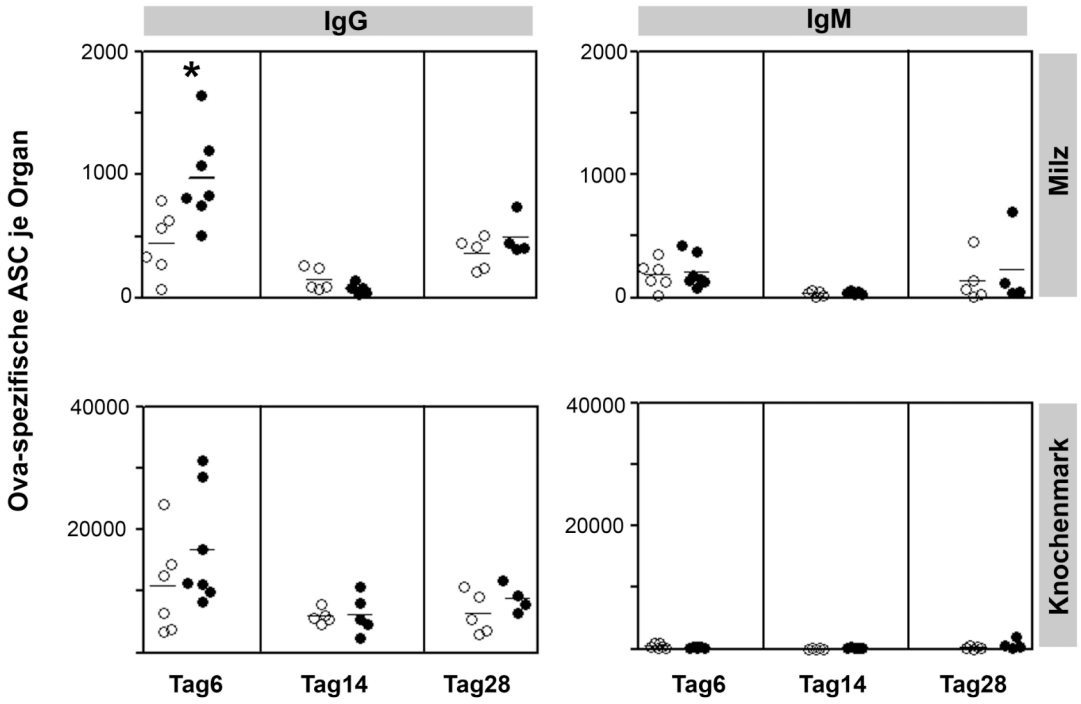

Abb. 22: Einfluss einer Immunisierung mit NP und CpG auf Ovalbumin-spezifische ASC in Milz und Knochenmark. Einzelheiten zur Versuchsdurchführung sind im Text und der Abb.16 erläutert. Dargestellt sind die durch ELISPOT ermittelten Zellzahlen und die Mittelwerte jeder Gruppe, wobei jeder Punkt die Messdaten einer Maus repräsentiert. Schwarze Symbole (●)stehen für Mäuse der Gruppe mit NP/CpG-Immunisierung, die weißen Symbole (○) für diejenigen ohne. Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ im Mann-Whitney-U-Test.

5.3.2 Titerverlauf der gegen Ovalbumin gerichteten Antikörper nach NP/CpG-Immunisierung

Im nächsten Schritt wurden die Seren der Tiere im Vergleich der beiden Gruppen auf ihren Gehalt an IgG_1 Antikörper gegen Ovalbumin untersucht. In Abb.23 sind die Mittelwerte von jeweils 5 Tieren pro Gruppe in ihrem zeitlichen Verlauf aufgetragen. Mit „prä“ bezeichnet ist der Ovalbumin-IgG_1 Gehalt, der nach der Ovalbumin-Grundimmunisierung, aber unmittelbar vor der Immunisierung mit NP/CpG im Serum der beiden Gruppen vorhanden war. In den Tagen danach fiel der Antikörpertiter langsam ab. Es ist erkennbar, dass dieser Abfall beide Gruppen in gleichem Masse betraf, und selbst 6 Wochen nach der Ovalbumin Boost-Immunisierung die Plateauphase im Antikörperrückgang noch nicht erreicht zu sein schien. Obwohl durch die NP/CpG-Immunisierung in der Milz Ovalbumin-spezifische ASC entstanden waren, kam es nicht zu einer im ELISA nachweisbaren Änderung des Gehalts an Ovalbumin-IgG_1.

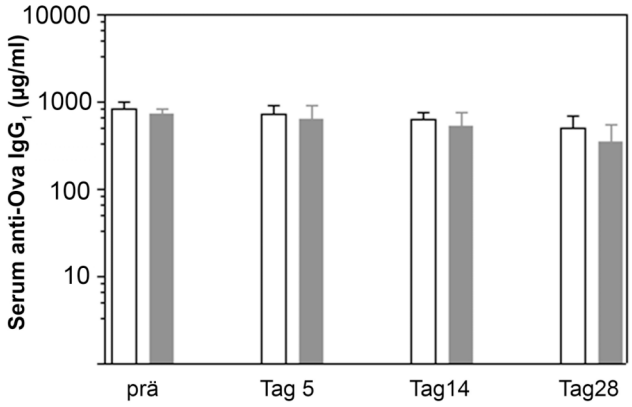

Abb. 23: Titerverlauf von anti-Ovalbumin IgG_1 nach NP/CpG-Immunisierung. Vor NP/CpG-Immunisierung (prä) und an verschiedenen Zeitpunkten nach dieser wurde das Serum der Mäuse im ELISA auf Ovalbumin-spezifische Antikörper untersucht (graue Balken) und verglichen mit den Tieren ohne NP/CpG-Immunisierung (weiße Balken). Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb. 17 gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SD der Ergebnisse von 5 untersuchten Tieren je Gruppe im Verlauf über die Zeit.

5.3.3 Identifizierung von Ovalbumin-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen in der Milz

Gedächtnis-B-Zellen entstehen in T-Zell abhängigen Immunantworten aus Keimzentrumsreaktionen (7), und sind verantwortlich für das schnellere Auftreten einer größeren Anzahl höher affiner Antikörper im Laufe einer Sekundärantwort. Um Aussagen über eine Verminderung oder Vergrösserung (48, 49) des Pools Ovalbumin-spezifischer Gedächtniszellen nach NP/CpG-Immunisierung treffen zu können, war es auch hier sinnvoll, zunächst eine sichere Methode zur Identifizierung der Zellen im Durchflusszytometer zu etablieren. In der Literatur sind Gedächtnis-B-Zellen als kleine Zellen beschrieben (105, 106), die den B-Zell-Marker B220 und Oberflächenimmunglobine tragen, jedoch negativ für CD138 sind, und schließlich das für sie spezifische Antigen auf der Oberfläche binden. Die in Abb.24 markierte Population Ovalbumin-bindender, B220+ Zellen erfüllte diese Kriterien und konnte somit als Gedächtniszellpopulation identifiziert werden.

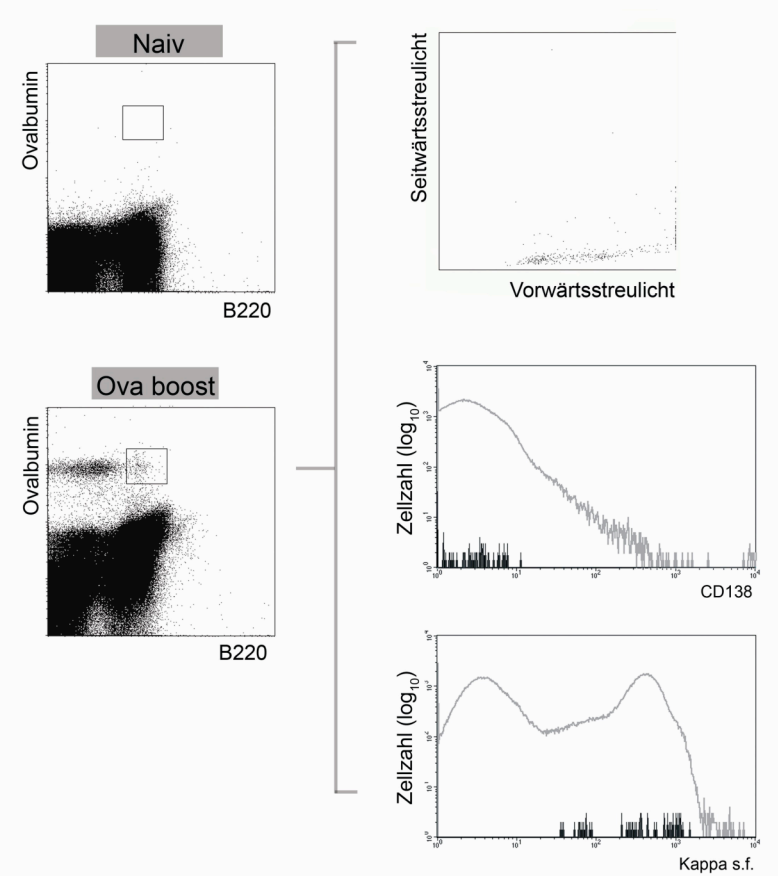

Abb. 24: Charakterisierung von Ovalbumin-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen in der Milz. Milzzellen von Mäusen 24 Tage nach Boosterimmunisierung und von nicht immunisierten Kontrolltieren wurden im FACS durch Expression des Oberflächenmoleküls B220, sowie die Fähigkeit Ovalbumin auf der Zelloberfläche zu binden, als Ova-spezifische Memoryzellen identifiziert. Zur weiteren Kontrolle wurden diese auf oberflächliche CD138 und Kappa-Leichtketten Expression sowie auf Ihre Verteilung im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht hin untersucht (rechte Spalte). Im Histogramm sind die Memoryzellen durch die schwarze Fläche dargestellt, Zellen aus dem Lymphozytengate mit der grauen Linie.

5.3.4 Ovalbumin-spezifische Gedächtnis-B-Zellen nach NP/CpG-Immunisierung

Nach ihrer Entstehung im Keimzentrum eines Follikels zirkulieren die Gedächtnis-B-Zellen entweder zwischen den lymphatischen Organen auf der Suche nach „ihrem“ Antigen oder lassen sich in der Milz als residente Zellen nieder. In der Literatur sind für Gedächtnisszellen Zahlen von 0,01-0,05% der gesamten Milzlymphozyten (56) beschrieben. Eine polyklonale-/bystander-Aktivierung, die ASC generiert, indem Gedächtniszellen aus in der Vergangenheit abgelaufenen Immunreaktionen unspezifisch stimuliert werden, könnte dazu führen, dass sich diese Zellen teilen und zu Plasmazellen differenzieren. Dann würde die Anzahl dieser Gedächtniszellen abnehmen, während neue Plasmazellen nachweisbar werden. Teilt sich die Gedächtniszelle jedoch, und nur ein Teil der Tochterzellen differenzieren zu Plasmazellen, während der andere

Teil die ursprüngliche Gedächtniszelle ersetzt, so würde der Pool der Gedächtniszellen nach Kontakt mit einem polyklonalen-/bystander-Stimulus größer werden. Abb.25 macht deutlich, dass in der Milz zwischen 0,02-0,06 % als Frequenz der Lymphozyten Ovalbumin-Gedächtniszellen waren. Durch die Immunisierung mit NP/CpG als unspezifischen Stimulus für die Ovalbumin-Gedächtniszellen änderten sich die Frequenzen dieser Zellen in der Milz an Tag 6 oder 28 nicht nachweislich.

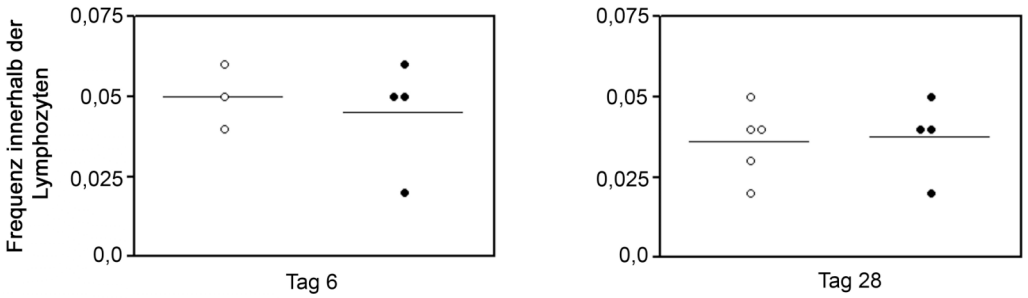

Abb. 25: Ovalbumin-spezifische Gedächtnis-B-Zellen nach NP/CpG-Immunisierung in der Milz. Die Frequenz von B220+/CD138-/Kappa(s.f.)high/OVA(s.f.)+ Gedächtnis-B-Zellen in der Lymphozytenpopulation wurde an den angegeben Zeitpunkten nach NP/CpG-Immunisierung durchflusszytometrisch analysiert. Die Tiere mit Immunisierung (schwarze Symbole,●) wurden verglichen mit den Tieren ohne die NP/CpG-Immunisierung (offene Symbole,○). In den Graphiken entspricht jeder Punkt dem Messwert eines Tieres, die Linien kennzeichnen den Mittelwert einer Gruppe.

5.3.5 Reaktion naiver B-Zellen auf polyklonale-/bystander-Stimuli

Menschliche naive B-Zellen teilen sich nicht, wenn sie nur zusammen mit CpG kultiviert werden, während es zu starker Proliferation der Zellen kommt, wenn zusätzlich IL-15 und anti-IgG als BCR-Signal zugefügt wird (51). Um zu testen, ob eine NP/CpG-Immunisierung in der Maus einen Stimulus darstellt, der in der Lage ist, naive B-Zellen zur Teilung und Differenzierung Ovalbumin-spezifischer Plasmazellen anzuregen, wurde von einer Gruppe naiver Mäuse die eine Hälfte mit 100µgNP-KLH und 10µgCpG immunisiert, während die andere Hälfte nicht behandelt wurde. In Abb.26 sind die Ergebnisse von jeweils 5 Tieren an Tag 6 nach dieser Immunisierung gezeigt. Weder im Knochenmark noch in der Milz waren im ELISPOT-Assay ASC detektiert worden, die gegen Ovalbumin gerichtetes IgG sezernierten. In der Milz der Tiere ohne Behandlung waren im Mittel 9 (±5) Ovalbumin-spezifische ASC, und mit NP/CpG-Immunisierung im Mittel 70 (±47) Ovalbumin-spezifische ASC vorhanden, was mit $p<0,05$ im Mann-Whitney-Test einen signifikanten Anstieg bedeutet. Es ist also möglich, dass naive B-Zellen durch den polyklonalen-/bystander-Stimulus zur Proliferation und

exrafollikulären Bildung von kurzlebigen IgM-Plasmazellen angeregt worden waren (16). An Tag 7 konnten die gleichen Ergebnisse erhoben werden und sind hier nicht gezeigt. Ob dieser Anstieg allerdings tatsächlich durch entstandene ASC, die gegen Ovalbumin gerichtete Antikörper der Klasse IgM sezernieren, zustande kam, oder aber durch eine Kreuzreaktivität mit Ovalbumin, kann nicht entschieden werden. IgM ist ein aus 5 Untereinheiten zusammengesetztes Multimer und das größte Antikörpermolekül. Da es meist nur eine geringe Affinität besitzt, ist eine unspezifische Bindung wahrscheinlicher als bei anderen Antikörperklassen.

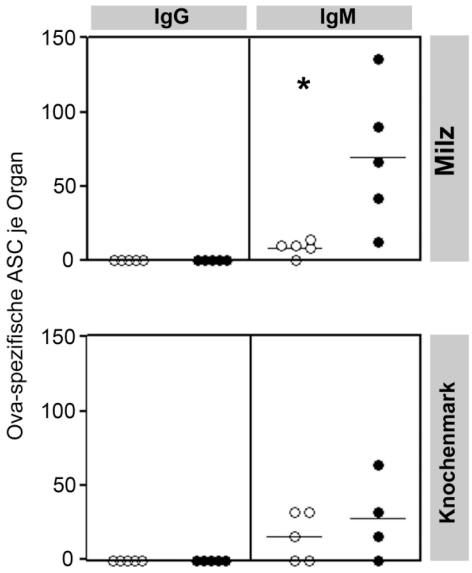

Abb. 26: Auswirkungen einer NP/CpG-Immunisierung auf Ovalbumin-spezifische ASC einer naiven Maus. Naive Mäuse wurden mit NP/CpG immunisiert (schwarze Symbole,●). An Tag 6 wurde mittels ELISPOT die Anzahl IgG bzw. IgM sezernierender, Ovalbumin-spezifischer ASC ermittelt und verglichen mit Mäusen ohne NP/CpG-Immunisierung (weiße Symbole,○). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie die jeweiligen Mittelwerte der verschiedenen Gruppen. Die Werte der beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch analysiert. Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$.

5.4 Aktivierung transferierter Ovalbumin-Gedächtniszellen mit NP/CpG oder Ovalbumin

Werden Gedächtnis-B-Zellen aus der Milz in naive Rezipienten transferiert, so ist es möglich, durch darauf folgende Immunisierung mit dem ursprünglichen Antigen im Rezipienten eine Gedächtnis-Immunantwort auszulösen (35, 107). Um eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob auch ein polyklonaler-/bystander-Stimulus in der Lage ist, durch unspezifische Aktivierung von Memoryzellen einen nachweisbaren Antikörpertiter zu generieren, wurde folgendes Transferexperiment durchgeführt: Donortiere wurden zwei Mal im Abstand von 4 Wochen mit 100µg Ovalbumin intraperitoneal immunisiert. Die Generierung von Memoryzellen in den Keimzentren dauert ungefähr 3 Wochen (105). 5 Monate später wurden die Milzzellen der Donortiere gewonnen, mit dem MACS Verfahren in B220+ und B220- Zellen sortiert, und Durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht (86%). Um eine Verunreinigung der Fraktion B220+ Zellen mit ASC auszuschließen wurden Proben der B220+ und B220- Zellen auf ELISPOT-Platten inkubiert. In den B220+ Proben konnte kein Spot detektiert werden. So konnte davon ausgegangen werden, dass mit den B220+ Zellen Gedächtniszellen und B-Zellen, aber keine ASC transferiert werden würden. $3{,}4x10^6$ der B220+ Zellen wurden in syngene Rezipienten transferiert, die vorher noch nie Kontakt mit Ovalbumin gehabt hatten. 20 Minuten später wurde 5 Tieren 100µg Ovalbumin mit CpG und 5 Tieren 100µg NP mit CpG intraperitoneal injiziert. 5 Tiere blieben zur Kontrolle unbehandelt.

Nach 8 und nach 25 Tagen wurde das Serum der Tiere auf Ovalbumin-spezifische Antikörper der Klasse IgG_1 untersucht. In der Positivkontrolle, den Ovalbumin-immunisierten Tieren, war durch Stimulierung der transferierten Memoryzellen ein Ovalbumin-Titer generiert worden. Die NP/CpG-Immunisierung hatte keinen wesentlich über der Kontrollgruppe liegenden Antikörpertiter hervorgerufen. Aus den eingesetzten Verdünnungen geht hervor, dass die Ovalbumin-Immunisierung einen mindestens 20-fach höheren Anstieg der Ovalbumin-Immunglobuline gegenüber dem Anstieg durch die NP-Immunisierung hervorzurufen vermochte.

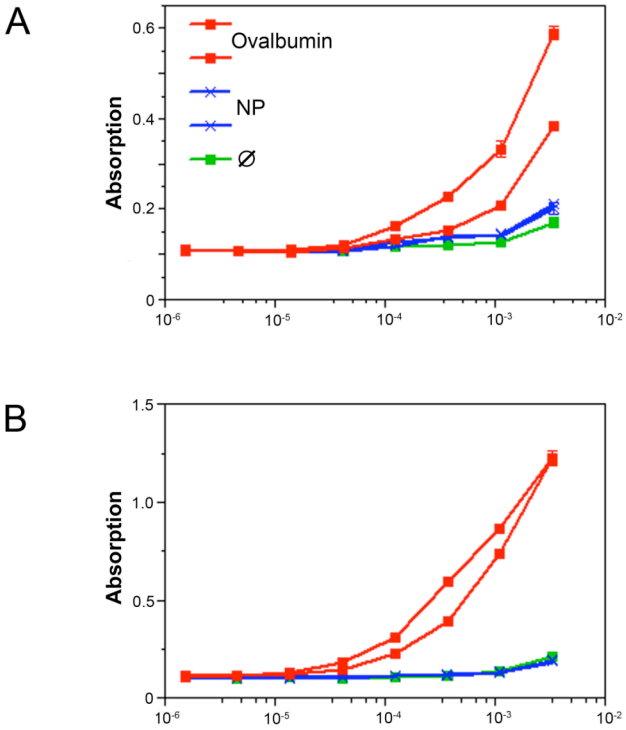

Abb. 27: Ausbildung von anti-Ovalbumin spezifischen IgG_1 Antikörpertitern im Blut nach Transfer von $B220^+$ Milzzellen und darauf folgenden Immunisierungen. Die Donoren der Milzzellen waren zuvor mit Ovalbumin sekundärimmunisiert worden. 20 Minuten nach Transfusion von 3,4x106 B220+ Milzzellen wurden die Rezipienten mit Ovalbumin und CpG (rot), NP und CpG (blau) oder nicht (grün) immunisiert. A zeigt die Ausbildung Ovalbumin-spezifischer IgG1 Titer nach 8 Tagen, B nach 25 Tagen. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 Tieren als repräsentatives Beispiel von 5 untersuchten Tieren je Gruppe.

6 Diskussion

Um wiederholte Infektionen mit einem Pathogen in unserem Körper zu verhindern hat das Immunsystem Mechanismen entwickelt, die uns vor bereits bekannten Pathogenen schützen. Oft sind Antikörper die wichtigsten Komponenten in diesem Schutzsystem, die als Verteidiger in der vorderen Reihe, zirkulierend im Serum oder entlang der Schleimhautoberflächen, eingedrungene Erreger abfangen.

Bemerkenswert dabei ist, dass dieser Schutz dem Körper über viele Jahre erhalten bleibt (70, 108, 109).

Da die Halbwertszeit von Antikörpern im Serum weniger als 2-3 Wochen beträgt (72, 73) muss eine kontinuierliche Produktion von Antikörpern gewährleistet werden, um dauerhaft erhöhte Titer von antigenspezifischen Antikörpern aufrechtzuerhalten.

Die Frage, wie das Immunsystem diese Aufgabe bewältigt, beschäftigt Wissenschaftler schon seit langer Zeit.

Plasmazellen und Plasmablasten mit ihrer Fähigkeit, mehr als 5000 Antikörpermoleküle je Sekunde zu sezernieren (20), sind die einzigen antikörpersezernierenden Zellen.

Um eine kontinuierliche Antikörperproduktion zu erreichen, sind zwei Möglichkeiten denkbar: Entweder die Plasmazellen sind langlebig oder der Pool kurzlebiger Plasmazellen wird dauernd durch neue Zellen aufgefüllt.

Über Jahrzehnte hinweg galt das Dogma, dass Plasmazellen nach einer Lebensdauer von wenigen Tagen durch Apoptose zugrunde gehen (110). Durch Transferexperimente und BrdU-Markierung konnte jedoch zum einen gezeigt werden, dass Plasmazellen zumindest über viele Monate hinweg leben können, und zum anderen, dass für ihr Überleben keine Stimulation von Antigen notwendig ist (30, 31). Diese Vorläuferplasmazellen wandern nach ihrer Entstehung von peripheren lymphatischen Organen ins Knochenmark. Nur dort finden sie in gesunden Organismen die Bedingungen für langes Überleben vor und produzieren Antikörper.

Für die Annahme, dass dauernd kurzlebige Plasmazellen entstehen, die den Antikörpertiter aufrechterhalten, wurde bisher von einer wiederholten Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen ausgegangen, die das Vorhandensein von Antigen voraussetzt.

Eine Untersuchung von Bernasconi et al. an menschlichen Gedächtnis-B-Zellkulturen wies mit ihren Ergebnissen auf eine neue Möglichkeit zur Generierung von Plasmazellen hin:

Antigenunspezifische Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen mit daraufhin folgender Differenzierung zu Plasmazellen führt zum stetigen Wiederauffüllen des Plasmazellpools im Knochenmark (51).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine Immunantwort, die durch polyklonale-/bystander-Stimuli in der Maus ausgelöst wurde, zu untersuchen und näher zu charakterisieren, um dann deren Beitrag zur Aufrechterhaltung eines Langzeit-Antikörpertiters in der Maus besser einschätzen zu können.

6.1 Diskussion der Methodik

Durchflusszytometrische Analysen

Antikörper-sezernierende Zellen, ob als Plasmablasten oder im ausdifferenzierten Stadium als Plasmazellen, machen nur einen sehr geringen Teil der Lymphozyten -zwischen 0,1-2%- in den lymphatischen Organen Milz und Knochenmark aus. Daraus ergeben sich vielfältige technische Schwierigkeiten, insbesondere dann, wenn, wie in dieser Arbeit, geringe Zellzahlunterschiede zwischen Versuchsgruppen ermittelt werden sollen. Eine so sensitive Methode wie die durchflusszytometrische Untersuchung, mit der Zellen auf Einzelzellebene charakterisiert werden können, stellt darum ein gebräuchliches Hilfsmittel in der immunologischen Forschung dar.

Eine Erschwernis dieser Methode wiederum ist die fehlende Möglichkeit, aufgrund von funktionellen Eigenschaften (Sekretion von Antikörpern), oder dem mikroskopisch-morphologisch eindeutigen Bild, eine gemessene Zelle als Plasmazelle zu identifizieren. Die Einordnung mittels Grösse, Granularität, Oberflächenmolekülen und schließlich der Nachweis von intrazellulären Immunglobulinen sollte eine hinreichende Sicherheit geben, dass es sich bei den gemessenen Zellen tatsächlich um ASC handelt.

Methodik der BrdU-Markierung

Die Markierung von neu synthetisierter DNA mit dem Basenanalogon BrdU bietet eine elegante Methode, den Entstehungszeitraum von Lymphozyten zu bestimmen. Im Gegensatz zu der klassischen Quantifizierung neusythetisierter DNA mittels ^{3}H-Thymidin weist diese Methode

den Vorteil fehlender Radioaktivität auf, und stellt eine etablierte Methode (111) in Zellproliferationsstudien mit hoher Sensitivität dar, die auch in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet wurde (37). Allerdings müssen hier, wie bei allen Substanzen, die in physiologische Abläufe eingreifen, mögliche Auswirkungen auf die Zellen und den Gesamtorganismus bedacht werden. Zum einen kann BrdU durch Basentransitionen mutagen wirken (112), zum anderen werden möglicherweise Änderungen der Lymphozyten hervorgerufen. Diskutiert wird eine abweichende Expression von Oberflächenmolekülen, eine geringere antigenspezifische Immunantwort, sowie geringere Zytokinproduktion nach Einbau von BrdU in die Zelle (113, 114). In Bezug auf die Funktionseinbusen der Lymphozyten nach BrdU-Inkorporation gehen die Meinungen auseinander (115), und müssen besonders bei langfristiger Fütterung bedacht werden. In dieser Arbeit waren die Tiere höchstens 28 Tage BrdU ausgesetzt. Die meisten Studien sprechen von Auswirkungen erst nach langen Zeiträumen, ebenso wie auch erst später eine Resistenz der Zellen gegen den Einbau von BrdU festgestellt werden konnte (115). Außerdem konnten die durch BrdU erhobenen Ergebnisse in dieser Arbeit auch durch Auswertung von MHCII unterstützt werden.

Anhand der Analyse der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen nach Sekundärimmunisierung, von denen bekannt war, dass die fast ausschließlich seit Beginn der BrdU-Fütterung entstanden waren, konnte der effektive Einbau des Basenanalogons erfasst werden. Über 95% dieser Zellen waren im Durchflusszytometer BrdU+ (Abb.17), während die ungelabelten Zellen noch aus der Primärantwort vorhanden waren und darum kein BrdU aufnahmen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Literaturangaben (111). Zusammenfassend kann von einer effizienten und guten Methode zur Markierung neu entstandener Zellen durch BrdU ausgegangen werden.

Ermittlung von absoluten Zellzahlen aus Zellfrequenzen

Die in der Arbeit angegebenen Zellzahlen entsprechen größtenteils absoluten Zellzahlen je Organ. In den Programmen zur Auswertung der Daten von durchflusszytometrischen Analysen werden Frequenzen der betrachteten Population als Anteil der insgesamt analysierten Ereignisse, oder als Anteil an einer übergeordneten Population berechnet. Im Falle dieser Arbeit war dies zumeist der Anteil von ASC innerhalb der Population von Lymphozyten. Eine Erhöhung der Frequenz von ASC lässt aber noch keine Aussage über das tatsächliche Verhalten der Größe der Population zu. Auch wenn die Population der Lymphozyten kleiner wird, die Anzahl der ASC aber konstant bleibt, täuscht eine resultierende Frequenzerhöhung der ASC eine

Zellzahlzunahme vor. Um falsche Interpretationen auszuschließen, wurden daher jeweils auf Grundlage der im Casy gezählten absoluten Zellzahl eines Organs zunächst die absoluten Zahlen der Lymphozyten, und dann die absoluten Zellzahlen der jeweils untersuchten Population berechnet. Dass dadurch eine größere Streubreite der Werte zwischen den Tieren zustande kam, musste in Kauf genommen werden.

Immunisierungen und Antigene

Sowohl Ovalbumin als auch NP, die als Antigene eingesetzt wurden, rufen T-Zell abhängige Immunantworten hervor und unterscheiden sich zum einen durch Ihre Größe und Anzahl der Epitope von Bakterien oder Viren und auch dadurch, dass sie nicht vermehrungsfähig sind. Die Fähigkeit von lebenden Bakterien, Viren oder Protozoen, im Organismus eine polyklonale-/bystander-Aktivierung auszulösen kann sicherlich eine andere sein als diejenige der in dieser Studie verwendeten Antigenen und Adjuvantien. Von Protozoen wie Plasmodien oder Leishmanien ist bekannt, dass sie eine massive polyklonale Aktivierung im Wirtsorganismus auslösen können (98, 116, 117), genauso wie persistierende virale Infektionen (118). Ziel dieser Studie war es jedoch, die in vitro-Ergebnisse anderer Arbeiten zunächst in ein Mausmodell zu übertragen und in vivo die Effekte von polyklonaler-/bystander-Aktivierung nach Immunisierung mit Protein-Antigen und Hapten zu untersuchen. Neben NP-KLH wurde den Tieren als unspezifischer Stimulus CpG 1668 verabreicht. CpG ist in einer Vielzahl unterschiedlicher Sequenzen erhältlich, die mit unterschiedlichen Nummern gekennzeichnet sind. In Anlehnung an die Studien von Krieg et al. (94) wurde die Sequenz CpG 1668 gewählt. Da unterschiedliche Sequenzen in ihrer B-Zell-stimulatorischen Aktivität voneinander abweichen können (94, 119), können mit dieser Arbeit nur Aussagen über die Wirkungen nach Stimulation mit CpG 1668 getroffen werden.

Sämtliche Tiere wurden während der gesamten Zeit unter spf-Bedingungen gehalten. Dieses war nötig, um von außen einwirkende Störfaktoren wie Infektionen einzelner Tiere zu minimieren. Dass in den Tieren vor Beginn der Immunisierungen dadurch nur wenige Immunreaktionen abgelaufen waren, schwächte sicherlich die messbare polyklonale-/bystander-Aktivierung ab (Abb. 14), da dieses Phänomen mehrheitlich durch Aktivierung von Gedächtnis-B-zellen zustande kommt (51, 98). Die Haltung der Tiere unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen verhindert aber nicht jeglichen Kontakt der Tiere mit Antigen, so dass auch in diesen Tieren vor Beginn der

Immunisierungen Immunreaktionen abgelaufen und Gedächtnis-B-Zellen gebildet worden waren.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark gibt es eine begrenzte Anzahl von Ovalbumin-spezifischen Zellen

Für die Antikörperproduktion in der Zeit nach einer akuten Infektion sind vor allem Plasmazellen verantwortlich, die sich im Knochenmark befinden (54, 82), und dort lange überleben können (37). Vorraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Plasmazellen im Knochenmark Mikromilieubedingungen antreffen, die sie in ihrem Überleben unterstützen (40). Durch die begrenzte Kapazität, solche Mikromilieubedingungen bereitzustellen, entstehen vermutlich sogenannte „Überlebensnischen“, deren Anzahl limitiert ist (30). Aus Untersuchungen am Menschen weiß man, dass in humanem Knochenmark der Anteil von Plasmazellen ungefähr konstant bleibt. Jedoch ist nicht klar, ob hierfür ein Kapatsitätslimit der Nischen oder ein Gleichgewicht von sterbenden und neu eingewanderten Plasmazellen verantwortlich ist.

In der Milz von Mäusen wurde gezeigt, dass nur eine begrenzte Anzahl von Plasmazellen je Volumeneinheit in ihrem Überleben unterstützt werden kann. Die überzähligen Plasmazellen sterben wenige Tage später (28).

In Abb.11 ist erkennbar, dass auch für Ovalbumin-spezifische ASC in der Milz und im Knochenmark Grenzwerte existieren. Während die Zahl ASC zu Beginn der Immunisierungsreihe mit jedem Antigenkontakt weiter anstieg, war in der Milz bei 12000 ASC je Organ nach der vierten Immunisierung kein weiterer Anstieg mehr zu errechen. Auch im Knochenmark war der Anstieg zwischen 4. und 5. Immunisierung nicht mehr signifikant. Mit ungefähr 40000 Ovalbumin-spezifischen ASC scheinen entweder die Nischen im Knochenmark besetzt zu sein, oder eine Inhibierung mittels FcγIIB-Rezeptoren verhindert einen weiteren Anstieg spezifischer Plasmazellen. Auch der Verlauf des Titers von Ovalbuminspezifischem IgG im Serum der Tiere folgte derselben Kinetik. Nach mehrmaliger Immunisierung war kein Anstieg des Titers mehr zu beobachten (Abb.13).

In Milz und Knochenmark stieg die Zahl Ovalbumin-ASC bis zur vierten Immunisierung an, und konnte danach nicht weiter gesteigert werden. Im Gegensatz dazu stieg die Gesamtzahl von ASC im Knochenmark kontinuierlich (Abb.12), bis die ASC nach der sechsten Immunisierung 0,4%

der mononukleären Zellen ausmachten. Die Zahlen stimmen mit den in der Literatur angegebenen Grenzwerte von ASC im Knochenmark überein, die von 0,2% (120) (Maus) bis 0,5% (Mensch) (30)variieren. Da die Plasmazellen anderer Spezifitäten bis dahin noch einwandern können, während Ovalbumin-spezifische Plasmazellen bereits ein Limit erreicht haben, kann davon ausgegangen werden, dass der fehlende Anstieg von Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen im Knochenmark nach den späteren Immunisierungen auf die inhibierende Wirkung der FcγIIB-Rezeptoren zurückzuführen ist.

Schon lange ist bekannt, dass für die Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters mit Antikörpern gegen nicht-replizierende Antigene eine einmalige Immunisierung nicht ausreicht. Das Antigen muss mindestens drei Mal appliziert worden sein, um bis zu 50 Jahre später noch Antikörper nachweisen zu können. Eine Begründung für diese Beobachtung war die Vermutung, dass erst durch mehrmaligen Antigenkontakt genügend Antigen-Moleküle auf follikulären dendritischen Zellen deponiert werden konnten (54). Angesichts der Kinetik in Abb.11, die den kontinuierlichen Anstieg spezifischer Plasmazellen zeigt, wäre es jedoch auch gerechtfertigt, die ausreichende Anhäufung von antigenspezifischen ASC im Knochenmark und der Milz für den lang anhaltenden Schutz verantwortlich zu machen. Diese ist erst nach mehrmaligen Antigenkontakten erreicht.

Ungefähr 6-8 Tage nach einer Immunisierung lassen sich ASC, welche spezifisch sind für das zur Immunisierung verwendete Antigen, im Blut von Menschen (44, 51) bzw. Mäusen nachweisen (121). Im Menschen konnte außer diesen Zellen zum gleichen Zeitpunkt auch ein Anstieg von ASC anderer Spezifitäten im Blut gefunden werden (44, 51). Das Auftreten dieser Zellen wurde unterschiedlich interpretiert. Bernasconi et al. gingen von einer durch Impfung hervorgerufenen polyklonalen-/bystander-Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen aus, die zur Generierung von ASC anderer Spezifitäten und deren Nachweis im Blut führte. Im Gegensatz dazu betrachteten Odendahl et al. die ASC anderer Spezifitäten als ursprünglich im Gewebe angesiedelte Plasmazellen, unter anderem aus dem Knochenmark. Da die Anzahl der dort residenten Plasmazellen jedoch begrenzt ist, werden sie durch die im Verlaufe der Immunisierung entstandenen und ins Knochenmark einwandernden ASC aus ihren Überlebensnischen verdrängt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es eine Limitierung von ASC in Milz und Knochenmark gibt, und auf deren bis dahin kontinuierliches quantitatives Ansteigen nach mehreren Antigenkontakten. Die Limitierung einer Spezifität wird jedoch wahrscheinlich durch FcγIIB-Rezeptoren übermittelt. Ist jedoch das Kapazitätslimit im Knochenmark erreicht, kann es durchaus zu einem Verdrängungsmechanismus kommen und eine ausreichende Plasmazellzahl bleibt nur dann bestehen, wenn genug spezifische ASC im Knochenmark angehäuft worden waren (122).

BrdU-Pulsexperimente wären eine Möglichkeit um in der Zukunft zu unterscheiden, ob Ovalbumin-spezifische Zellen in der Plateauphase residente, langlebige Zellen sind, die anderen Zellen den Eintritt in das jeweilige Kompartment verwehren, oder ob sich neue Zellen durch Verdrängung der Alten einen Platz in der Nische sichern.

Eine polyklonale-/bystander-Aktivierung ist auch im Mausmodell nachweisbar

Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Immunisierungsmodelle sollte eine polyklonale-/bystander-Aktivierung in vivo ausgelöst und nachgewiesen werden.

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit einem T-Zell-abhängigen Antigen, in diesem Fall Ovalbumin, Auswirkungen auf B-Zellen anderer Spezifitäten hat.

Den bekannten Mechanismen einer Immunantwort folgend, wurden in der Grundimmunisierung mit Proteinantigen (in der vorliegenden Arbeit Ovalbumin) naive B-Zellen, die den Ovalbumin-bindenden B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche trugen durch spezifische T-Zellhilfe mittels CD40 und IL-4 sowie weiteren Zytokinen zur Proliferation angeregt (55, 123). Daraufhin entstanden in den Follikeln der Milz Keimzentren, aus denen sich Plasmablasten, die für Ovalbumin hochaffine Antikörper produzieren, oder Gedächtnis-B-Zellen entwickelten. Diese Gedächtnis-B-Zellen stellen die Grundlage für die schnellere und stärkere Plasmazellgenerierung in einer folgenden Immunreaktion auf Ovalbumin dar. In der Tat waren nach der Boost-Immunisierung mit Ovalbumin sowohl in der Milz als auch im Knochenmark sehr viel mehr Ovalbumin-spezifische ASC nachweisbar (Abb. 16, 17).

Es sollte untersucht werden, inwiefern diese Immunreaktion auf Ovalbumin auch B-Zellen beeinflusst, die keinen Ovalbumin bindenden B-Zellrezeptor tragen. Das bedeutet, dass für diese Zellen Ovalbumin nicht ein spezifisches Signal zur Proliferation und Differenzierung geben kann, sondern mit anderen Mechanismen, der polyklonalen- bzw. bystander-Aktivierung, Zellen

stimuliert. Entstehen hierbei Plasmazellen, so wäre es möglich, dass diese ins Knochenmark wandern, um den Pool der dort residenten Plasmazellen aufzufüllen.

Im Rahmen dieser Studie war es nicht möglich, eine Änderung in der Größe des nicht Ovalbumin-spezifischen Plasmazellpools von Milz oder Knochenmark nachzuweisen. Betrachtet man die Ergebnisse in Abb.18, so zeigt sich, dass der Ovalbumin-Boost, der einen unspezifischen Stimulus für das gesamte Kompartiment Ovalbumin-negativer B-Zellen bereitstellte, nicht ausreichte, um den Pool Ovalbumin-negativer ASC signifikant zu vergrößern- bzw. die angewandten Messmethoden die geringen Änderungen nicht anzeigten.

Die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen (Abb.17, 19) an Tag 6 zeigt jedoch eine signifikante Vermehrung von ASC, die MHCII exprimieren, sowie von Zellen, die BrdU inkorporiert haben.

Diese Beobachtung ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass Ovalbumin und die darauf folgende spezifische Immunreaktion zur Entstehung von ASC anderer Spezifitäten geführt hat: Die Aufnahme von BrdU zeigt an, dass die Zellen im Zeitraum seit der Ovalbumin-Immunisierung (Beginn der BrdU-Fütterung) entstanden sind. Ebenso wie die Ovalbumin-spezifischen Plasmablasten, die in der Boostimmunisierung entstanden sind, sind auch die unspezifisch entstandenen Zellen MHCII-positiv, phänotypisch Plasmablasten.

Auch im folgenden Versuchsaufbau konnten ASC nachgewiesen werden, die durch eine polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden waren:

Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass Gedächtnis-B-Zellen über TLR4 und TLR9 durch mikrobielle Produkte wie CpG oder LPS polyklonal stimuliert werden können (50), oder durch CD40-Stimulation und Zytokine von aktivierten T-Zellen aus anderen Immunreaktionen zur Proliferation angeregt werden (51). Aus den Gedächtnis-B-Zellen entstanden in diesen Untersuchungen so Plasmazellen, deren sezernierte Antikörper im Überstand der Kultur nachweisbar waren.

Dieser Mechanismus wurde hier im Tiermodell unter physiologischen in-vivo Bedingungen näher untersucht. Nach mehrfacher Immunisierung mit Ovalbumin wurde Tieren NP und CpG intravenös verabreicht (Abb.21). An verschiedenen Zeitpunkten danach wurden mit der ELISPOT Technik die ASC, die Ovalbumin-bindende Antikörper sezernieren, ausgezählt.

An Tag 6 waren in der Milz dieser Tiere signifikant mehr Ovalbumin-spezifische IgG-ASC nachweisbar als in der Gruppe, die keine NP/CpG-Immunisierung erhalten hatte (Abb.22).

Das angewandte Modell erzeugt hauptsächlich eine polyklonale-/bystander-Aktivierung von Memoryzellen

Dass eine Erhöhung nur der IgG-sezernierenden Ovalbumin-spezifischen ASC erfolgt war, während die IgM-sezernierenden Zellen keine Änderungen zeigten, ist ein Hinweis darauf, dass tatsächlich Gedächtnis-B-Zellen aktiviert worden waren (Abb. 22). Zu den gleichen Ergebnissen kommt auch Bernasconi in seiner Untersuchung humaner B-Zellen (50, 51), der eine Aktivierung ausschließlich von Gedächtnis-B-Zellen sieht, während naive humane B-Zellen nicht durch CpG-Stimulation proliferieren.

Die Frage, ob im murinen System ebenfalls naive B-Zellen durch NP/CpG-Immunisierung zur Bildung von für Ovalbumin-spezifischen ASC angeregt werden können, konnte mit einem weiteren Versuchsansatz beantwortet werden.

In einer Maus, die nicht mit Ovalbumin immunisiert wurde und vermutlich nie Kontakt zu Ovalbumin hatte, konnten 5 und 6 Tage nach einer Immunisierung mit NP und CpG Ovalbumin-spezifische ASC nachgewiesen werden (Abb.26). Diese entstandenen ASC sezernierten jedoch ausschließlich Antikörper vom Typ IgM, sie waren in äußerst geringer Anzahl in der Milz entstanden und waren im Knochenmark nicht nachzuweisen. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit Ovalbumin-grundimmunisierten Mäusen lässt sich also nicht völlig ausschließen, dass sich auch naive B-Zellen auf eine polyklonale-/bystander-Aktivierung hin zu ASC differenzieren, aber eine Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen ist der auch in diesem Modell deutlich vorherrschende Mechanismus, der zu neuen IgG-ASC und damit zu IgG-Antikörpern im Serum führt.

Das Ausmaß der Generierung von ASC in der Milz durch polyklonale-/bystander-Aktivierung ist gering und der Anstieg der Anzahl von ASC transient.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass im Rahmen einer Ovalbuminimmunisierung neue Plasmablasten entstanden sind (Abb.19), sah man diese Vermehrung nicht in einem Anstieg der gesamten Zellzahlen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb.18). Das kann daran liegen, dass

in jedem Tier nur so wenige neue Zellen entstehen, so dass der Anstieg aufgrund der großen Streuung der Zellzahlen zwischen den Tieren verdeckt wird.

Nach Immunisierung über antigenabhängige Mechanismen generierte ASC halten sich nur kurzzeitig in der Milz auf. Nach einer Sekundärimmunisierung kommt es zu einem Anstieg der Zellen dort bis zu Tag 6. Danach fallen die Zellzahlen schnell ab, während im Knochenmark um etwa einen Tag versetzt dazu ein paralleler Anstieg der Zellzahlen beobachtet werden kann (93). In Migrationsstudien konnte diese Beobachtung erklärt werden, indem gezeigt wurde, dass die Plasmablasten während dieser Zeit die Fähigkeit haben, gegen verschiedene Liganden der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 zu wandern und dadurch im Knochenmark akkumulieren (25, 32).

Auch die Plasmablasten, die durch die polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden waren, sind zwar an Tag 6 (und auch schon an Tag 5, die Daten nicht gezeigt), nach 28 Tagen aber nicht mehr in der Milz nachzuweisen (Abb.19). Allerdings ist für diese Zellen nicht bekannt, ob sie, wie die spezifisch generierten Zellen, überhaupt die Fähigkeit haben, ins Knochenmark einzuwandern und ihr Verschwinden in der Milz darauf zurückgeführt werden kann.

Ebenso führte eine Immunisierung mit NP und CpG zu einem nur vorübergehenden Auftreten von wenigen ASC, die durch polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden waren.

14 Tage nach der Immunisierung waren die an Tag 6 in der Milz gesehenen Ovalbumin-spezifischen ASC nicht mehr nachweisbar (Abb.22). Sie waren auch zu keinem Zeitpunkt im Knochenmark zu sehen, was zwei Interpretationsmöglichkeiten zulässt.

Entweder sie führen aufgrund ihrer sehr geringen Frequenz im Knochenmark nicht mehr zu einer signifikanten Erhöhung Ovalbumin-spezifischer ASC im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Zahl der polyklonal-/bystander-aktivierten Zellen pro Spezifität ist so gering, dass sie im relativ kleinen Pool ASC in der Milz noch in Erscheinung treten. Im Knochenmark, wo zehnmal mehr Ovalbumin-spezifische Plasmazellen vorhanden sind, lassen sich innerhalb dieses Versuchsaufbaus dann keine Unterschiede zur Kontrollgruppe mehr feststellen.

Eine andere Erklärung kann sein, dass sie nicht die Fähigkeit besitzen, wie die spezifisch generierten Plasmazellen, ins Knochenmark zu wandern. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass ihr Überleben nach wenigen Tagen durch Apoptose endet, weil sie die Überlebensfaktoren im Knochenmark nicht erreichen.

Die Zunahme der unspezifisch aktivierten Zellen ist in dem System mit der NP/CpG-Immunisierung nur gering (Abb.22), aber dennoch signifikant.

Durch eine Ovalbumin-Immunisierung von Tieren, die vorher schon Kontakt zu Ovalbumin gehabt hatten, also Ovalbumin-Gedächtnis-B-Zellen besitzen, entstehen um die 10.000 Ovalbumin-spezifische ASC (Abb.11, (32)). Im Vergleich zu dieser spezifischen Aktivierung sind durch die, durch NP-Immunisierung ausgelöste, polyklonale-/bystander-Aktivierung ca. 500 ASC entstanden. Der Effekt einer polyklonalen-/bystander-Aktivierung beträgt somit nur 5% einer spezifischen Aktivierung.

Durch die ungefähr 500 ASC, die durch die polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden sind, ist es jedoch unmöglich, einen Anstieg des Titers der Antikörper gegen Ovalbumin im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachzuweisen (Abb.23). Der erwartete Anstieg um 5% liegt weit unterhalb der mit ELISA erreichbaren Nachweisbarkeit.

Eine weitere Erklärung für den gleich bleibenden oder sogar erniedrigten Antikörpertiter liefert Sardinha et al.. In Ovalbumin-immunisierten Tieren waren nach Plasmodien-Infektion mehr Ovalbumin-spezifische ASC, aber geringere Ovalbumin-IgG Titer nachzuweisen als in Kontrollen ohne Plasmodien-Infektion (98). Der niedrigere Ovalbumin-Titer der plasmodieninfizierten Tiere wurde auf einen erhöhten Katabolismus der Antikörper zurückgeführt, mit dem der Organismus konstante Level an zirkulierendem IgG aufrechterhalten kann.

Die polyklonale-/bystander-Aktivierung von transferierten Gedächtnis-B-Zellen erzeugt nur einen schwachen Antikörpertiter im Serum

Gedächtnis-B-Zellen vermögen auch nach einem Transfer durch Stimulation mit dem für sie spezifischen Antigen zu Proliferation, Differenzierung und Antikörpersezernierung angeregt zu werden. Dieser Antikörpertiter kann über lange Zeit aufrechterhalten werden (48). Wie in den vorhergehenden Experimenten dargestellt, ist eine Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen auch durch den Mechanismus der polyklonalen-/bystander-Stimulation möglich. Ob diese andere Form der Aktivierung nach einem Transfer von Gedächtnis-B-Zellen ebenfalls zu einem Antikörpertiter führt, wie dessen Ausmaß ist, ob er in einer anderen Kinetik verläuft und wie lange dieser Aufrechterhalten wird, sollte durch ein Transferexperiment ermittelt werden. Um möglichst physiologische Bedingungen im Rezipienten zu schaffen, wurden für Donoren wie Rezipienten Mäuse des Stammes Balb/c ausgewählt, die nicht bestrahlt worden waren. Eine vorhergehende Bestrahlung ebenso wie eine Verwendung von SCID-Tieren hätte eine unphysiologische Knochenmarkssituation hergestellt: In diesen Tieren findet aufgrund der stark

verminderten Zahl von B- und T-Zellen (124) ein Wettbewerb um freie Nischen im Knochenmark nicht statt.

Abb.27 spiegelt die Effekte wieder, die die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen auf die Gedächtnis-B-Zellen in diesem System haben. Die spezifische Aktivierung durch Ovalbumin resultierte in einem hohen anti-Ovalbumin-Titer, während dieser in den Tieren, die NP/CpG erhalten hatten, mindestens 20-fach geringer ausgeprägt war.

So verdeutlicht auch diese Beobachtung, welchen quantitativen Stellenwert eine polyklonale-/bystander- Aktivierung in diesem System einnehmen kann.

Es wird ein Antikörpertiter durch diese Aktivierung erzeugt, der aber um ein vielfaches unter demjenigen liegt, der durch die spezifische Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen erzeugt wird.

Eine Verdrängung residenter Plasmazellen aus dem Knochenmark wurde nicht beobachtet.

Wie oben beschrieben, geht Odendahl aufgrund seiner in humanem Blut gemachten Beobachtungen von einer Verdrängung residenter Plasmazellen aus dem Knochenmark durch neu entstandenen Plasmablasten aus (44). Nach einer Immunisierung mit Tetanus konnte er zum einen Tetanus-spezifische ASC im Blut nachweisen, und zum anderen auch ASC anderer Spezifitäten. Zu anderen Zeitpunkten waren keine dieser Zellen im Blut vorhanden. Die Zellen waren nicht nur hinsichtlich ihrer Spezifität, sondern auch morphologisch voneinander zu unterscheiden. Während die Tetanus-spezifischen Zellen den Phänotyp von kürzlich generierten Plasmablasten aufwiesen, mit hohen Leveln von CXCR3 und CXCR4 sowie hoher MHCII-Expression, so exprimierten die nicht Tetanus-spezifischen Plasmazellen niedrige Level an CXCR3 und CXCR4, aber wenig MHCII - phänotypisch ausgereiften Plasmazellen entsprechend. Außerdem war die Größe dieser Populationen im Blut auffällig ähnlich (44).

Geht man von einer begrenzten Anzahl von Überlebensnischen für Plasmazellen im Knochenmark aus (39, 40, 43), wofür auch Hinweise in dieser Arbeit gefunden wurden, so gibt es eine einfache Erklärung für Odendahls Beobachtung: Die Tetanus-Immunisierung führt zur Ausschwemmung „alter“, residenter ASC aus dem Knochenmark durch Verdrängung aus ihren Überlebensnischen, die dann im Blut nachgewiesen werden können (122, 125). Auch dies würde eine Vermehrung von Plasmazellen anderer Spezifitäten nach einer Immunisierung hervorrufen, und bietet eine alternative Erklärung für deren Auftreten durch bystander- bzw. polyklonale Aktivierung.

Beide Hypothesen lassen sich experimentell überprüfen, da sich neu entstandene ASC von „alten“, aus dem Knochenmark oder anderen Nischen verdrängten ASC phänotypisch unterscheiden.

In dem hier angewandten Immunisierungsschema mit Ovalbumin ist ein Anstieg der absoluten Zahlen von Ovalbumin-negativen, MHCII- und BrdU- ASC (also „alten“ ASC aus dem Knochenmark) in der Milz nicht zu erkennen (Abb.19). Es ist nicht ausgeschlossen, dass ein Verdrängungsmechanismus im Knochenmark stattfindet, die Zellen aber nicht in der Milz nachweisbar sind, weil sie ohne die Überlebenssignale der stromalen Zellen des Knochenmarks wie IL-5, Il-6, TNF-α oder SDF-1 und ohne Kontakt zu CXCL-12 schnell durch Apoptose sterben (40, 43) und mit der Aufregulierung von CXCR4 die Fähigkeit verlieren in die Überlebensnischen des Knochenmarks zurückzukehren (32), also auch dort nicht nachweisbar sind.

Aufgrund der Ergebnisse scheint es also zu einer polyklonalen-/bystander-Aktivierung gekommen zu sein, die jedoch nur zu einem vorübergehenden und sehr geringen Anstieg der ASC geführt hat. Eine parallel dazu stattfindende Verdrängung von ASC aus dem Knochenmark ist dabei nicht ausgeschlossen, konnte aber in dem hier angewandten Modell nicht nachgewiesen werden.

Die Frequenz von Gedächtnis-B-Zellen wird durch eine polyklonale-/bystander-Aktivierung nicht beeinflusst.

Ob eine polyklonale Aktivierung auch eine Vergrößerung des Gedächtnis-B-Zell Pools beinhaltet, der später durch Stimulation mit dem spezifischen Antigen abgerufen werden kann, war Gegenstand einer früheren Untersuchung (98).

Eine Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin sollte die vorhandenen Ovalbumin-spezifischen Gedächtniszellen aktivieren. In einer Gruppe war 100 Tage vorher durch eine Infektion mit Plasmodien zusätzlich eine polyklonale Aktivierung ausgelöst worden. Nach der Sekundärimmunisierung mit Ovalbumin waren jedoch in beiden Gruppen gleich viele Ovalbumin-spezifische ASC nachweisbar.

Daraus schlossen die Untersucher, dass durch polyklonale Aktivierung entweder die Signale für eine Bildung von Gedächtnis-B-Zellen fehlen, oder dass die aktivierten Zellen früh durch Apoptose sterben.

In dieser Arbeit wurde die Frequenz von Ovalbumin-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen nach polyklonaler-/bystander-Aktivierung mit NP/CpG durchflusszytometrisch bestimmt, und ebenfalls keine Frequenzzunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne NP/CpG festgestellt (Abb.25).

Auf der anderen Seite wäre denkbar, dass durch eine polyklonale-/bystander-Aktivierung Gedächtnis-B-Zellen unspezifisch aktiviert werden, und nach deren Differenzierung zu Plasmazellen die Population der Gedächtnis-B-Zellen für dieses Antigen kleiner zurückbleibt, und somit weniger dieser Zellen für eine zukünftige spezifische Aktivierung zur Verfügung stehen. In diesem Fall hätte eine polyklonaler-/bystander-Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen einen negativen Effekt auf die zukünftige Antikörperproduktion.

Doch auch eine Frequenzabnahme wurde in der dargestellten Untersuchung nicht festgestellt.

Die Effekte einer polyklonalen-/bystander-Aktivierung sind im hier angewandten System ohne Auswirkungen auf die Größe der Gedächtnis-B-Zellpopulation.

Entscheidend für den Beitrag der durch polyklonale-/bystander-Aktivierung entstandenen ASC ist deren Überlebensdauer

Dass es eine polyklonale-/bystander-Aktivierung in der Maus gibt, die Anzahl der durch diesen Aktivierungsmechanismus entstandenen ASC jedoch äußerst gering ist, konnte in den dargestellten Versuchen gezeigt werden.

So wirkte sich deren Auftauchen nicht in einer Erhöhung des spezifischen Antikörpertiters aus. Denkbar wäre aber, dass sich im Laufe der Zeit auf diese Weise entstandene ASC ansammeln und schließlich eine so große Population bilden, die zur Langzeitantikörperproduktion beitragen kann.

Das kann aber nur der Fall sein, wenn diese ASC lange genug überleben. Darum ist die entscheidende Frage, ob die ASC, die durch polyklonale-/bystander-Aktivierung entstanden sind, kurz- oder langlebig sind.

In der Vergangenheit wurde u.a. mittels BrdU-Markierung ein System entwickelt, dass es dem Untersucher erlaubt, Aussagen über den Entstehungszeitraum und deren Überlebensdauer zu treffen (100). Da aber die Frequenz der bystanderaktivierten ASC zu gering war, konnte diese Methode zur Bestimmung der Überlebensdauer hier nicht angewandt werden.

Trotzdem können über weitergehende Beobachtungen Rückschlüsse auf die Überlebensdauer der ASC gezogen werden.

Die Wanderung von ASC ins Knochenmark ist essentiell für deren Überleben

Bekannt ist, dass ASC, die unter unterschiedlichen Bedingungen aktiviert werden, unterschiedlich lange leben. So unterscheiden sich zum Beispiel die ASC aus einer Primärantwort von denen aus einer Sekundärantwort.

Die meisten der ersten Plasmazellen, die in einer Primärantwort gegen ein Antigen außerhalb der Follikel entstehen, sind kurzlebige Zellen, die nach wenigen Tagen apoptotisch werden (15, 126).

In Primaten und Mäusen konnte ein Anstieg der Expression von Apoptosemarkern in Milz-Zellen festgestellt werden, nachdem die Tiere mit Plasmodien infiziert und massive polyklonale Aktivierung induziert worden war (127). Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch Plasmodien aktivierten Zellen durch Apoptose sterben (98).

Im Gegensatz dazu entstehen bei einer Sekundärantwort ASC, die viele Monate lang überleben (37). Sie überleben aber nur dann, wenn sie durch Migration in eine Umgebung gelangen, die ihr weiteres Überleben sichert. Eine Vielzahl von Untersuchungen identifizierte das Knochenmark als wichtigstes Homingorgan für das Langzeitüberleben von ASC (28, 31, 37, 67).

Ausser dem Knochenmark gibt es auch andere Organe die Plasmazellen beherbergen können und ihnen das zum Überleben nötige Mikromilieu liefern. In der Niere von autoimmunen Mäusen (26), in Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis (128) oder auch in der Gingiva der Mundhöhle (129) konnte eine Akkumulation von Plasmazellen mit längerem Überleben nachgewiesen werden. Diesen Geweben war allerdings gemeinsam, dass sie sich in einem Zustand chronischer Entzündung befanden. Das durch Entzündung zustandekommende Mikromilieu hat mit dem Knochenmark die Produktion von Zytokinen gemeinsam die das Plasmazell-Überleben unterstützen (40). Es ist davon auszugehen, dass für die in den peripheren lymphatischen Organen entstandenen Plasmazellen die Aufnahme ins Knochenmark essentiell ist für ein verlängertes Überleben, sofern keine Entzündungsherde im Körper weitere Überlebensnischen öffnen.

Weisen polyklonal/bystander-aktivierte ASC ein anderes Migrationsverhalten auf?

In der Milz waren 6 Tage nach Immunisierung mit NP/CpG mehr Ovalbumin-spezifische ASC nachweisbar gewesen (Abb.22). Aus anderen Experimenten ist bekannt, dass spezifisch aktivierte ASC, die in der Milz in einer Sekundärantwort entstanden sind und ins Knochenmark wan-

dern, an Tag 6 bereits zu einem großen Teil im Knochenmark angekommen sind (78, 99). In dieser Arbeit konnte keine Vermehrung der Zahl Ovalbumin-spezifischer ASC durch eine NP/CpG-Immunisierung im Knochenmark an Tag 6 festgestellt werden. Auch eine Erhöhung dieser Zellzahlen aufgrund einer späteren oder langsameren Migration war an Tag 14 oder 28 nicht zu erfassen.

In primären antigenspezifischen Immunantworten wandern die entstandenen ASC wahrscheinlich nicht ins Knochenmark (15), während die ASC der frühen Phase der Sekundärantwort im Knochenmark nachweisbar werden. Präferentiell wandern solche Zellen ins Knochenmark ein, die Antikörper höherer Affinität sezernieren, nachdem sie eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben (126). Dass diese Unterschiede in der Migrationsfähigkeit von ASC intrinsisch reguliert werden, d.h. aufgrund von Modulation oder Expression der Chemokinrezeptoren gesteuert werden können, konnte aus den Beobachtungen in Transferexperimenten geschlussfolgert werden (99): Hier wanderten ASC, die in Sekundärantworten generiert worden waren und danach transferiert wurden, unabhängig davon, ob der Rezipientenorganismus sich im Stadium einer Primärantwort oder Sekundärantwort befand, ins Knochenmark.

Diese Ausführungen deuten eine andere, möglicherweise intrinsisch regulierte Migrationsfähigkeit der durch polyklonale-/bystander-Aktivierung generierten ASC an, die den ASC nicht erlaubt, ins Knochenmark zu gelangen.

In der Expression von CD22 zeigen sich Unterschiede zwischen polyklonal-bystander-/aktivierten und spezifisch aktivierten Zellen

Neben der Migrationsfähigkeit der ASC sollte auch über deren Morphologie mögliche Unterschiede festgestellt werden. Als negativer Regulator der B-Zellfunktion wurde hier ein Corezeptor des BCR, CD22 untersucht.

Der BCR auf der Oberfläche der B-Zellen kann über transmembranöse Signale eine Änderung von Genexpression ins Zellinnere weiterleiten, die zu einer Aktivierung der Zelle führen kann, aber auch zu Anergie oder Apoptose der B-Zelle (55). Für den BCR wiederum gibt es Korezeptoren, die diese Signale positiv oder negativ beeinflussen können. Neben dem FcγII-Rezeptor und CD72 ist auch CD22 solch ein negativer Regulator (102).

In dieser Arbeit wurden die ASC auf ihre Expression von CD22 untersucht. Dabei wurde in Ovalbumin-immunisierten Tieren ein Anstieg an Ovalbumin-negativen, CD22-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Tieren ohne Ovalbumin-Immunisierung festgestellt (Abb.20).

CD22 wird auf B-Zellen in unterschiedlicher Stärke im Laufe Ihrer Entwicklung exprimiert, beginnend mit niedriger Expression im Stadium der Pre-B-Zelle. Reife B-Zellen in der Milz und Knochenmark weisen die höchsten Level an CD22 auf. Nach Aktivierung der Zelle über den BCR verringert sich jedoch die Expression von CD22.

Wird CD22 exprimiert, kann es als Co-Rezeptor des BCR die oben beschriebene Funktion negativer Regulation erfüllen. Über Rekrutierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 im Zellinnern werden verschiedene hemmende Vorgänge in Gang gesetzt, wie zum Beispiel ein massiver Ausstrom von Ca^{2+} aus der Zelle (102, 104, 130, 131), die die Schwelle bis zur Übertragung eines BCR-Signals erhöhen. In Zellkulturexperimenten von Lajaunias et al. (130) und Erickson et al. (132) wurde deutlich, dass die Regulation von CD22 von der Art der Stimulus abhängt. Während von anti-IgM Antikörper aktivierte B-Zellen CD22 verminderten, stieg dessen Expression bei Aktivierung ohne Einbezug des BCR mit LPS, anti-CD40 Antikörper oder IL-4 an. Mit CD22 besitzt die B-Zelle also vermutlich einen negativen Feedback-Mechanismus um ungewollte Aktivierung von B-Zellen, die zu Antikörpern niedriger Affinität oder autoreaktiven Antikörpern führen, zu verhindern. Im Gegensatz dazu führt eine Aktivierung der B-Zellen durch den BCR über niedrigere CD22 Level zu geringerer Inhibition, was die Antigenantwort fördert.

Diese Überlegung wird unterstützt von der Beobachtung, dass CD22-defiziente Mäuse nach Immunisierung eine stärkere Immunantwort zeigen als Kontrolltiere sowie meist höhere Titer von gegen DNA gerichteten Autoantikörpern aufweisen (133).

Dass auch in der Population Ovalbumin-negativer ASC ein Anstieg von CD22 zu verzeichnen ist (Abb.20), liefert einen Hinweis auf ein niedrigeres Aktivitätsniveau der durch polyklonale-/bystander-Aktivierung entstandenen Zellen.

Abschätzung des Beitrages von polyklonal-/bystanderaktivierten Plasmazellen zum Langzeitantikörpertiter

Geht man von den 500 Ovalbuminantikörper sezernierenden Zellen aus, die durch NP/CpG-Immunisierung entstanden sind, bzw in der Milz nachweisbar geworden sind, so würde ihr An-

teil an den Ovalbumin-spezifischen Knochenmarksplasmazellen 5% betragen, vorausgesetzt es gelingt allen Zellen, ins Knochenmark zu wandern.

Unter der Annahme, dass die residenten langlebigen Knochenmarksplasmazellen mit der Zeit langsam weniger werden, jedoch durch Plasmazellen aus polyklonaler-/bystander-Aktivierung ersetzt werden, kann man berechnen, wann die Hälfte des Plasmazellpools aus diesen Zellen bestehen wird.

Dafür ist es aber notwendig zu wissen wie oft der Organismus überhaupt eine Infektion durchmacht, die stark genug ist, um zu einer polyklonalen-/bystander-Aktivierung zu führen.

Dass die täglichen Kontakte mit Pathogenen nicht zu solchen Immunreaktionen führen, in denen polyklonale-/bystander-aktivierte Plasmazellen entstehen, kann man aus den Studien ableiten, die Bernasconi et al durchführten (51). Hier konnten Plasmazellen „anderer Spezifitäten“, d.h. hier nicht spezifisch für das in der Immunisierung verwendete Antigen, im Blut nur im unmittelbaren Anschluss an eine intravenöse Immunisierung in relevanten Zahlen nachgewiesen werden. Der alltägliche Kontakt mit Pathogenen in der Umwelt der Menschen reicht nicht zur Stimulation von Gedächtniszellen aus, um das in dieser Studie durch intravenöse Antigenapplikation erzeugte Ausmaß der polyklonalen-/bystander-Aktivierung zu erreichen. Untersuchungen von Spenderblut einer Blutbank ergaben, dass in ungefähr jeder zwanzigsten Blutprobe eine Erhöhung von polyklonalen Plasmazellen gefunden wird (134). Sind an einem beliebigen Tag 5% der Blutproben einer repräsentativen Spendergruppe plasmazellerhöht, kann man davon ausgehen, dass auch in einem beliebigen Spender die Wahrscheinlichkeit einer Plasmazellerhöhung 5% ist. So kann man weiter davon ausgehen, dass in 365 Tagen verteilt 18 Tage sind, an denen Plasmazellen im Blut erhöht sind. Da man aber weiß, dass nach einer Infektion durchschnittlich 2 Tage lang eine Erhöhung der Plasmazellen im peripheren Blut gefunden werden kann, ergibt sich aus diesen Zahlen ein Schätzwert von 9 Infektionen im Jahr, die dazu führen, dass Plasmazellen in der Peripherie nachgewiesen werden können. Unter diesen Plasmazellen sind jedoch wahrscheinlich viele IgA-sezernierende Zellen, die aus lokalen mukosalen Immunreaktionen stammen, so dass die Zeitabstände zwischen Infektionen, die in Milz oder Lymphknoten eine polyklonale-/bystander-Aktivierung auslösen wahrscheinlich eher länger sind. Auch in der Literatur ist ein Schätzwert von 4 Infektionen pro Jahr angegeben, der sich also in der gleichen Größenordnung befindet (135).

Kommt es also maximal zehn Mal im Jahr zu einer Infektion, die 5% der Knochenmarksplasmazellen durch polyklonale-/bystander-Aktivierung ersetzt, so würden nach einem Jahr 50% der Knochenmarksplasmazellen aus diesen Plasmazellen bestehen.

Hierbei handelt es sich jedoch um eine Maximalabschätzung, da die Ergebnisse dieser Arbeit nicht zeigen, dass die durch polyklonale-/bystander-Aktivierung entstandenen Plasmazellen überhaupt ins Knochenmark wandern.

Abschließend kann also davon ausgegangen werden, dass polyklonale-/bystander-Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen stattfindet. Aufgrund der geringen Aktivierungsfrequenz muß eine Akkumulation der Zellen gewährleistet sein, um einen quantitativen Einfluß auf den Antikörpertiter im Blut zu haben. Da davon ausgegangen wird, dass Plasmazellen nur im Knochenmark lange überleben, ist eine wichtige Frage, ob die polyklonal-/bystander-aktivierten Zellen dorthin wandern können. Dieser Sachverhalt konnte nicht abschließend geklärt werden, und muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.
Unter Annahme der Wanderungsfähigkeit ins Knochenmark kommt man über eine Maximalabschätzung zu einem Zeitraum von 1 Jahr, nach dem der Langzeitantikörpertiter zu 50% von polyklonal-/bystander-aktivierten Zellen getragen werden könnte, und ohne Kontakt zum eigentlichen Antigen weiter aufrechterhalten werden kann.
Dass das Verständnis dieser Mechanismen auch von klinischer Relevanz ist, wird bei der Entwicklung neuer Impfstoffe deutlich, die zu einer möglichst lange anhaltenden Immunität führen sollen, genauso wie bei den Überlegungen zur Entwicklung von Impfstrategien.

7 Zusammenfassung

Die Antikörperproduktion gegen eingedrungene Pathogene oder Impfantigene wird oft über viele Jahre aufrechterhalten, auch nachdem der Organismus die akute Infektion überwunden hat, bzw. kein weiterer Kontakt zum Impfantigen besteht. Obwohl dieses Phänomen schon lange und oft beschrieben wurde, gibt es eine noch immer andauernde Diskussion über die zugrunde liegenden Mechanismen.

Da Antikörper mit einer Halbwertszeit von 2-3 Wochen im Körper abgebaut werden, muß eine kontinuierliche Antikörperproduktion gewährleistet sein, um einen Langzeitantikörpertiter aufrechtzuerhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine aktuelle Hypothese untersucht, die diese kontinuierliche Antikörperproduktion erklärt, nämlich die Generierung von Plasmazellen durch polyklonale-/bystander-Aktivierung. Diese Theorie basiert auf der Beobachtung, dass in vitro eine unspezifische Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen möglich ist, und in vivo im Rahmen von systemischen Immunantworten Plasmazellen anderer Spezifitäten im Blut auftauchen.

In der Arbeit wurde ein Mausmodell etabliert, in welchem die Effekte polyklonaler-/bystander-Aktivierung unter physiologischen Bedingungen untersucht werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Impfung mit Ovalbumin oder NP und CpG eine polyklonale-/bystander-Aktivierung in diesem Mausmodell ausgelöst werden kann, die sowohl mittels BrdU-Markierung proliferierender Zellen als auch numerisch nachgewiesen wurde.

Hauptsächlich werden dabei Gedächtnis-B-Zellen aktiviert, die aus vorhergehenden Immunreaktionen im Organismus vorhanden sind.

Die Anzahl der neu entstandenen Plasmazellen ist jedoch sehr gering. Verglichen mit einer durch Antigen spezifisch ausgelösten Immunantwort beträgt der Effekt einer polyklonalen-/bystander-Aktivierung 5%. Sowohl kurzfristig als auch nach Wochen konnte kein signifikanter Beitrag zum Antikörpertiter im Serum nach polyklonaler-/bystander-Aktivierung nachgewiesen werden.

Darüber hinaus sind die durch diesen Mechanismus entstandenen Plasmazellen nur in einem begrenzten Zeitraum in der Milz nachweisbar. Im Knochenmark konnten sie zu keinem Zeitpunk detektiert werden.

Das Erreichen des Knochenmarks ist jedoch essentiell wichtig für das längerfristige Überleben der Plasmazellen, und nur durch dieses Überleben ist eine Akkumulation der polyklonal-/bystander-aktivierten Plasmazellen möglich. Eine Maximalabschätzung -unter Annahme der

Wanderungsfähigkeit ins Knochenmark- ergibt einen Zeitraum von einem Jahr, nach dessen Ablauf 50% des Pools der Plasmazellen im Knochenmark von polyklonal-/bystander-aktivierten Plasmazellen ersetzt sein könnte.

Die Ergebnisse der hier gezeigten Untersuchungen machen deutlich, dass polyklonale-/bystander-Aktivierung zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters beitragen kann. Sie zeigen jedoch auch, dass dessen Effekte nicht nach Tagen, sondern frühestens nach Monaten tragen, und nur unter der Voraussetzung dass die Plasmazellen als langlebige Zellen ins Knochenmark gelangen.

Zu verstehen, wie der Stellenwert der unterschiedlichen Mechanismen zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantkörpertiters einzuschätzen ist, hat klinische Bedeutung nicht nur in der Entwicklung neuer Impfstoffe, sondern auch für den Aufbau von zukünftigen Impfstrategien z.B. zur Verhinderung von Reinfektionen der erwachsenen Bevölkerung.

8 Literatur

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-8
2. Finley JHJ. 1951. *The complete writings of Thucydides: The Peleponnesian War*. New York: Modern Library
3. Pasare C, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* 16: 23-6
4. Pasare C, Medzhitov R. 2005. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438: 364-8
5. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-5
6. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26: 347-62
7. Rajewsky K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-8
8. Fagarasan S, Honjo T. 2000. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 290: 89-92
9. Peter HH. 1991. *Klinische Immunologie*. München: Urban und Schwarzenberg
10. Roitt IM. 1995. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Stuttgart: Thieme
11. Calame KL. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2: 1103-8.
12. Bishop GA, Haxhinasto SA, Stunz LL, Hostager BS. 2003. Antigen-specific B-lymphocyte activation. *Crit Rev Immunol* 23: 149-97
13. Grewal IS, Flavell RA. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153: 85-106
14. O'Connor BP, Gleeson MW, Noelle RJ, Erickson LD. 2003. The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev* 194: 61-76
15. Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. 1996. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 26: 444-8
16. MacLennan IC, Garcia de Vinuesa C, Casamayor-Palleja M. 2000. B-cell memory and the persistence of antibody responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 345-50
17. Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM. 1995. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7: 349-54
18. Junqueira C. 1996. *Histologie*. Berlin: Springer-Verlag
19. Helmreich E, Kern M, Eisen HN. 1961. The secretion of antibody by isolated lymph node cells. *J Biol Chem* 236: 464-73
20. Hibi T, Dosch HM. 1986. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. *Eur J Immunol* 16: 139-45
21. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. 1989. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1: 27-35
22. Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL. 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* 200: 967-77

23. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19: 607-20
24. Shapiro-Shelef M, Lin KI, Savitsky D, Liao J, Calame K. 2005. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med* 202: 1471-6
25. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194: 45-56
26. Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, Berek C, Hiepe F, Krenn V, Radbruch A, Manz RA. 2001. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 31: 2726-32.
27. Kunkel EJ, Butcher EC. 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3: 822-9
28. Sze DM, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192: 813-21.
29. Paul Wea. 2003. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
30. Manz RA, Lohning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A. 1998. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 10: 1703-11.
31. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8: 363-72.
32. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, Manz RA. 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: 1277-82
33. Levy M, Vieira P, Coutinho A, Freitas A. 1987. The majority of "natural" immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes. *Eur J Immunol* 17: 849-54
34. Makela O, Nossal GJ. 1962. Autoradiographic studies on the immune response. II. DNA synthesis amongst single antibody-producing cells. *J Exp Med* 115: 231-44
35. Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help- dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13263-8.
36. Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. 1986. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol* 16: 1297-301
37. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388: 133-4.
38. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14: 517-21
39. Manz RA, Radbruch A. 2002. Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 32: 923-7.
40. Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, Muehlinghaus G, Szyska M, Radbruch A, Manz RA. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171: 1684-90
41. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23: 367-86
42. Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. 2002. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol* 169: 4213-21

43. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20: 707-18
44. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dorner T. 2004. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilisation of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*
45. Behbehani AM. 1984. Rhazes. The original portrayer of smallpox. *Jama* 252: 3156-9
46. Richter-Bernburg L. 1994. Abu Bakr Muhammad al-Razi's (Rhazes) medical works. *Med Secoli* 6: 377-92
47. Heyman B. 2000. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 709-37
48. Gray D, Skarvall H. 1988. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336: 70-3
49. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 11: 172-9
50. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101: 4500-4
51. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298: 2199-202
52. McHeyzer-Williams MG. 1997. Immune response decisions at the single cell level. *Semin Immunol* 9: 219-27
53. Vitetta ES, Berton MT, Burger C, Kepron M, Lee WT, Yin XM. 1991. Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol* 9: 193-217
54. Ahmed R, Gray D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272: 54-60
55. Janeway CA. 2002. *Immunologie 5. Auflage*. Heidelberg
56. Schittek B, Rajewsky K. 1990. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346: 749-51
57. Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. 2000. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407: 636-42
58. Panum PL. 1989. Observations made during the epidemic of measles on the Faroer Islands in the year 1846. *Med. Classics* 3: 829-86
59. Paul JR, Riordan JT, Melnick JL. 1951. Antibodies to three different antigenic types of poliomyelitis virus in sera from North Alaskan Eskimos. *Am J Hyg* 54: 275-85
60. Sawyer WA. 1931. *J. Prev. Med.*: 413-28
61. Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. 2003. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 171: 4969-73
62. Scheibel I, Bentzon MW, Christensen PE, Biering A. 1966. Duration of immunity to diphtheria and tetanus after active immunization. *Acta Pathol Microbiol Scand* 67: 380-92
63. Cohen D, Green MS, Katzenelson E, Slepon R, Bercovier H, Wiener M. 1994. Long-term persistence of anti-diphtheria toxin antibodies among adults in Israel. Implications for vaccine policy. *Eur J Epidemiol* 10: 267-70
64. Simonsen O, Kjeldsen K, Heron I. 1984. Immunity against tetanus and effect of revaccination 25-30 years after primary vaccination. *Lancet* 2: 1240-2
65. Kjeldsen K, Simonsen O, Heron I. 1985. Immunity against diphtheria 25-30 years after primary vaccination in childhood. *Lancet* 1: 900-2

66. el-Ad B, Roth Y, Winder A, Tochner Z, Lublin-Tennenbaum T, Katz E, Schwartz T. 1990. The persistence of neutralizing antibodies after revaccination against smallpox. *J Infect Dis* 161: 446-8
67. Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. 1995. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol* 69: 1895-902
68. Gray D. 2002. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat Rev Immunol* 2: 60-5
69. McNeal MM, Ward RL. 1995. Long-term production of rotavirus antibody and protection against reinfection following a single infection of neonatal mice with murine rotavirus. *Virology* 211: 474-80
70. Slifka MK, Ahmed R. 1996. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol* 4: 394-400
71. Fahey JL, Sell S. 1965. The Immunoglobulins of Mice. V. The Metabolic (Catabolic) Properties of Five Immunoglobulin Classes. *J Exp Med* 122: 41-58
72. Talbot PJ, Buchmeier MJ. 1987. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* 60: 485-9
73. Vieira P, Rajewsky K. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18: 313-6
74. Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 1995. Pathogenetic aspects of measles virus infections. *Vet Microbiol* 44: 113-25
75. Baczko K, Liebert UG, Billeter M, Cattaneo R, Budka H, ter Meulen V. 1986. Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol* 59: 472-8
76. Chantler JK, Ford DK, Tingle AJ. 1981. Rubella-associated arthritis: rescue of rubella virus from peripheral blood lymphocytes two years postvaccination. *Infect Immun* 32: 1274-80
77. Bachmann MF, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1994. Regulation of IgG antibody titers by the amount persisting of immune-complexed antigen. *Eur J Immunol* 24: 2567-70
78. Tew JG, DiLosa RM, Burton GF, Kosco MH, Kupp LI, Masuda A, Szakal AK. 1992. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol Rev* 126: 99-112.
79. Gray D. 1993. Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 11: 49-77
80. Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1996. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183: 2259-69
81. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14: 333-67
82. Benner R, Hijmans W, Haaijman JJ. 1981. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol* 46: 1-8
83. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Lang JE, Heath V, Craddock CG. 1972. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol* 109: 1386-94
84. Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. 1998. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J Exp Med* 187: 885-95
85. Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. 1997. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo J* 16: 2996-3006

86. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, Webster AD. 2003. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2146-54
87. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350: 2572-81
88. Jerne NK. 1984. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 79: 5-24
89. Berchtold P. 1989. [Antibodies as antigens--idiotypes and idiotypic networks]. *Schweiz Med Wochenschr* 119: 1577-82
90. Krieg AM. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-60
91. Traggiai E, Puzone R, Lanzavecchia A. 2003. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine* 21 Suppl 2: S35-7
92. Silverstein AM, Rose NR. 2003. On the implications of polyclonal B cell activation. *Nat Immunol* 4: 931-2; author reply 2
93. Manz RA, Cassese G, Thiel A, Radbruch A. 1999. Long-lived plasma cells survive independent of antigen. *Curr Top Microbiol Immunol* 246: 71-4
94. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9
95. Schmitz G, Rothe,G. 1994. *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer
96. Luttmann W, Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. 2004. *Der Experimentator:Immunologie*. München: Elsevier GmbH
97. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65: 109-21.
98. Sardinha LR, D'Imperio Lima MR, Alvarez JM. 2002. Influence of the polyclonal activation induced by Plasmodium chabaudi on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses. *Scand J Immunol* 56: 408-16
99. Hauser AE. 2003. *Chemotaxis von IgG-sezernierenden Zellen in der Maus*. Freie Universität Berlin, Berlin
100. Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D, Radbruch A, Hiepe F, Manz RA. 2004. Short-lived Plasmablasts and Long-lived Plasma Cells Contribute to Chronic Humoral Autoimmunity in NZB/W Mice. *J Exp Med* 199: 1577-84
101. Pereira P, Forni L, Larsson EL, Cooper M, Heusser C, Coutinho A. 1986. Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol* 16: 685-8
102. Nitschke L. 2005. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* 17: 290-7
103. Cyster JG. 2003. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* 194: 48-60
104. Stoddart A, Ray RJ, Paige CJ. 1997. Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. *Int Immunol* 9: 1571-9
105. MacLennan IC. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12: 117-39
106. Ridderstad A, Tarlinton DM. 1998. Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *J Immunol* 160: 4688-95
107. Slifka MK, Ahmed R. 1998. B cell responses and immune memory. *Dev Biol Stand* 95: 105-15
108. Plotkin SA, Mortimer, E. A. 1994. *Vaccines*. Orlando, Florida
109. Fields BN. 2001. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins

110. Schooley JC. 1961. Autoradiographic observations of plasma cell formation. *J Immunol* 86: 331-7
111. Schittek B, Rajewsky K, Forster I. 1991. Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency. *Eur J Immunol* 21: 235-8
112. Goz B. 1977. The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol Rev* 29: 249-72
113. Reome JB, Johnston DS, Helmich BK, Morgan TM, Dutton-Swain N, Dutton RW. 2000. The effects of prolonged administration of 5-bromodeoxyuridine on cells of the immune system. *J Immunol* 165: 4226-30
114. Rocha B, Penit C, Baron C, Vasseur F, Dautigny N, Freitas AA. 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: 1697-708
115. Jecker P, Beuleke A, Dressendorfer I, Pabst R, Westermann J. 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
116. Fesel C, Goulart LF, Silva Neto A, Coelho A, Fontes CJ, Braga EM, Vaz NM. 2005. Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protection in human Plasmodium infection. *Malar J* 4: 5
117. Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M, Weigle WO. 1980. Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* 124: 121-6
118. Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2003. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol* 4: 343-9
119. Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, Rasmussen W, Davis HL, Waldschmidt M, Weiner GJ. 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 167: 4878-86
120. Haaijman JJ, Schuit HR, Hijmans W. 1977. Immunoglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its life-span. *Immunology* 32: 427-34
121. Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. 2005. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* 201: 545-54
122. Hofer T, Muehlinghaus G, Moser K, Yoshida T, H EM, Hebel K, Hauser A, Hoyer B, E OL, Dorner T, Manz RA, Hiepe F, Radbruch A. 2006. Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 211: 295-302
123. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. 2005. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23: 487-513
124. Bosma MJ, Carroll AM. 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9: 323-50
125. Dorner T, Radbruch A. 2005. Selecting B cells and plasma cells to memory. *J Exp Med* 201: 497-9
126. O'Connor BP, Cascalho M, Noelle RJ. 2002. Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population. *J Exp Med* 195: 737-45
127. Helmby H, Jonsson G, Troye-Blomberg M. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi AS. *Infect Immun* 68: 1485-90
128. Harris ED, Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 322: 1277-89
129. Mallison SM, 3rd, Szakal AK, Ranney RR, Tew JG. 1988. Antibody synthesis specific for nonoral antigens in inflamed gingiva. *Infect Immun* 56: 823-30

130. Lajaunias F, Nitschke L, Moll T, Martinez-Soria E, Semac I, Chicheportiche Y, Parkhouse RM, Izui S. 2002. Differentially regulated expression and function of CD22 in activated B-1 and B-2 lymphocytes. *J Immunol* 168: 6078-83
131. Nitschke L, Floyd H, Ferguson DJ, Crocker PR. 1999. Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J Exp Med* 189: 1513-8
132. Erickson LD, Tygrett LT, Bhatia SK, Grabstein KH, Waldschmidt TJ. 1996. Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells. *Int Immunol* 8: 1121-9
133. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274: 798-801
134. Mei H et al.. In personal communication, Manuscript in preparation.
135. Hofer T, Muehlinghaus G, Moser K, Yoshida T, H EM, Hebel K, Hauser A, Hoyer B, E OL, Dorner T, Manz RA, Hiepe F, Radbruch A. 2006. Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 211: 295-302

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Alum	Aluminium-Magnesium-Hydroxid
ASC	Antigen sezernierende Zelle
Balb/c	Bragg (Züchter), albino (Farbe)
BCR	B-Zell Rezeptor
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CpG	unmethylierte cytidyl-guanosyl-Sequenzen
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc Teil	Fragment crystallizable
i.c.	intrazellulär (engl. intracellular)
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
Log_2	Logarithmus zur Basis 2
min	Minuten
ml	Milliliter
NP	4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl
Ova	Ovalbumin
PAMP	Pathogen associated molekular patterns
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrine
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex
RER	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
pH	Lat. potentia hydrogenii, übers.:Stärke des Wasserstoffs
rpm	Umdrehungszahl (rounds per minute)
s.f.	oberflächlich (engl. surface)
spf	Spezifisch-pathogenfrei
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor-nekrose-Faktor α
Vgl.	vergleiche

10 Danksagung

Für die Förderung der Arbeit, die Überlassung des Themas und die ständige Begleitung möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Rudi Manz bedanken. Durch seine intensive Betreuung, tiefgehende Diskussionen und kritisches Hinterfragen ermöglichte er mir umfassende Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten im Bereich der Immunologie.
Anette Peddinghaus möchte ich danken für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen technischen Fragen und die vielen wertvollen Ratschläge für die Laborarbeit.
Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Anja Hauser, die mir durch ihr weites Wissen und eine liebevolle Art den Einstieg in das Thema sehr erleichtert hat.
Der ganzen Gruppe „humorale Immunologie“ mit Bimba Hoyer, Katrin Moser, Miro Mostarac, Gwendolin Mühlinghaus, Daniel Panne, Martin Syszka, Caro Voigt, Oliver Winter und Luisa Cigliano bin ich sehr dankbar für die fachliche Unterstützung und die so gute Arbeitsatmosphäre. Die vielen fröhlichen Stunden im Labor werde ich in guter Erinnerung behalten.
Dörte Huscher möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Freund Patrick Jesse, der mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt, aufgemuntert und fürsorglich begleitet hat.
Meinen Eltern und Geschwistern danke ich von ganzem Herzen, denn ohne ihre großartige Unterstützung und ermutigenden Gespräche wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

12 Erklärung

„Ich, Julia Charlotte Unseld, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Der Beitrag von polyklonaler-/bystander-Aktivierung zur Aufrechterhaltung eines Langzeitantikörpertiters* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, den 31. August 2007

Julia Charlotte Unseld