

**Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Charakterisierung der germinalen  
Zentrumsreaktion beim Huhn und deren  
Beeinflussung durch das Zytokin chBAFF**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Susanne Hainke  
aus Kusel

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Korbel

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

*Für meinen größten Schatz Benni.*

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IX
TABELLENVERZEICHNIS .....	XII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1 DAS HUMORALE ADAPTIVE IMMUNSYSTEM.....	4
2.1.1 Der membranständige B-Zellrezeptor und die sezernierten Immunglobuline.....	4
2.1.2 Die Entstehung des primären B-Zellrepertoires .....	7
2.1.3 B-Zelllinien und Subtypen .....	14
2.1.4 Sekundäre Diversifikation des B-Zellrepertoires in germinalen Zentren .....	15
2.1.4.1 Entstehung von GCs.....	16
2.1.4.2 Morphologie von GCs.....	18
2.1.4.3 Somatische Hypermutation und Affinitätsreifung.....	23
2.1.4.4 Immunglobulinklassenwechsel .....	25
2.2 DAS HUMORALE ADAPTIVE IMMUNSYSTEMS DES HAUSHUHNES .....	27
2.2.1 Entstehung des primären B-Zellrepertoires.....	27
2.2.2 GCs.....	30
2.3 DIE FUNKTION DES ZYTOKINS B-ZELL-AKTIVIERUNGSFAKTOR DER TUMOR NEKROSE FAKTOR-FAMILIE (BAFF).....	36
2.3.1 Das BAFF-System.....	36
2.3.1.1 Liganden .....	36
2.3.1.2 Rezeptoren .....	37
2.3.1.3 BAFF-Signale in die B-Zelle .....	37
2.3.1.4 Expression von BAFF, APRIL und ihren Rezeptoren.....	38
2.3.1.5 Phänotyp defizienter und transgener Mäuse.....	39
2.3.1.6 Bedeutung von BAFF in der B-Zellhomöostase und Toleranz .....	40
2.4 DIE BEDEUTUNG VON BAFF IM HAUSHUHN .....	41
2.4.1 Das chBAFF-System des Haushuhnes .....	41
2.4.1.1 Liganden .....	41
2.4.1.2 Rezeptoren .....	41
2.4.1.3 Expression von chBAFF und seinen Rezeptoren .....	42
2.4.1.4 <i>In vitro</i> -Daten zum Einfluß von chBAFF.....	43
2.4.1.5 Phänotyp defizienter und chBAFF-überexprimierender Hühner.....	43
<b>3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>46</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>47</b>
4.1 TIERE UND TIERHALTUNG .....	47
4.1.1 Herkunft der Tiere.....	47
4.1.1.1 Hühner .....	47
4.1.1.2 Enten .....	47
4.1.1.3 Zebrafinken.....	47
4.1.2 Tierhaltung .....	47
4.2 IMMUNISIERUNGEN UND PROBENNAHME .....	48
4.2.1 Material .....	48
4.2.2 Durchführung .....	48
4.2.2.1 Immunisierungen mit DNP-KLH.....	48
4.2.2.2 Immunisierungen mit Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen.....	49
4.2.2.2.1 Einmalige intravenöse Immunisierung.....	49
4.2.2.2.2 Immunisierung zur Etablierung eines Standardserums.....	49

4.3	BRdU- UND THYMIDIN-BEHANDLUNG.....	50
4.3.1	Material .....	50
4.3.2	Durchführung .....	50
4.3.2.1	BrdU-Gabe i.p.....	50
4.3.2.2	BrdU-Gabe i.v.....	50
4.3.2.3	Block der BrdU-Einlagerung durch Thymidin-Gabe .....	51
4.4	HISTOLOGIE .....	51
4.4.1	Vorbereitung der Gewebeproben für die Histologie, Erstellen von Gewebeschnitten ....	51
4.4.1.1	Material.....	51
4.4.1.2	Durchführung.....	52
4.4.1.2.1	Probeneinbettung.....	52
4.4.1.2.2	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	53
4.4.1.2.3	Vorbereitung der Schnitte für die Färbung .....	53
4.4.2	Histologische Färbungen.....	53
4.4.2.1	Material.....	53
4.4.2.2	Durchführung.....	54
4.4.2.2.1	H&E-Färbung.....	54
4.4.3	Immunhistochemische Einfachfärbungen .....	54
4.4.3.1	Material.....	54
4.4.3.2	Durchführung.....	57
4.4.4	Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten .....	58
4.4.4.1	Material.....	58
4.4.4.2	Durchführung.....	61
4.4.4.2.1	Doppelfärbungen mit einer direkten und einer indirekten Färbung.....	61
4.4.4.2.2	Doppelfärbungen mit zwei indirekten Färbungen .....	62
4.4.4.2.3	Färbungen mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper und einem biotinylierten Sekundärantikörper und Streptavidin-FITC .....	63
4.4.5	Immunhistochemische Doppelfärbungen von Gefrierschnitten für die Quantifizierung der GC-Zahl und -Fläche.....	64
4.4.5.1	Material.....	64
4.4.5.2	Durchführung.....	65
4.4.6	Quantifizierung der GC-Zahl und -Fläche.....	66
4.4.7	Fotodokumentation der histologischen und immunhistologischen Färbungen.....	67
4.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	67
4.5.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl in Vollblut .....	67
4.6	ELISA.....	67
4.6.1	Material .....	67
4.6.2	Durchführung .....	71
4.6.2.1	Quantitativer ELISA zur Detektion RPAP-spezifischer Antikörper .....	71
4.6.2.2	ELISA zur Detektion von chBAFF .....	72
4.6.2.3	ELISA zur Detektion von huBCMA .....	73
4.7	GENERIERUNG RCASBP(A) CHBAFF, RCASBP(A) HUBCMA, UND RCASBP(A) CHBAFFREVERS TRANSDUZIERTER HÜHNER.....	74
4.7.1	Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF).....	74
4.7.1.1	Material.....	74
4.7.1.2	Durchführung.....	75
4.7.2	Kultivieren von primären Hühnerembryofibroblasten .....	75
4.7.2.1	Material.....	75
4.7.2.2	Durchführung.....	75
4.7.2.2.1	Kultivieren von Zellen.....	75
4.7.2.2.2	Einfrieren von Zellen.....	76
4.7.2.2.3	Auftauen von Zellen .....	76
4.7.3	Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten .....	76

4.7.3.1	Material.....	76
4.7.3.2	Durchführung.....	77
4.7.4	Transduktion von Hühnerembryonen.....	78
4.7.4.1	Material.....	78
4.7.4.2	Durchführung.....	78
4.7.4.2.1	Vorbereitung der Zellen.....	78
4.7.4.2.2	Injektion in embryonierte Eier.....	78
4.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	79
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>80</b>
5.1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON GCs IN DER HÜHNERMILZ.....	80
5.1.1	Morphologie von GCs aus der Milz ausgesuchter Vogelarten.....	80
5.1.2	Phänotypisierung der Zellen des germinalen Zentrums des Huhnes und der Ente.....	81
5.1.3	Lokalisation von GCs in der Hühnermilz.....	85
5.1.4	Kinetik der Anbildung antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen.....	87
5.1.4.1	Ablagerung des Immunisierungsantigens in der Milz.....	87
5.1.4.1.1	Ablagerung von Immunisierungsantigen in der B-Zellzone und der T-Zellzone der weißen Milzpulpa.....	87
5.1.4.1.2	Ablagerung von Immunisierungsantigen in GCs.....	90
5.1.4.1.2.1	Ablagerung von Antigen im Zentrum von GCs.....	90
5.1.4.1.2.2	Zeitlicher Verlauf der Ablagerung von Antigen im Kontext mit bestimmten Immunglobulinklassen in GCs.....	92
5.1.4.2	Auftreten antigenspezifischer Zellen nach Immunisierung.....	96
5.1.4.2.1	Auftreten antigenspezifischer Zellen in der roten Milzpulpa.....	96
5.1.4.2.2	Auftreten antigenspezifischer GCs.....	99
5.1.4.2.2.1	Phänotyp antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz.....	100
5.1.4.2.2.2	Kinetik der Anbildung antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz.....	105
5.1.5	Kinetik der Bildung antigenspezifischer Antikörper nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen.....	108
5.1.6	B-Zellproliferation im germinalen Zentrum des Huhnes.....	109
5.1.6.1	Verteilung proliferierender Zellen im GC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BrdU-Injektion.....	109
5.1.6.2	Zellbewegungen in GCs des Huhnes.....	112
5.1.6.3	Zellproliferation in GCs weiterer Vogelarten.....	114
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER HUMORALEN IMMUNANTWORT CHBAFF-ÜBEREXPRIMIERENDER UND CHBAFF-DEFIZIENTER HÜHNER NACH IMMUNISIERUNG MIT EINEM T-ZELLABHÄNGIGEN ANTIGEN.....	116
5.2.1	Generierung der chBAFF- und huBCMA-transduzierter Hühner.....	116
5.2.2	Kontrolle der chBAFF- und huBCMA-Expressionsspiegel und des Phänotyps der für die Immunisierungsversuche verwendeten Hühner.....	118
5.2.2.1	ChBAFF- und huBCMA-Spiegel im Blut.....	118
5.2.2.2	Absolute B-Zellzahlen im Blut.....	119
5.2.3	Aufbau der B-Zellregionen in der Milz chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner.....	122
5.2.4	Anbildung antigenspezifischer GCs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen.....	124
5.2.5	Morphologie von GCs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern.....	128
5.2.6	Produktion antigenspezifischen IgMs und IgYs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen.....	130

<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>134</b>
6.1	AUFBAU VON GCs BEIM VOGEL.....	135
6.2	ENTSTEHUNG VON GCs .....	138
6.3	IMMUNGLOBULINEXPRESSION DURCH GC-B-ZELLEN.....	141
6.4	DIE FUNKTION DES ZYTOKINS CHBAFF IN DER GC-REAKTION DES HUHNES .....	143
6.4.1	Einfluss einer chBAFF-Überexpression auf periphere B-Zellen.....	143
6.4.2	Einfluss einer chBAFF-Neutralisation auf periphere B-Zellen .....	146
6.5	AUSBLICK .....	148
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>154</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>166</b>

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungs-induzierte-Cytidineaminase
AP	alkalische Phosphatase
APRIL	Zytokin <i>a proliferation inducing ligand</i>
APRIL <sup>-/-</sup>	APRIL-Knockout
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
B	B-Zelle
BAFF	Zytokin <i>B-cell activating factor of the TNF-family</i>
BAFF <sup>-/-</sup>	BAFF-Knockout
BAFFR	BAFF-Rezeptor
BAFFrv	BAFFrevers
BALT	bronchusassoziiertes lymphatisches Gewebe
BCL-2	Transkriptionsfaktor <i>B-cell-lymphoma 2</i>
BCMA	TNF-Rezeptor <i>B-cell maturation antigen</i>
BCMA <sup>-/-</sup>	BCMA-Knockout
BLyS	<i>b lymphocyte stimulator</i> , Synonym für BAFF
BR3	BAFF-Rezeptor 3, Synonym für BAFFR
BrdU	Bromdeoxyuridin5-Bromo2`deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Bu1	Bu1a und Bu1b
B-Zelle	bursaabhängige Zelle
bzw.	beziehungsweise
C	schwere Kette des Immunglobulins
C <sub>μ</sub>	μ-Schwere-Ketten-Gensegment
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> xH <sub>2</sub> O	Zitronensäuremonohydrat
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAML	<i>calcium modulator and cyclophilin ligand</i>
CCR7	C-C-Chemokinrezeptor Typ 7
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>

CD40	<i>cluster of differentiation 40</i>
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i>
CD40L	CD40-Ligand
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
CDR1-3	<i>complementarity determining region 1-3</i>
CH <sub>3</sub> COONa	Natriumazetat
chB6.1 und chB6.2	Bu1a und Bu1b
chBAFF	Hühner-BAFF
chBAFF-Flag	Hühner-BAFF-Protein mit einem Flag-Tag
chBAFFR	Hühner-BAFF-Rezeptor
chBCMA	Hühner-BCMA
chCD3	Hühner-CD3
chCD4	Hühner-CD4
chCD8	Hühner-CD8
chIgA	Hühner-IgA
chIgM	Hühner-IgM
chIgY	Hühner-IgY
chTACI	Hühner-TACI
CXCL12	CXC-Chemokin Typ 12
CXCL13	CXC-Chemokin Typ 13
CXCL21	CXC-Chemokin Typ 21
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor Typ 4
CXCR5	CXC-Chemokinrezeptor Typ 5
C <sub>γ</sub>	γ-Schwere-Ketten-Gensegment
C <sub>ε</sub>	ε-Schwere-Ketten-Gensegment
d	Tag
D	Diversitäts-Segment
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'6'Diamidino-2-phenylindol
D <sub>H</sub>	Diversitäts-Segment der schweren Kette
D <sub>L</sub>	Diversitäts-Segment der leichten Kette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP-KLH	Dinitrophenyliertes <i>Keyhole-Limpet-Hämocyanin</i>
dsDNA	
duCD4	Enten-CD4
dulgA	Enten-IgA
DZ	dunkle Zone
EBI2	<i>Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2</i>
ED18	Embryonaltag 18
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	und andere
FCA	Freund'sches Komplettes Adjuvanz
FCI	Freund'sches Inkomplettes Adjuvanz
FCS	fetales Kälberserum
Fc-Tag	Fc-Teil des Immunglobulins angehängt an ein Protein



Fc-Teil	durch Fc-Rezeptoren erkannter Teil des Immunglobulins
FDC	Follikulär Dendritische Zelle
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GC	germinales Zentrum
GC-B-Zellen	germinale Zentrums B-Zellen
GC-Zellen	germinale Zentrumszellen
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HCL	Salzsäure
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HRP	Meerretichperoxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
huBCMA	menschliches BCMA
huBCMA-huFc	menschliches BCMA-Protein mit dem Fc-Teil des menschlichen IgG
hulgG	menschliches IgG
HZ	helle Zone
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgG H+L	schwere und leichte Kette von IgG
IgG1	Subklasse 1 des Immunglobulins G
IgG2a	Subklasse 2a des Immunglobulins G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y des Huhnes
Ig $\alpha$	Signalprotein alpha der Immunglobulinsuperfamilie
Ig $\beta$	Signalprotein beta der Immunglobulinsuperfamilie
IL- 4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
IL-2	Interleukin 2
IL-21	Interleukin 21
IL-7	Interleukin 7
J	Verbindungs ( <i>Joining</i> ) – Segment
J <sub>H</sub>	Verbindungs ( <i>Joining</i> ) – Segment der schweren Kette
J <sub>L</sub>	Verbindungs ( <i>Joining</i> ) – Segment der leichten Kette
KCl	Kaliumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LMU	Ludwig Maximilians Universität
LSL	<i>Lohmann's Selected Leghorn</i>
LT	Lymphotoxin
M11	Hühnerlinie mit B <sup>2/2</sup> -Haplotyp

MCL1	<i>myeloid cell leukaemia sequence 1</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
msIgG	Mäuse-IgG
MYD88	Adaptorprotein <i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Natiumtetraborat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	Natriumhydrogenphosphatdihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NBF	Neutral gepuffertes Formalin
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NF-κB2	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells 2</i>
N-Nukleotid	beim Rearrangement zufällig eingefügte Nukleotide ohne Matrize
p.I.	nach Immunisierung
PALS	periarteriolen lymphatische Scheide
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
P-Nukleotid	beim Rearrangement eingefügte palindromische Nukleotide
POD	Peroxidase
PWP	Periellipsoidale weiße Pulpa
rb	Kaninchen
rbIgG	Kaninchen-IgG
RCAS	<i>replication competent ASLV – LTR with a splice acceptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPAP	Kaninchen IgG-α-Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium</i>
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
T1-T3	Transitionelle Stadien 1-3
TAC1	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TAC1 <sup>-/-</sup>	TAC1-Knockout
TALL1	<i>TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1</i>
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween <sup>®</sup>
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TLR4	<i>toll-like-receptor 4</i>
TLR7	<i>toll-like-receptor 7</i>
TLR9	<i>toll-like-receptor 9</i>
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRFS17	<i>TNF-superfamily member 17</i>
TNFRSF13B	<i>TNF-superfamily member 13b</i>
TNFRSF13C	<i>TNF-superfamily member 13c</i>
TNFSF13	<i>TNF-superfamily member 13</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>

---

TWE-PRIL	Fusionsprotein aus Anteilen von TWEAK und APRIL
T-Zelle	thymusabhängige Zelle
V	Variables Gensegment
V <sub>H</sub>	Variables Gensegment der schweren Kette
V <sub>L</sub>	Variables Gensegment der leichten Kette
α	anti

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Modell eines Immunglobulinmoleküls.....	5
Abb. 2 Differenzierung in B-Effektorzellen .....	6
Abb. 3 Genlokusse von leichter und schwerer Immunglobulinkette des Menschen vereinfacht .....	8
Abb. 4 Schema der Somatische Rekombination von Immunglobulingenen.....	10
Abb. 5 Immunglobulineffektorklassen und Subklassen von Maus und Mensch.....	11
Abb. 6 An der Entstehung eines germinalen Zentrums beteiligte Chemokine .....	20
Abb. 7 Chemokingradienten innerhalb eines germinalen Zentrums.....	21
Abb. 8 GC aus einer Rattenmilz .....	22
Abb. 9 Immunglobulinklassenwechsel .....	26
Abb. 10 Genkonversion in der Bursa Fabricii .....	29
Abb. 11 Aufbau der weißen Milzpulpa bei Maus und Ratte, Mensch und Huhn .....	32
Abb. 12 Schematischer Vergleich des Aufbaus von Hühner- und Säuger-GCs .....	35
Abb. 13 Färbeschema der immunhistochemischen Doppelfärbung für die Quantifizierung der GC-Zahl und Fläche.....	66
Abb. 14 GCs aus der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink.....	81
Abb. 15 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs aus der Hühnermilz mit Zellmarkern .....	82
Abb. 16 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs aus der Hühnermilz mit Markern gegen Immunglobuline.....	84
Abb. 17 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs der Entenmilz .....	85
Abb. 18 Lage von GCs innerhalb der B- und T-Zellareale der Hühnermilz.....	86
Abb. 19 Lage von GCs innerhalb der PALS-Regionen der Hühnermilz.....	86
Abb. 20 Zeitplan der Immunisierung und Probennahme zur Untersuchung der Kinetik der Anbildung von GCs in der Hühnermilz nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase- Peroxidase-Immunkomplexe .....	87
Abb. 21 Ablagerung von Immunisierungsantigen innerhalb und außerhalb der B- Zellzone der Hühnermilz .....	89
Abb. 22 Ablagerung von Immunisierungsantigen auf gefäßassoziierten FDCs .....	90
Abb. 23 Ablagerung von Antigen erfolgt auf Zellen im Zentrum des germinalen Zentrums.....	91
Abb. 24 Speicherung von Antigen in GCs erfolgt auf 74.3 <sup>+</sup> FDCs .....	92
Abb. 25 Kolokalisation von IgM und Immunisierungsantigen als Immunkomplexe auf FDCs im Zentrum von GCs der Hühnermilz drei Tage nach Immunisierung.....	94

Abb. 26 Simultane Ablagerung von IgM, IgY, IgA und Antigen auf FDCs eines GCs 14 Tage nach Immunisierung .....	95
Abb. 27 Abnahme von GCs mit Antigenablagerungen auf FDCs nach Antigenapplikation bis 28 Tage nach Immunisierung.....	96
Abb. 28 Lokalisation antigenspezifischer Zellen drei Tage nach Immunisierung im Milzgewebe zwischen den B-Zellarealen.....	98
Abb. 29 Nachweis antigenspezifischer Zellen in der Milz .....	100
Abb. 30 Phänotypen von GCs nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen .....	102
Abb. 31 Bindung des Immunisierungsantigens in antigenspezifischen GCs.....	103
Abb. 32 Bindung des Immunisierungsantigens in antigenspezifischen GCs durch antigenspezifische B-Zellen .....	104
Abb. 33 Antigenspezifische B-Zellen in antigenspezifischen GCs und Zellen in GC- artigen Zellansammlungen sind IgM <sup>+</sup> .....	105
Abb. 34 Auftreten antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T- zellabhängigen Antigen .....	106
Abb. 35 Quantifizierung antigenspezifischer GCs.....	107
Abb. 36 Verlauf der antigenspezifischen IgM und IgY-Plasmaspiegel nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen.....	109
Abb. 37 BrdU-Inkorporation in GC-B-Zellen 3h, 7h und 20h nach Injektion .....	111
Abb. 38 Serienschnitte durch zwei GCs zeigen dass die stark proliferierenden B-Zellen das Zentrum der GCs schalenartig umschließen .....	112
Abb. 39 BrdU-markierte GC-B-Zellen wandern von der Peripherie ins GC-Zentrum .....	114
Abb. 40 Vergleichbare Zellproliferationszonen bei stark abweichender Größe der GCs aus der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink .....	115
Abb. 41 Expressionskontrolle der transfizierten Zellkulturüberstände im ELISA .....	117
Abb. 42 Analyse der Expression von chBAFF und huBCMA der zur Immunisierung verwendeten Tiere .....	119
Abb. 43 Veränderung der Größe des peripher im Blut vorhandenen B-Zellpools durch die Überexpression von chBAFF und huBCMA.....	121
Abb. 44 Veränderte Größe der B-Zellregionen in der Milz chBAFF- und huBCMA- überexprimierender Hühner.....	123
Abb. 45 Vergleich der periellipsoidalen weißen Pulpa chBAFF- und huBCMA- überexprimierender Hühner.....	124
Abb. 46 Anbildung antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T- zellabhängigen antigen in chBAFF-überexprimierenden Tieren .....	126
Abb. 47 Anbildung antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T- zellabhängigen Antigen in huBCMA-überexprimierenden Tieren ....	127
Abb. 48 Lokalisation CD4 <sup>+</sup> -T-Helferzellen im Zentrum von Milz-GCs chBAFF- und	

---

huBCMA-überexprimierender Tiere .....	129
Abb. 49 Immunglobuline in GCs chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner .....	129
Abb. 50 BrdU-Inkorporation in GC-B-Zellen 3h nach Injektion .....	130
Abb. 51 Verlauf der antigenspezifischen IgM und IgY-Plasmaspiegel nach Immunsierung mit einem T-zellabhängigen Antigen in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Tieren .....	132
Abb. 52 Schema eines Vogel-GCs modifiziert nach Yasuda et al. [87] .....	138

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1 Unterschiede im Verlauf der Antikörperantwort bei verschiedenen Vertebraten .....	16
Tabelle 2 Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Einfachfärbungen .....	56
Tabelle 3 Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen .....	59
Tabelle 4 Inkubation mit Antigen für Immunfluoreszenzfärbungen .....	60
Tabelle 5 Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen .....	60
Tabelle 6 Verwendete mit FITC markierte Direktkonjugate für Immunfluoreszenzfärbungen .....	61
Tabelle 7 Färbeschemata für Doppelfärbungen mit einer direkten und einer indirekten Färbung .....	62
Tabelle 8 Färbeschemata für Doppelfärbungen mit zwei indirekten Färbungen .....	63
Tabelle 9 Färbeschemata für Färbungen mit Hilfe eines fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpers und eines biotinylierten Sekundärantikörpers und Streptavidin-FITC .....	64
Tabelle 10: Im ELISA verwendete Antikörper .....	70
Tabelle 11 Im ELISA verwendete Zellkulturüberstände .....	71
Tabelle 12 Verdünnungen für IgM und IgY-ELISAs .....	71

## 1 Einleitung

Die Affinität der während einer humoralen Immunantwort gebildeten Antikörper wird im Verlauf der Immunreaktion gesteigert. Somit wird die Antikörperantwort des Organismus dem aufgetretenen Erreger spezifisch angepasst, um ihn möglichst effektiv bekämpfen zu können. Um sich diesen gewonnenen Vorteil zu erhalten, werden langlebige Plasmazellen und B-Gedächtniszellen als Teil des immunologischen Gedächtnisses angebildet. Diese schützen den Organismus bei einem erneuten Auftreten des gleichen Erregers durch die schnelle Produktion hochaffiner spezifischer Antikörper. Die Entwicklung antigenaktivierter B-Zellen zu hochaffinen Plasmazellen bzw. B-Gedächtniszellen findet innerhalb von Germinalen Zentren (GC) in sekundärlymphatischen Organen statt. GCs weisen dazu eine Zonierung in funktionelle Kompartimente auf. In der dunklen Zone proliferieren B-Zellen unter Veränderung der B-Zellrezeptorgene durch somatische Hypermutation. Anschließend wandern diese Zellen in die helle Zone der germinalen Zentren, wo sie mit Antigen und antigenspezifischen T-Helferzellen in Kontakt kommen. Hier findet die Selektion der B-Zellen mit hochaffinen B-Zellrezeptoren statt.

Das Zytokin B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF) stellt einen Überlebensfaktor für B-Zellvorläufer in ihrer Entwicklung zur reifen B-Zelle dar, und beeinflusst auch antigenaktivierte B-Zellen in ihrer Differenzierung zur Plasmazelle. Mäuse, die für BAFF transgen sind, weisen einen stark vergrößerten B-Zellpool auf. Die B-Zellen solcher Tiere zeigen generalisiert einen aktivierten Phänotyp, der mit Autoimmunität assoziiert ist. Diese Aktivierung spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass solche Tiere vermehrt germinale Zentren in sekundärlymphatischen Organen anbauen.

Das Haushuhn als Vertreter der Aves weist eine dem Säuger ähnliche Zonierung der GCs in helle und dunkle Zone auf. Hühner-B-Zellen, die sich im GC entwickeln, nutzen zusätzlich zu der somatischen Hypermutation zu Beginn der germinalen Zentrumsreaktion auch Genkonversion um ihre B-Zellrezeptorgene zu verändern. Auch klonale Selektion der germinalen Zentrums B-Zellen konnte GCs des Huhnes beobachtet werden. Faktoren, die regulatorisch auf die Entwicklung



von B-Zellen innerhalb germinaler Zentren einwirken sind im Huhn bisher nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit soll zum ersten Mal die Funktion des Zytokins Hühner-B-Zell-Aktivierungsfaktor (chBAFF) in der humoralen Immunantwort des Huhnes nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen *in vivo* untersucht werden. Dazu sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten zum physiologischen Ablauf einer T-zellabhängigen Immunantwort gegen ein Modellantigen in chBAFF-defizienten bzw. chBAFF-überexprimierenden Hühner herausgearbeitet werden, um so Rückschlüsse auf die Bedeutung des Zytokins chBAFF für die Entwicklung antigenaktivierten B-Zellen ziehen zu können. Für die geplanten Studien sollen mit Hilfe des retroviralen Vektorsystems RCAS(BP)A chBAFF- bzw. den chBAFF-Dekoy-Rezeptor huBCMA-überexprimierende Hühner verwendet werden.

## 2 Literaturübersicht

Die äussere Haut des Körpers und die inneren Körperoberflächen des Magendarmtraktes, Urogenitaltraktes und der Atemwege bilden eine Barriere zwischen Umwelt und Organismus. Durchdringt ein Erreger diesen Schutzwahl, so hat der Körper umfangreiche Abwehrsysteme zur Kontrolle einer Infektion entwickelt. Schon niedrig entwickelte Lebewesen besitzen ein angeborenes Immunsystem, das unspezifisch auf Fremdes im Körper reagiert. Höher entwickelte Tiere schützen sich zusätzlich durch das erworbene (adaptive) Immunsystem. Das adaptive Immunsystem kann spezifisch eingedrungene Pathogene bekämpfen. Dabei wird gegen den Erreger eine langanhaltende Immunität entwickelt, die als immunologisches Gedächtnis bezeichnet wird [1].

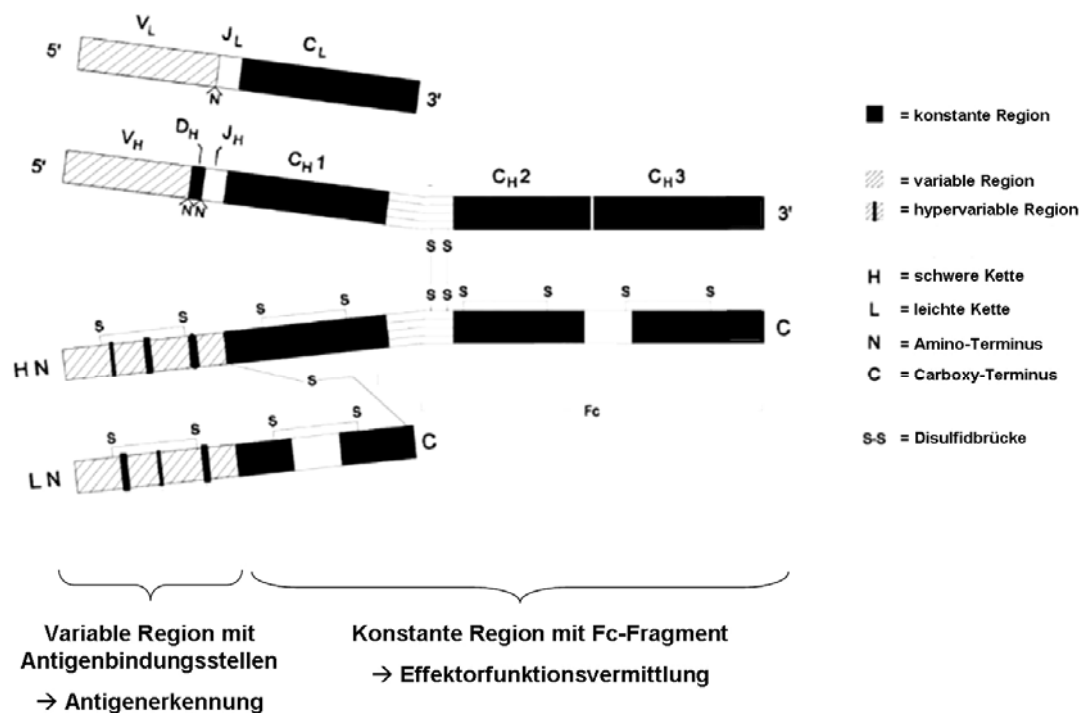
Die B-Zellen des adaptiven Immunsystems übernehmen die Aufgabe, lösliche (humorale) Faktoren - die Antikörper - zu bilden. Die T-Zellen stellen einerseits sogenannte T-Zellhilfe für die antikörperbildenden B-Zellen zur Verfügung, andererseits sind sie für die Beseitigung infizierter Körperzellen zuständig. Zusätzlich übernehmen regulatorische T-Zellen die Kontrolle über die Abwehrmechanismen. Die von den B-Zellen gebildeten Antikörper können Pathogene oder deren Produkte im Körper erkennen. Wird ein körperfremdes Partikel durch Bindung eines Antikörpers markiert, werden Effektormechanismen der Immunabwehr aktiviert. Diese bewirken die Eliminierung des eingedrungenen Fremdantigens [1].

Somit kommt der humoralen Immunantwort durch die B-Zellen des adaptiven Immunsystems eine zentrale Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern im Körper zu. An dieser Stelle wird auch klar, dass zur Vermeidung autoimmuner Reaktionen eine Selektion der B-Zellen stattfinden muß, die ausschließt, dass körpereigene Strukturen erkannt werden [2].

## 2.1 Das humorale adaptive Immunsystem

### 2.1.1 Der membranständige B-Zellrezeptor und die sezernierten Immunglobuline

Eine reife B-Zelle trägt auf ihrer Zelloberfläche membranständige Antikörpermoleküle (Immunglobuline) als B-Zellrezeptoren. Mit diesen Rezeptoren kann sie spezifisch eine bestimmte Struktur (Epitop) eines Antigens erkennen. Ein Immunglobulinmolekül setzt sich aus vier Unterheiten, zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten zusammen. Die Proteine von leichter und schwerer Kette haben jeweils einen konstanten und einen variablen Teil. Die beiden variablen Teile von leichter und schwerer Kette bilden im Antikörpermolekül gemeinsam die Antigenbindungsstelle. Mit diesem Molekülbereich bindet der Antikörper spezifisch, im Sinne des Schlüssel-Schloß-Prinzips, an sein passendes Epitop des Antigens. Die konstanten Teile der Ketten bilden den Effektorfunktionen vermittelnden Anteil des Antikörpermoleküls (Fc-Teil). Der Antikörper kann über seinen Fc-Teil von Fc-Rezeptoren auf weiteren Zellen des Immunsystems gebunden werden. Dies geschieht erst, wenn der Antikörper sein spezifisches Antigen markiert hat. Durch die Bindung an das Antigen erfährt der Antikörper eine Konformationsänderung, die die Fc-Rezeptorbindung ermöglicht. Der Antikörper gebunden an ein Antigen bildet einen Immunkomplex. Somit weist jeder Antikörper zwei identische Antigenbindungsstellen und einen effektorfunktionsvermittelnden Fc-Teil auf (Abb. 1) [3].

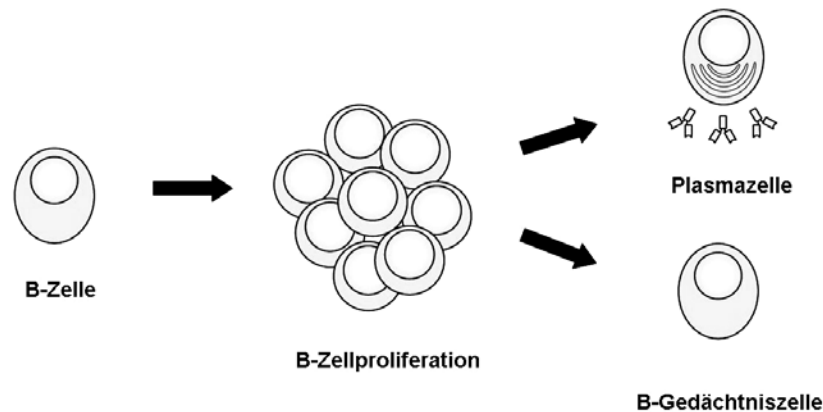


**Abb. 1 Modell eines Immunglobulinmoleküls**

Modifiziert nach Paul's Fundamental Immunology [3].

VL, JL, CL, = variabler, „Joining“- und konstanter Teil der leichten Kette; VH, DH, JH, = variabler, „Diversity“- und „Joining“- Teil der schweren Kette; CH1, CH2, CH3 = konstanter Teil 1-3 der schweren Kette; Fc = Fc-Fragment (siehe 2.1.2).

Erkennt eine reife B-Zelle mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, wird sie aktiviert. Sie vermehrt sich zunächst stark und differenziert sich letztlich zur Effektor-B-Zelle, der Plasmazelle. Die Plasmazelle trägt nun das Antikörpermolekül nicht mehr als Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Sie beginnt hingegen Antikörpermoleküle in das umliegende Gewebe zu sezernieren. Die Antikörper werden über das Blut im Organismus verteilt und können lokal ihre Abwehrfunktion ausüben. Einige der bei der initialen Vermehrung entstandenen antigenspezifischen B-Zellen differenzieren jedoch zunächst zu antigenspezifischen Gedächtnis-B-Zellen. Die Gedächtniszellen behalten die Expression ihres antigenspezifischen B-Zellrezeptors auf der Zelloberfläche bei, produzieren aber keine Antikörper. Sie können jedoch bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger schneller antigenspezifische Plasmazellen hervorbringen als dies bei der Erstantwort der Fall gewesen ist. (Abb. 2) [1].



**Abb. 2 Differenzierung in B-Effektorzellen**  
Modifiziert nach Janeway's Immunobiology [1].

Die von den Plasmazellen gebildeten Antikörper können einerseits eingedrungene Pathogene und deren Produkte neutralisieren. Durch Bindung an Adhäsionsmoleküle der Erreger, welche zur Infektion von Körperzellen nötig sind, können z.B. weitere Zellinfektionen verhindert werden. Durch Bindung an bakterielle Toxine können Antikörper deren schädliche Effekte im Körper unterbinden. Andererseits opsonisieren Antikörper Erreger durch ihre Bindung und aktivieren das Komplementsystem. Das Komplementsystem stellt eine Enzymkaskade dar, die zusätzlich zu den gebundenen spezifischen Antikörpern weitere markierende Proteine auf dem Erreger ablegt. Die Aktivierung der Enzymkaskade des Komplementsystems durch Antikörper wird aber durch Fc-Teile von Antikörpern in Immunkomplexen, nicht durch ungebundene freie Antikörper vermittelt. Die mit Bestandteilen des Komplementsystems markierten Immunkomplexe können über Fc-Rezeptoren und Rezeptoren des Komplementsystems von phagozytierenden Zellen erkannt werden. Die Phagozyten werden von weiteren Proteinen des Komplementsystems chemotaktisch zum Standort des Erregers gelockt. Auf diesem Weg werden Pathogene verstärkt der Phagozytose zugeführt. Die Enzymkaskade des Komplementsystems kann auch Proteine hervorbringen, die extrazelluläre Erreger lysieren können, indem sie die Integrität von deren Zellmembran zerstören [1].

### 2.1.2 Die Entstehung des primären B-Zellrepertoires

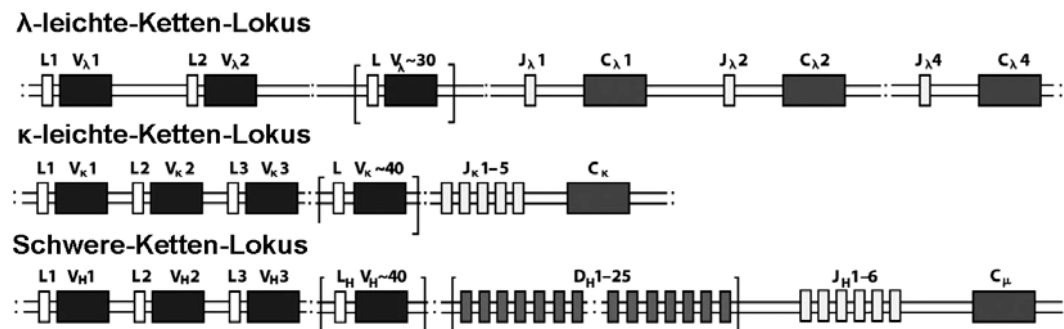
Der Organismus wird im Laufe seines Lebens mit einer Vielzahl von Erregern konfrontiert. Um der hohen Vielfalt möglicher, in den Körper eindringender Pathogene entgegenwirken zu können, entsteht im Körper ein großes B-Zellrepertoire. Jede B-Zelle innerhalb dieses primären Repertoires ist ein Unikat und spezifisch für ein bestimmtes Epitop eines Antigens [3].

Die Spezifität einer B-Zelle ergibt sich durch den einzigartigen B-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Im Prinzip besitzt jede einzelne B-Zelle des primären Repertoires im Körper auf ihrer Oberfläche einen B-Zellrezeptor, der sich zumindest geringfügig in seiner Antigenbindungsstelle von dem der anderen B-Zellen unterscheidet. So kann jede einzelne B-Zelle besonders gut mit ihrem B-Zellrezeptor an ein bestimmtes Antigen binden und ist somit spezifisch für dieses Antigen [3].

Dieser Einzigartigkeit jeder B-Zelle liegen Veränderungen ihrer Gene zugrunde. Diese Veränderungen werden während ihrer Entwicklung über mehrere Vorläuferzellstadien bis zur reifen B-Zelle durch die Zelle selbst durchgeführt. Zu Beginn der embryonalen B-Zellentwicklung sind noch alle B-Zellen genetisch identisch. Die Genlokuse, die für das Antikörpermolekül kodieren werden, sind jedoch in dieser Vorstufe noch nicht aktiviert. Auf dieser Entwicklungsstufe ist es dem B-Zellvorläufer ebensowenig wie jeder anderen Körperzelle möglich auf Grundlage dieser Gene ein funktionelles Antikörpermolekül zu bilden. Während dies für alle anderen Körperzellen auch weiterhin so bleibt, machen die B-Zellvorläufer eine besondere Entwicklung durch. Zelluläre Mechanismen sorgen während des ganzen Lebens dafür, dass die DNA möglichst unverändert erhalten bleibt. Im B-Zellvorläufer geschieht durch zelleigene Mechanismen genau das Gegenteil. In einem kontrollierten Prozess werden die Immunglobulingene in diesen Zellen solange verändert, bis auf ihrer Grundlage Antikörper generiert werden können [3].

In Keimbahnkonfiguration liegen die Immunglobulingene in allen Körperzellen als Gensegmente mit einer unterschiedlichen Anzahl an Varianten vor. Während

der Entwicklung der B-Vorläuferzelle zur reifen B-Zelle werden zufällig ausgewählte Gensegmente miteinander zu einem vollständigen Immunglobulingen kombiniert (rearrangiert). Erst von den rearrangierten Immunglobulingenen können Immunglobulinmoleküle abgelesen werden, die als B-Zellrezeptor fungieren [4]. Das Rearrangement wird für die Gene der schweren und der leichten Kette des Immunglobulinmoleküls durchgeführt [5-6]. Es gibt einen Genlocus für die leichte und einen für die schwere Kette, in dem die einzelnen Gensegmente hintereinandergereiht angeordnet sind (Abb. 3). Je nach Spezies gibt es jedoch auch zwei Genlokuse, die für die leichte Kette kodieren können, z.B. den  $\kappa$ - und  $\lambda$ -leichte-Ketten-Lokus des Menschen und der Maus (Abb. 3) [7].



**Abb. 3 Genlokuse von leichter und schwerer Immunglobulinkette des Menschen vereinfacht**

Modifiziert nach Janeway's Immunobiology [7].

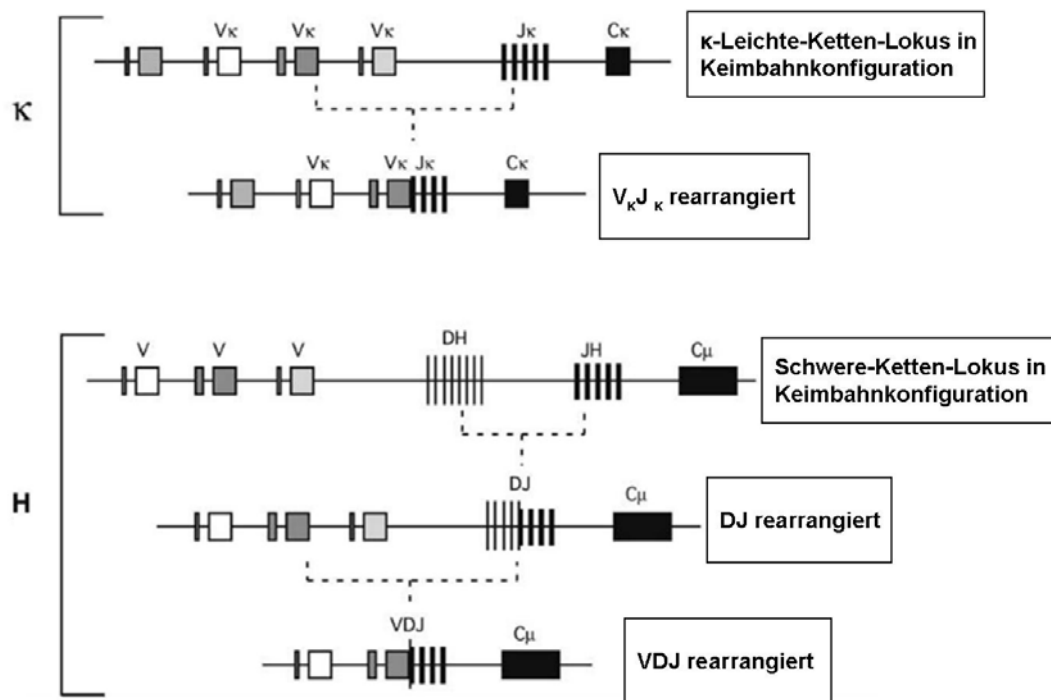
L=Leading-Peptid-Gen; V<sub>λ</sub>, J<sub>λ</sub>, C<sub>λ</sub>=V-, J,-und C-Gensegmente der λ-leichten Kettengene; V<sub>κ</sub>, J<sub>κ</sub>, C<sub>κ</sub>=V-, J,-und C-Gensegmente der κ-leichten Kettengene, V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub>, C<sub>μ</sub>=V-, D-, J,-und C<sub>μ</sub>-Gensegmente der schweren Kettengene.

In Keimbahnkonfiguration befinden sich auf dem Genlocus für die λ-leichte-Kette des Menschen hintereinander aufgereiht zirka 30 variable Gensegmente (V<sub>λ</sub>). An die Reihe der V<sub>λ</sub>-Gensegmente schließen sich vier Abfolgen von je einem Joining-Segment (J<sub>λ</sub>) und einem konstanten Segment (C<sub>λ</sub>) an. Die Abfolge der Gensegmente entspricht also der Reihe V<sub>λ</sub>1 - bis V<sub>λ</sub>30 - J<sub>λ</sub>1 - C<sub>λ</sub>1 - bis J<sub>λ</sub>4 C<sub>λ</sub>4 wie in Abb. 3 dargestellt. Auf dem Genlocus für die κ-leichte-Kette des Menschen befinden sich hintereinander aufgereiht zirka 40 V<sub>κ</sub>-Gensegmente. Daran schließen sich ein Cluster mit 5 aufeinanderfolgenden J<sub>κ</sub>-Gensegmenten, gefolgt von einem einzelnen C<sub>κ</sub> Gensegment, an. Das ergibt die Reihe V<sub>κ</sub>1 bis V<sub>κ</sub>40 - J<sub>κ</sub>1 - J<sub>κ</sub>5 - C<sub>κ</sub> wie in Abb. 3 dargestellt. Der Schwere-Ketten-Lokus des Menschen ist sehr ähnlich dem κ-leichte-Ketten-Lokus organisiert, mit zirka 40 funktionellen

$V_H$ -Gensegmenten. Diese sind hier allerdings gefolgt von 25 Diversity-Gensegmenten ( $V_D$ ). Diesen folgen wiederum 6  $J_H$ -Gensegmente und ein Cluster verschiedener  $C_H$ -Gensegmente. Das ergibt die Reihe  $V_{H1}$  bis  $V_{H40}$  -  $D_{H1}$  bis  $D_{H25}$  -  $J_{H1}$  -  $J_{H6}$  -  $C_H$  wie in Abb. 3 dargestellt. Zur Vereinfachung ist nur eines der verschiedenen  $C_H$ -Gensegmente ( $C_\mu$ ) in Abb. 3 gezeigt. Die Genlokuse für schwere und leichte Kette von Mensch und Maus unterscheiden sich vor allem in der Zahl verfügbarer V-Segmente, die bei der Maus deutlich höher liegt [7].

Aus dem reichen Pool vorhandener Gensegmente werden die Gene für leichte und schwere Kette während der B-Zellentwicklung zufällig zusammengesetzt. Im Fall der mehrfach vorhandenen Genlokuse für die leichte Kette wird zunächst ein Genlokus rearrangiert. Führt dies nicht zur erfolgreichen Generierung eines Genes, das für ein funktionelles Leichte-Ketten-Protein kodiert, kann auch der zweite Lokus herangezogen werden [7]. Bei dem Rearrangement der Gensegmente der Immunglobulingene zu einem funktionellen Gen wird durch zelluläre Enzyme die DNA der B-Zelle verändert. Ein zufällig ausgewähltes  $V_{\text{leichte Kette}}$ -Segment wird gewählt und mit einem nachfolgenden  $J_{\text{leichte Kette}}$ -Segment verknüpft. Dies geschieht durch unwiderrufbares Herausschneiden der zwischen den beiden genutzten Gensegmenten der leichten Kette gelegenen DNA. Dadurch rücken die beiden Gensegmente in der DNA nun direkt nebeneinander. Aus dieser Rekombination resultiert ein rearrangiertes Immunglobulingen für die leichte Kette. Das  $C_{\text{leichte Kette}}$ -Gensegment für den konstanten Teil der leichten Kette des Immunglobulins wird nicht genomisch an das entstandene  $VJ_{\text{leichte Kette}}$ -Segment angefügt, sondern im Schritt des RNA-Editing durch Splicen an die abgelesene VJ -Segment-RNA angefügt (Abb. 4) [7].





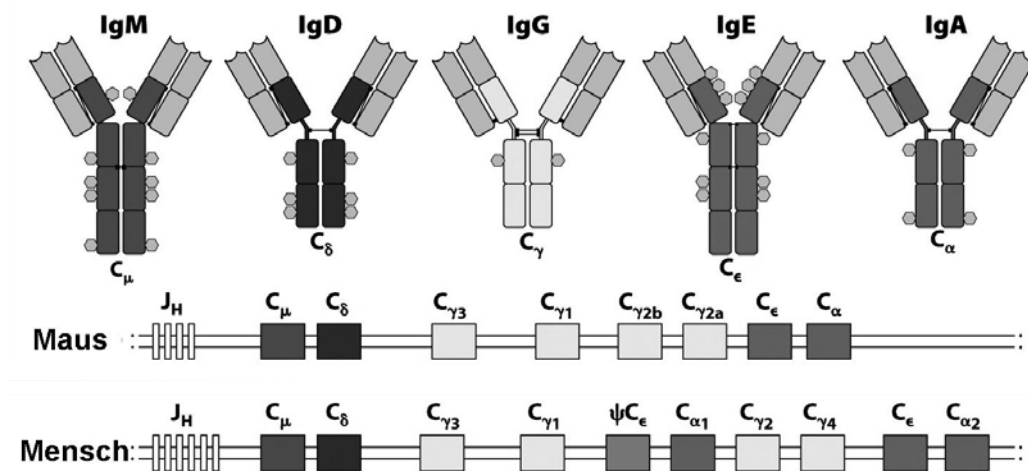
**Abb. 4 Schema der Somatische Rekombination von Immunglobulingenen**

Modifiziert nach Paul's Fundamental Immunology [3].

V<sub>κ</sub>, J<sub>κ</sub> = variabler und „Joining“-Teil der κ-leichten Kette; C<sub>κ</sub> = konstanter Teil der leichten Kette; V, D, J = variabler, „Diversity“- und „Joining“-Teil der schweren Kette, C<sub>μ</sub> = μ-konstanter Teil der schweren Kette. Der Prozess der Somatischen Rekombination von Immunglobulingenen ist schematisch vereinfacht dargestellt. Es wird lediglich eine eingeschränkte Anzahl an Variante jeden Gensegmentes gezeigt. Im Tier bedingt das Vorhandensein mehrere Varianten pro D- und J-Gensegment, aber vor allem eine hohe Zahl an Varianten des V-Gensegmentes die große Zahl möglicher somatischer Rekombinationen von leichter und schwerer Kette des Immunglobulinmoleküls.

Dieselben genomischen Prozesse finden am Genlocus der schweren Kette statt. Hier erfolgt jedoch ein Rekombinationsereignis mehr als an der leichten Kette, da auch die D-Segmente miteinbezogen werden. Ein D<sub>H</sub>- und ein J<sub>H</sub>-Segment der schweren Kette werden zunächst zufällig ausgewählt und aneinandergesetzt. Im Anschluss werden sie an das gewählte V<sub>H</sub>-Segment angefügt. Aus dem erwähnten großen Pool an C-Segmenten der schweren Kette wird auch hier über RNA-Editing das dem abgelesenen VDJ-Segment direkt nachfolgende C-Segment angefügt (Abb. 4). Dieses erste C<sub>H</sub>-Segment, das in Keimbahnkonfiguration auf die V<sub>H</sub>-, D<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Gensegmente folgt, ist immer das C<sub>μ</sub>-Segment (Abb. 5). Das C<sub>μ</sub>-Segment kodiert für die schwere Kette des IgM-Antikörpers. Somit werden die beim Genrearrangement entstehenden B-Zellrezeptoren zunächst durch ein IgM-

Antikörpermolekül auf der Zelloberfläche verkörpert. Das nächstfolgende schwere-Ketten-Gensegment ist bei Mensch und Maus das  $C_{\delta}$ -Segment. Dieses kodiert für die schwere Kette des IgD-Immunglobulinmoleküls. Das  $C_{\delta}$ -Segment ist mit dem  $C_{\mu}$ -Segment insofern verknüpft, als dass es beim Ablesen des Gens für IgM als alternative Splicevariante des IgM-Moleküls gebildet wird. Aus diesem Grund weisen naive reife B-Zellen der Maus und auch des Menschen auf ihrer Oberfläche gleichzeitig sowohl IgM- als auch IgD-Immunglobulinmoleküle als B-Zellrezeptoren auf [7].



**Abb. 5 Immunglobulineffektorklassen und Subklassen von Maus und Mensch**

Modifiziert nach Janeway's Immunobiology [7].

$C_{\mu}$  bis  $C_{\alpha}$  =  $\mu$ - bis  $\alpha$ -Gensegmente der schweren Kette.

Die Expression von IgD und IgM charakterisiert bei diesen Spezies eine B-Zelle als naive, noch nicht durch Antigen aktivierte, jedoch vollständig gereifte B-Zelle. Nachdem eine reife B-Zelle ihr Antigen mit ihrem membranständigen B-Zellrezeptor gebunden hat, wird sie aktiviert und durchläuft weitere genomische Veränderungen. Durch diese genomischen Veränderungen der aktivierten B-Zelle kommt es zu einer geänderten Verwendung des schwere-Ketten-Gensegmentes. Anstelle von IgM können die B-Zellen dann auch andere Immunglobulinklassen (IgG, IgA, IgE) exprimieren (Abb. 5) [7]. Die unterschiedliche Verwendung der schwere-Ketten-Gensegmente werden unter 2.1.4.4 näher beschrieben.

Jeder genetisch verschiedene B-Zellrezeptor kann durch die Proteinstruktur seiner Antigenbindungsstelle nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip ein anderes Epitop spezifisch binden, bzw. das selbe Epitop unterschiedlich gut binden [3]. Allein durch die zufällige Verwendung verschiedener Kombinationen der V- D- und J-

Gensegmente entsteht ein großes Repertoire unterschiedlicher B-Zellen [6]. Bei dem Zusammenfügen der Segmente werden jedoch zusätzlich durch Aufspaltung von unter dem Rearrangement gebildeten Hairpinstrukturen zufällige Kombinationen pallindromischer Nukleotide (P-Nukleotide) zwischen den Gensegmenten eingebaut. Diese vergrößern das Repertoire der unterschiedlichen entstehenden Immunglobulingene weiter. Bei dem Rearrangement der Gene der schweren Kette der Maus, Ratte und des Menschen ist ein weiteres wichtiges Enzym aktiv, die Terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT), die zufällig ohne Template Einzelnukleotide (N-Nukleotide) zwischen den zusammengefügt Gensegmenten einbaut. Diese Nukleotide bilden die N-Region des Schwereketten-Gens [8].

Die C-Segmente der leichten und schweren Kette kodieren für den konstanten Teil der Ketten. V- und J-Segment der leichten Kette kodieren für die variable Region der leichten Kette, V-, D-, und J-Segmente der schweren Kette für die variable Region der schweren Kette. Die variablen Bereiche der Ketten bilden im fertigen Antikörpermolekül die Antigenbindungsstelle. Vergleicht man die Antigenbindungsstellen vieler Antikörpermoleküle eines Individuums, so zeigt sich, dass bestimmte Bereiche der variablen Regionen der Proteine von leichter und schwerer Kette in vielen Molekülen sehr ähnlich sind. Andere Bereiche der variablen Regionen weisen hingegen eine sehr hohe Variabilität auf. Bereiche mit hoher Ähnlichkeit werden als die Gerüstregion der Antigenbindungsstelle bezeichnet. Die hoch variablen Bereiche heißen hypervariable Regionen (Complementarity Determining Region, CDR-Regionen). Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette weisen jeweils drei CDR-Regionen, CDR1 bis CDR3, auf. Diese sechs Proteinbereiche der leichten und schweren Kette sind entscheidend für die Spezifität der Antigenbindungsstelle des Antikörpermoleküls [9].

Die N-Regionen mit N-Nukleotiden der schweren Kette gehören zu dem Bereich des Genes der für die CDR3-Region der schweren Kette kodiert. Die Tatsache, dass drei, in zwei einzelnen Schritten zusammengefügte Gensegmente  $V_H$ ,  $D_H$  und  $J_H$  für die CDR3-Region kodieren, bedingt per se eine hohe Variabilität dieses Bereiches. Die zufällig eingefügten N-Nukleotide erhöhen die Variabilität der

CDR3-Region weiter [10].

Die Kombinationsmöglichkeiten verschiedener möglicher variabler Regionen von leichter und schwerer Kette in der Einzelzelle zu einem Antikörpermolekül vergrößert das mögliche B-Zellrepertoire zusätzlich um ein Vielfaches [7].

Ein B-Zellvorläufer kann die Entwicklung zur reifen B-Zelle nur durchlaufen, wenn er das Rearrangement seiner Immunglobulingene erfolgreich durchführt. Ein B-Zellvorläufer, dessen rearrangierte Gene zufällig nicht für ein funktionelles Immunglobulingen kodieren, wird zugrunde gehen [2]. Neben der Fähigkeit einen B-Zellrezeptor an die Zelloberfläche zu bringen, spielt auch die Spezifität des B-Zellrezeptors eine Rolle. B-Zellen mit einer hohen Affinität für körpereigenes Antigen werden während ihrer Entwicklung negativ selektiert. Die genauen Mechanismen dieser Selektionsprozesse sind im Gegensatz zu den gut untersuchten Abläufen bei der T-Zellentwicklung im Thymus noch weitgehend unbekannt [2]. T-Zellen werden ebenfalls während ihrer Entwicklung darauf selektiert, nicht gegen körpereigene Strukturen zu reagieren. Ein Teil von ihnen kann dann während einer humoralen Immunantwort als CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen durch Zytokine und Zelloberflächenmolekülkontakte B-Zellen T-Zellhilfe zukommen lassen. Die T-Zell-B-Zell-Interaktion geschieht jedoch antigenspezifisch, sodass eigenreaktive B-Zellen die nicht entfernt wurden, hier eine weitere Selektion erfahren [2].

Durch die genomischen Diversifizierungsmechanismen während der B-Zellreifung wird im Individuum ein ausreichend großes B-Zellrepertoire generiert, um auf die hohe Zahl möglicher Pathogene spezifisch reagieren zu können [7].

Die Entwicklung der B-Zellen aus Vorläufern findet bei Mensch und Maus fast ausschließlich im Knochenmark statt. Nicht alle Tierarten weisen, so wie das Modelltier Maus, einen dem Menschen sehr ähnlichen Satz an Immunglobulingensegmenten auf. Das Haushuhn besitzt eine, im Vergleich zu Mensch und Maus, stark eingeschränkte Anzahl an funktionellen Varianten der Gensegmente und muß so einen gänzlich anderen Weg bei der Generierung seines primären B-Zellrepertoires beschreiten (siehe 2.2.1.).

### 2.1.3 B-Zelllinien und Subtypen

Bei Mensch und Maus wandern die B-Zellen, nachdem sie erfolgreich einen B-Zellrezeptor rearrangiert haben, in die Milz ein, und entwickeln sich dort über mehrere transitionelle Übergangsstadien (T1, T2) weiter zu Marginalzonen-B-Zellen oder folliculären B-Zellen [8]. Diese Subpopulationen sind zum einen durch ihre Lokalisation in sekundärlymphatischen Organen gekennzeichnet. Follikuläre B-Zellen gehören zu den rezirkulierenden B-Zellen. Sie wandern über den Blutweg zwischen sekundärlymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Tonsillen) umher. In den lymphatischen Organen halten sie sich innerhalb primärer B-Zellfollikel ungefähr einen Tag auf und durchwandern diese auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen [11]. Follikuläre B-Zellen besitzen eine N-Region mit während des Genrearrangements eingefügten N-Nukleotiden. Dadurch handelt es sich um eine B-Zellpopulation, die eine hohe Variabilität der Antigenbindungsstelle ihrer B-Zellrezeptoren aufweist und somit auf die unterschiedlichsten Antigene reagieren kann [8]. Follikuläre B-Zellen werden durch T-zellabhängige Proteinantigene aktiviert. Nach der Aktivierung benötigen sie als zweites Signal antigenspezifische T-Zellhilfe, um zu proliferieren und sich zu Effektorzellen differenzieren zu können [12]. Dies gewährleistet einen Schutz vor Eigenreaktivität dieser besonders viele Antigene erkennenden B-Zellpopulation. [8].

Marginalzonen B-Zellen findet man als weitgehend sessile Zellen in der Marginalzone der Milz, einem Gebiet das direkten Zugang zu Antigenen aus dem Blut hat. Marginalzonen B-Zellen können sowohl T-zellabhängige Antigene als auch T-zellunabhängige Antigene vom Typ II erkennen [13-15]. Sie weisen kürzere CDR3-Regionen im Antigenerkennungsbereich ihrer schweren Ketten auf. Dies ist bedingt durch einen geringeren Grad des Einbaus von N-Nukleotiden beim Rearrangement der schweren Kette. B-Zellen mit solchen Immunglobulinen sind multireaktiv und können besonders gut Polysaccharide binden [15]. Sie sind in der Lage, schnell und durchaus T-zellunabhängig niedrigaffines IgM gegen eine Vielzahl bakterieller Polysaccharide aus dem Blut und zusätzlich auch gegen, mit dem Blut in die Milz geschwemmte,

Selbstantigene zu produzieren, um sie der Phagozytose zuzuführen [13].

Lediglich einige, im Knochenmark oder der fetalen Leber gebildete B-Zellen weisen keine zusätzliche Erweiterung ihres B-Zellrezeptorrepertoires durch den Einbau zufälliger N-Nukleotide während des Genrearrangements auf. Aus diesen Zellen entwickeln sich die B1-B-Zellen der Peritonealhöhle und wiederum Marginalzonen-B-Zellen [8]. B1-B-Zellen und aus B1-B-Zellvorläufern gebildete Marginalzonen B-Zellen werden der B1-B-Zelllinie zugeordnet. Follikuläre B-Zellen und aus T2-B-Zellen in der Milz gebildete Marginalzonen B-Zellen gehören zur B2-B-Zelllinie [8, 16].

#### **2.1.4 Sekundäre Diversifikation des B-Zellrepertoires in germinalen Zentren**

Je stärker die spezifische Bindung der Antikörper an Epitope der Pathogene ist, umso besser können sie ihre Abwehrfunktion im Körper ausüben. Umso besser kann auch ein Pathogen vom Körper kontrolliert werden [17]. Zu den Tierarten, die Antikörper auf der Grundlage der Immunglobulingene generieren, gehören Knochenfische, Knorpelfische, Amphibien, Reptilien, Vögel, und Säugetiere. Alle diese Spezies sind jedoch in unterschiedlich starkem Maße dazu in der Lage, die Bindungsfähigkeit der gebildeten Antikörper (Affinität) an ein Pathogen während des Verlaufes der Immunantwort zu steigern (Tabelle 1) [1, 18-20]. Um sich den, durch die Steigerung der Affinität gewonnenen Vorteil zu erhalten, können höhere Vertebraten ein immunologisches Gedächtnis aufbauen. Dieses ermöglicht bei erneutem Antigenkontakt die viel schnellere Bildung der spezifischen, affinitätsgereiften Antikörper (Tabelle 1) [21]. Durch das schnelle Vorhandensein hochaffiner Antikörper zu Beginn einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger kann eine weitere Manifestation abgeschwächt oder sogar verhindert werden [22]. Starke Affinitätsreifung der während einer Immunantwort gebildeten Antikörper und das immunologische Gedächtnis der Antikörperantwort der höheren Vertebraten ist immer mit dem Auftreten ganz bestimmter Strukturen in sekundärlymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und Tonsillen: den sogenannten *germinalen Zentren* (GC) verbunden (Tabelle 1) [21].

Vertebraten- spezies	Erhöhung der Antikörper- affinität	Heterogenität der Antikörper	Anstieg der Antikörper- spiegel	Germinale Zentren
<b>Hai</b>	$\sim 10^5$	-	-	nein
<b>Fisch</b>	$10^5$ - $10^6$	limitiert	langsam	nein
<b>Frosch</b>	$10^5$ - $10^6$	limitiert	langsam	nein
<b>Schildkröte</b>	kein Anstieg	-	langsam	nein
<b>Huhn</b>	$10^5$ - $10^7$	heterogen	schnell	ja
<b>Kaninchen</b>	$10^5$ - $10^9$	heterogen	schnell	ja
<b>Maus</b>	$10^5$ - $10^8$	heterogen	schnell	ja

**Tabelle 1 Unterschiede im Verlauf der Antikörperantwort bei verschiedenen Vertebraten**

Modifiziert nach Nahm et al [21].

- = nicht bekannt; Fisch = Vertreter der Knochenfische.

### 2.1.4.1 Entstehung von GCs

In den 1920er Jahren konnte man B- und T-Zellen des adaptiven Immunsystems noch nicht unterscheiden. Es hatte sich aufgrund morphologischer Beobachtungen lediglich eine Unterteilung in Lymphozyten und Plasmazellen herauskristallisiert. Dennoch wurde beobachtet, dass Kaninchen nach Immunisierung mit Staphylokokkenantigenen in Milz und drainierenden Lymphknoten vermehrt rundliche Zellansammlungen aufwiesen. Diese waren histologisch vom umliegenden Milzgewebe abgegrenzt und enthielten in der Hauptsache Lymphozyten. Diese Strukturen wurden als Sekundärfollikel angesprochen, und man vermutete, dass die in ihnen befindlichen Lymphozyten eine Rolle in der Reaktion auf das aktuell in den Körper eingedrungene Antigen spielen könnten [23-24]. Nicht nur bei Kaninchen, Maus und Ratte, sondern auch im Haushuhn und in weiteren höheren Vertebraten wurden diese besonderen Strukturen gefunden [21]. In den 1950er Jahren erkannten Glick et. al. durch Untersuchungen beim Haushuhn die Bedeutung der sogenannten bursa-abhängigen Lymphozyten (B-Zellen) für die Entstehung von Antikörpertitern im Körper. In den folgenden Jahren wurde durch weitere Arbeiten in Huhn und Nager die Dichotomie des adaptiven Immunsystems aus B- und T-Zellen aufgedeckt [25-26]. Es wurde klar, dass es sich bei den Lymphozyten, die sich in den nach Immunisierung in sekundärlymphatischen Organen entstehenden Sekundärfollikeln befinden, in der Hauptsache um B-Lymphozyten handelt [27].

Heute weiß man, dass sich reife, rezirkulierende B- und T-Zellen in den

sekundärlymphatischen Organen Milz, Lymphknoten und Tonsillen in ihren jeweiligen Kompartimenten, der B-Zellzone und der T-Zellzone, aufhalten. In diesen Zonen sind sie jedoch nicht stationär angesiedelt. Als mobile Zellen durchwandern sie für eine gewisse Zeit ihre Zone, verlassen dann das lymphatische Organ und gelangen über das Blut zu einem weiteren sekundärlymphatischen Organ, um auch dort ihre jeweiligen Zonen aufzusuchen [1]. Bei Mensch und Maus unterscheidet man Follikuläre B-Zellen von anderen B-Zelltypen. Follikuläre B-Zellen halten sich im lymphatischen Organ im primären B-Zellfollikel auf [1].

Über das Blut und die Lymphe gelangen durch Antikörper und Komplementfaktoren markierte Antigene als Immunkomplexe unprozessiert in den primären B-Zellfollikel. Dort werden sie von FDCs, übernommen, die die Antigene, ohne sie weiter zu verändern, über Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren gebunden auf ihrer Zelloberfläche anlagern [28-32]. Erkennen Follikuläre B-Zellen, die den primären B-Zellfollikel durchwandern, dieses Antigen durch Bindung ihres spezifischen B-Zellrezeptors, werden sie aktiviert und finden sich dann auf der Suche nach T-Zellhilfe am Übergang zwischen B-Zellfollikel und T-Zellzone ein [33-36]. Nach Interaktion mit CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen vermehren sich in einem ersten Schritt die antigenaktivierten B-Zellen. Einige dieser B-Zellen wandern dann erneut in den B-Zellfollikel ein und teilen sich in der Umgebung der mit ihrem spezifischen Antigen beladenen FDCs weiter stark [37-39]. Aus den sich ansammelnden Nachkommen der in den Follikel eingewanderten B-Zellen und den antigenbeladenen FDCs sowie ebenfalls einwandernden follikulären T-Helferzellen formiert sich im Zentrum des Primären B-Zellfollikels der Sekundärfollikel (GC), der schon früh als runde Struktur in lymphatischen Organen nach Immunisierung aufgefallen war [39].

Sekundärfollikel oder GCs sind demnach keine permanent vorhandenen B-Zellstrukturen, sondern entstehen grundsätzlich in sekundärlymphatischen Organen bei Auftreten von T-zellabhängigem Antigen im Körper [40]. Bei chronischen lokalen Entzündungsprozessen können sie auch ektopisch im Entzündungsgewebe entstehen [41-42]. Auch T-zellunabhängige Antigene können zur Bildung von GCs führen, die jedoch schneller zurückgebildet werden



als dies für T-zellabhängige GCs der Fall ist [43].

#### 2.1.4.2 Morphologie von GCs

Das GC stellt eine Mikroumgebung innerhalb sekundärlymphatischer Organe dar. In dieser Umgebung sind die richtigen Bedingungen für die erfolgreiche Entwicklung aktivierter follikulärer B-Zellen gegeben [44].

Follikuläre B-Zellen sind, wie alle Lymphozyten, mobile Zellen. Wie man aus *in-vivo*-Imaging-Experimenten mit 2-Photon-Technik weiß, ist ihre Bewegung innerhalb von primären B-Zellfollikeln in sekundärlymphatischen Organen grundsätzlich ungerichtet (random walk) mit einer Geschwindigkeit von etwa 6µm/Minute [45]. Die B-Zellen exprimieren jedoch auf ihrer Zelloberfläche Chemokinrezeptoren, die mit Chemokinen auf Gerüstfasern im Lymphgewebe interagieren können. Die Bewegungsrichtung der B-Zellen wird somit durch Chemokingradienten innerhalb der einzelnen Regionen der lymphatischen Organe und von der Expression von Chemokinrezeptoren auf der B-Zelle selbst beeinflusst [2]. Bevor man dazu in der Lage war, die Bewegungen von Lymphozyten im Tiermodell *in vivo* zu verfolgen, konnte man histologisch zeigen, dass die Aktivierung von antigenspezifischen B-Zellen nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen dazu führt, dass zunächst Fokusse proliferierender antigenspezifischer Zellen außerhalb der Primärfollikel zu finden sind. Zeitversetzt entstehen dann antigenspezifische GCs innerhalb des Primärfollikels [40, 46].

Im primären B-Zellfollikel produzieren FDCs und Marginale Retikuläre Zellen (MRC) das Chemokin CXCL13. Sie erhalten einen absteigenden CXCL13-Gradienten vom Follikelzentrum zur Follikelperipherie hin aufrecht. Um aus dem Blut in den primären B-Zellfollikel zu gelangen, benötigen die B-Zellen neben anderen Rezeptoren den Chemokinrezeptor CXCR5. CXCR5 bindet das Follikel-Chemokin CXCL13 und stimuliert so die Migration der B-Zellen in Richtung von dessen Gradienten in den Follikel hinein [47-49].

Die B-Zellen bewegen sich innerhalb des Follikels auf der Suche nach Antigen, welches als Immunkomplexe auf der Zelloberfläche von FDCs im Follikelzentrum gespeichert wird [28]. Treffen die follikulären B-Zellen auf

Antigen, das sie mit ihrem B-Zellrezeptor spezifisch binden können, werden sie aktiviert. Die Aktivierung bewirkt in der B-Zelle eine Veränderung der Chemokinrezeptorexpression auf ihrer Zelloberfläche. Die aktivierte B-Zelle exprimiert nun deutlich mehr CCR7. CCR7 ist der Rezeptor für das in der T-Zellzone vorherrschende Chemokin CXCL21. Es herrscht ein absteigender CXCL21-Gradient aus der T-Zellzone in Richtung B-Zellfollikel. Die Wirkung des CXCL13-Gradienten zum Follikelzentrum hin und des CXCL21-Gradienten zur T-Zellzone hin werden dafür verantwortlich gemacht, dass aktivierte B-Zellen, die sowohl CCR7 als auch CXCR5 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, nun chemotaktisch am Übergang von der B-Zell- zur T-Zellzone fixiert werden. Dort verweilen sie bis zu mehrere Tage und erhalten Zugang zu antigenspezifischer T-Zellhilfe [50].

Im Anschluß an diese Phase der Interaktion mit den T-Helferzellen regulieren die B-Zellen CCR7 auf ihrer Zelloberfläche wieder herunter, während gleichzeitig EBI2, ein weiterer Rezeptor hochreguliert bleibt. Dies ermöglicht den B-Zellen anhand des Gradienten eines bisher nicht näher charakterisierten EBI2-Liganden in die interfollikuläre Zone, bzw. die äussere Zone des primären B-Zellfollikels einzuwandern [51]. Dort kommt es zur initialen klonalen Expansion, d.h. die aktivierten B-Zellen beginnen sich zu teilen und somit zu vermehren. Nach einigen Tagen differenzieren sich einerseits Plasmazellen aus den entstandenen neuen B-Zellen. Andererseits gibt es B-Zellen, die den Rezeptor EBI2 nun herunterregulieren [39]. Durch die allein verbleibende Expression von CXCR5 werden diese B-Zellen entlang dem CXCL13-Gradienten der FDCs ins Zentrum des Primärfollikels zurückgeleitet [51]. Diese B-Zellen werden zu germinalen Zentrums B-Zellen (GC-B-Zellen) und proliferieren weiter. Die Nachkommen dieser Zellen bauen das GC auf [11].

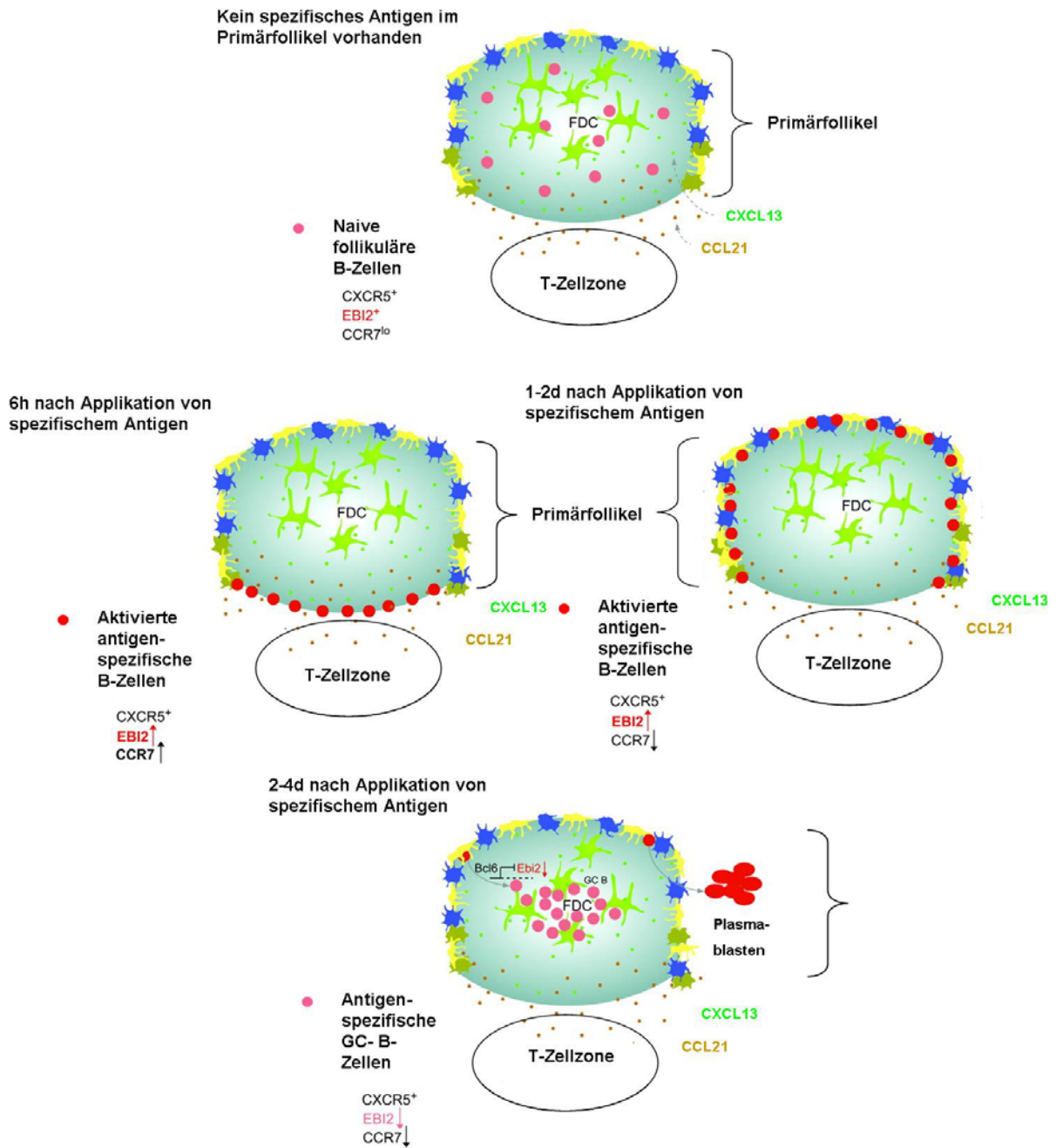
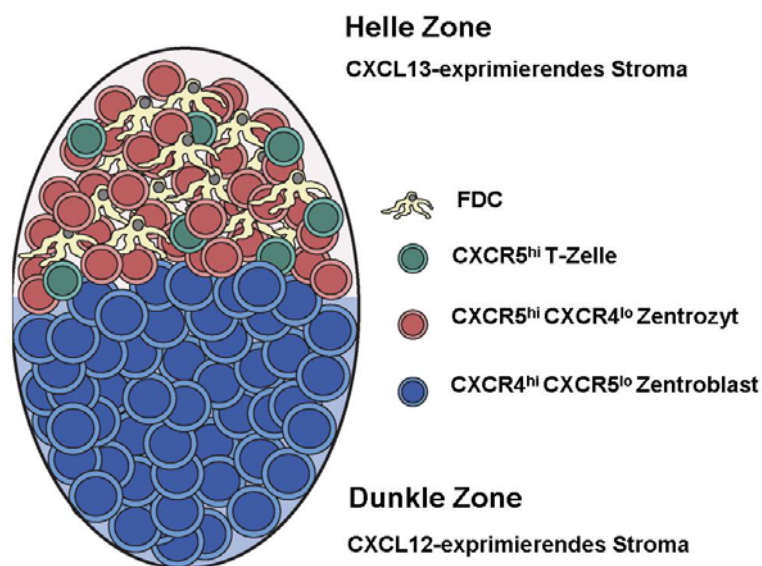


Abb. 6 An der Entstehung eines germinalen Zentrums beteiligte Chemokine  
 Modifiziert nach Peireira et al. [11].

Nach einigen Tagen der Proliferation bilden sich innerhalb des germinalen Zentrums zwei Zonen heraus. Nahe der T-Zellzone entsteht die dunkle Zone mit sich schnell teilenden GC-B-Zellen (Zentroblasten). Abgewandt von der T-Zellzone schließt sich die helle Zone des germinalen Zentrums an. In der hellen Zone befindet sich ein dichtes Netz aus antigenspeichernden FDCs, in welchem sich auch folliculäre T-Helferzellen und GC-B-Zellen einfinden (Abb. 7) [52].

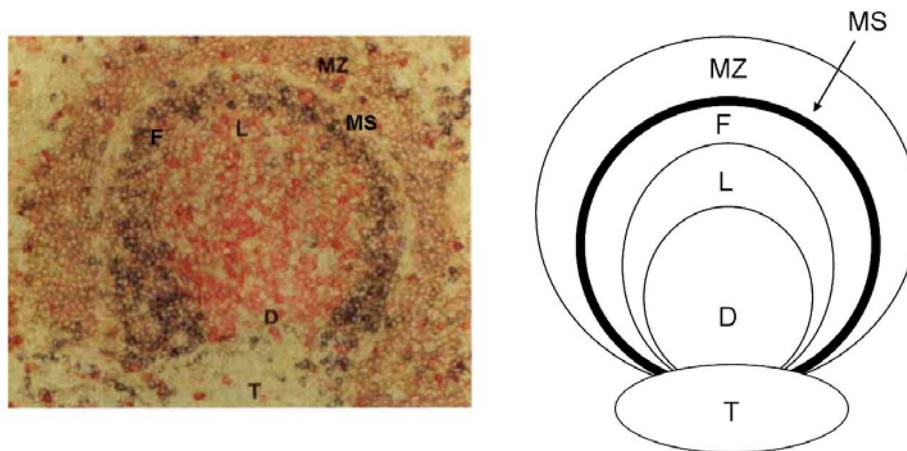


**Abb. 7 Chemokingradienten innerhalb eines germinalen Zentrums**

Modifiziert nach Cozine et al [52].

Die GC-B-Zellen der hellen Zone (Zentrozyten) gehen auf Zentroblasten der dunklen Zone zurück, die, nach ihrer Vermehrung in der dunklen Zone, in die helle Zone eingewandert sind [53]. Die Organisation des germinalen Zentrums in helle und dunkle Zone wird durch gegensätzliche Gradienten von CXCL12 zur dunklen Zone und CXCL13 zur FDC-reichen hellen Zone hin vermittelt. Die GC-B-Zell-Positionierung in der hellen oder dunklen Zone hängt dabei von der selektiv hohen Expression des CXCL12-Rezeptors CXCR4 selektiv durch sich schnell teilende Zentroblasten der dunklen Zone ab [54]. GC-B-Zellen die sich in der dunklen Zone geteilt haben wandern nach Verlust der hohen CXCR4-Expression in die helle Zone. [54] Die an der germinalen Zentrumsreaktion nicht beteiligten rezirkulierenden B-Zellen des Primärfollikels werden von dem sich entwickelnden germinalen Zentrum als folliculärer Mantel an den Rand des

ehemaligen Primärfollikels verdrängt (Abb. 8) [17]. Die GCs bleiben für einige Wochen in dieser Form erhalten und bilden sich dann zurück [53].



**Abb. 8 GC aus einer Rattenmilz**

Modifiziert nach Liu et al. [39].

Immunhistochemische Färbung eines Rattenmilzchnittes und Schema der darin abgrenzbaren Bereiche der B-Zellzone und T-Zellzone der weißen Milzpulpa.

Rote Zellen = Zellen die sich innerhalb der letzten 6 Lebensstunden der Ratte in der S-Phase der Zellteilung befanden und BrdU inkorporiert haben; Blaue Zellen =  $IgD^+$  B-Zellen; Braune Zellen =  $IgM^+$  B-Zellen; T = T-Zellzone; D+L = Dunkle und Helle Zone des germinalen Zentrums; F = Follikulärer Mantel; MS = Marginalsinus; MZ = Marginalzone.

Die Marginalzone (MZ) umschließt den B-Zellfollikel. Am Übergang zum Follikel befindet sich der gefäßreiche Marginalsinus (MS). Innerhalb des Follikels hat das entstandene GC mit heller (L) und dunkler Zone (D) die nicht aktivierten unbeteiligten  $IgD^+$  follikulären B-Zellen als Follikulären Mantel (FM) an den Rand des Follikels gedrängt. An die dunkle Zone des germinalen Zentrums (D) schließt sich die T-Zellzone (T) an.

Die noch vor der einsetzenden Weiterentwicklung antigenspezifischer B-Zellen in GCs gebildeten Plasmazellen werden für früh in der adaptiven Immunantwort sezernierte, niedrigaffine, antigenspezifische IgM-Antikörper verantwortlich gemacht. Im Verlauf einer adaptiven Immunantwort wird jedoch die Affinität der gebildeten Antikörper gesteigert und es werden auch andere Immunglobulinklassen (IgG, IgA) gebildet, während die Bildung von niedrigaffinem IgM innerhalb weniger Tage sistiert [17]. Die Steigerung der Affinität der gebildeten Antikörper, der Klassenwechsel zur Bildung von anderen Immunglobulinklassen und die langfristige Antikörperproduktion sowie der Aufbau eines humoralen immunologischen Gedächtnisses werden mit Prozessen der germinalen Zentrumsreaktion in den entstehenden antigenspezifischen GCs in Verbindung gebracht [17].

### 2.1.4.3 Somatische Hypermutation und Affinitätsreifung

Experimente mit Mäusen haben gezeigt, dass in dieser Spezies die folliculären B-Zellen in Folge der Aktivierung durch Antigenerkennung in einen Zustand eintreten, in dem die Apoptose in der Zelle nicht mehr herunterreguliert wird [55]. Um der negativen Selektion durch Apoptose zu entgehen, sind die B-Zellen auf Signale von außen angewiesen [35, 55-56]. Ein wichtiges Signal ist die Interaktion mit antigenspezifischen CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen [35]. Die B-Zelle internalisiert Proteinantigene, die sie über ihren B-Zellrezeptor gebunden hat, prozessiert sie zu Peptiden und präsentiert sie als Peptid-MHCII-Komplexe für T-Zellen auf ihrer Zelloberfläche [36]. Nachdem eine spezifische T-Helferzelle die Peptide des Antigen mit ihrem für das gleiche Antigen spezifischen T-Zellrezeptor im MHCII-Molekül der B-Zelle erkannt hat, erhält die B-Zelle wichtige Überlebenssignale von der T-Zelle. Diese positive Selektion erfolgt über Interaktion weiterer Zelloberflächenrezeptoren der B-Zelle mit T-Zelloberflächenrezeptoren (CD40-CD40 Ligand-Interaktion) und über von der T-Helferzelle sezernierte Zytokine, z.B. Il-4 (Interleukin 4) [33-35].

GC-B-Zellen benötigen zum Überleben als zweites Signal, die erneute Bindung und Aktivierung ihrer B-Zell-Rezeptormoleküle durch ihr spezifisches Antigen [28, 55]. Die erneute Aktivierung des B-Zellrezeptors wird höchstwahrscheinlich durch Bindung an von FDCs im germinalen Zentrum vorrätig gehaltenes Antigen ermöglicht [57].

Ein besonderes Charakteristikum von GC-B-Zellen ist die Aktivierung von Genen, im Besonderen der aktivierungsinduzierten Cytidineaminase (AID), welche in den sich teilenden B-Zellen die somatische Hypermutation auslösen [58]. Während sich die GC-B-Zellen teilen, werden bei Mensch und Maus Punktmutationen selektiv in Genen der variablen Region des Immunglobulinmoleküls eingefügt [59]. Die C-Gensegmente der konstanten Region des Antikörpers, also des die Effektorfunktionen vermittelnden Fc-Teiles werden davon nicht berührt.

Durch die eingefügten Mutationen wird im germinalen Zentrum das Repertoire der

Gene, welche für die Antigenbindungsstelle des Antikörpermoleküls kodieren, zunächst erneut vergrößert. In der Folge des, durch die Mutationen bedingten, Aminosäureaustausches wird die Proteinstruktur der Antigenbindungsstelle des Immunglobulinmoleküls verändert. Aufgrund der hohen Teilungsrate entstehen aus den anfänglich das GC besiedelnden antigenspezifischen B-Zellklonen viele B-Zellen, die sich geringfügig in der Aminosäurestruktur der Antigenbindungsstellen ihrer B-Zellrezeptoren unterscheiden [59-60]. Viele der entstandenen somatischen Mutationen führen dazu, dass der neue B-Zellrezeptor das auf den FDCs gespeicherte Antigen nun schlechter oder überhaupt nicht mehr binden kann. Einige Mutationen verbessern dagegen die Antigenbindungsfähigkeit und damit die Affinität der B-Zellrezeptoren zum Antigen. In der Konkurrenz um das Antigen im germinalen Zentrum und somit auch in der Konkurrenz um die antigenspezifische T-Zellhilfe liegen GC-B-Zellen mit höher affinem B-Zellrezeptor weit vorne [61]. GC-B-Zellen, die sich in der dunklen Zone geteilt haben und dabei durch somatische Mutation erworbene Veränderungen in den variablen Regionen ihrer Immunglobulingene angesammelt haben, wandern nach Verlust der hohen CXCR4-Expression in die helle Zone [54]. In der hellen Zone werden die durch somatische Mutationen während der Proliferation in der dunklen Zone entstandenen neuen B-Zellrezeptoren der B-Zellen anhand des auf den FDCs vorrätig gehaltenen Antigens auf hohe Antigenaffinität selektiert [53]. Ein Großteil der gebildeten B-Zellen im GC geht in der hellen Zone in Ermangelung eines hochaffinen B-Zellrezeptors apoptotisch zu Grunde [62]. Nur die affinitätsgereiften B-Zellen, die die notwendigen Überlebenssignale zur Regulation der Apoptose „erstreiten“ können, teilen sich weiter [59]. Nach erfolgreichem Durchlaufen der Selektionsprozesse durch Antigenerkennung anhand ihres B-Zellrezeptors und Interaktion mit antigenspezifischen folliculären T-Helferzellen können die GC-B-Zellen bei erneuter hoher Expression von CXCR4 wieder in die dunkle Zone eintreten, um weiter zu proliferieren, oder das GC verlassen und zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren [54]. Somit finden Proliferation und Selektion in verschiedenen Kompartimenten des germinalen Zentrums statt [53].

Die Selektionsmechanismen im GC führen dazu, dass das einzelne GC mit Fortschreiten der germinalen Zentrumsreaktion von hochaffinen B-Zellen, die auf

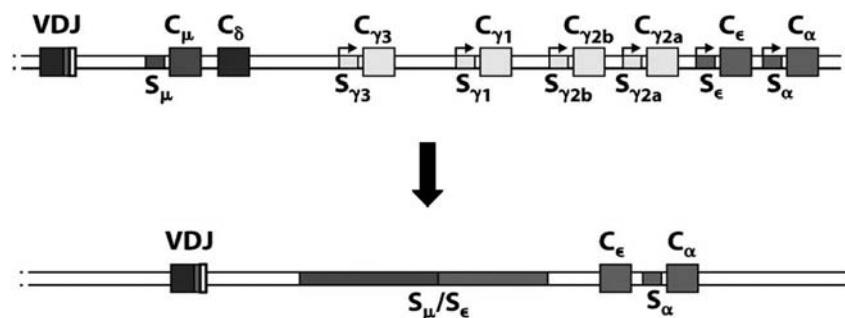
wenige Klone zurückgehen, angefüllt ist [60].

#### 2.1.4.4 Immunglobulinklassenwechsel

Neben der somatischen Hypermutation findet noch eine weitere Veränderung der DNA der B-Zelle im germinalen Zentrum statt. Über zelluläre Enzyme wird das Gen für den konstanten Teil der schweren Ketten des Immunglobulinmoleküles verändert [63]. Das in Abb. 1 gezeigte Immunglobulinmolekül kann über seinen Fc-Teil von Fc-Rezeptoren anderer Zellen des Immunsystems gebunden werden [1]. So werden Effektorfunktionen von Antikörpern, wie die Phagozytose von opsoniertem Pathogen durch Fresszellen, vermittelt [64]. Über den Fc-Teil werden die Immunglobuline einer Immunglobulinklasse zugeordnet. Je nach Spezies gibt es unterschiedlich viele verschiedene Immunglobulinklassen wie z.B. IgM, IgG, IgA, IgE und IgD bei Mensch und Maus [3]. Sie werden in sezernierter Form von ihren jeweiligen Rezeptoren auf unterschiedlichen Immunsystemzellen erkannt und sind definiert durch die Verwendung des jeweiligen schweren Ketten-Genes [3].

Innerhalb des Genortes für die schwere Kette liegen im Anschluß an die variable Region des Immunglobulins die Gene für die möglichen schweren Ketten hintereinandergereiht vor (Abb. 5) [65]. Das schwere Ketten-Gen, das der rearrangierten variablen Region direkt folgt, wird in der reifen naiven B-Zelle abgelesen. Der Wechsel von dem zunächst verwendeten  $\mu$ -schwere Kette-Gen für IgM in Verbindung mit dem  $\delta$ -schwere-Ketten-Gen für IgD hin zu einem anderen schwere-Kette-Gen erfolgt, wie Abb. 9 zeigt, durch unwiderufliche Deletion des  $\mu$ -Gens sowie der DNA zwischen dem  $\mu$ -Gen und dem neu genutzten schwere-Ketten-Gen [63]. In der Folge werden in der so veränderten B-Zelle nicht mehr die Immunglobulinklassen IgM und IgD, deren Gene deletiert wurden gebildet. Es erfolgt der Wechsel zu einer neuen Immunglobulinklasse, die durch das nun den Genen der Variablen Region in der DNA direkt folgende schwere-Ketten-Genesegment kodiert wird [2].





**Abb. 9 Immunglobulinklassenwechsel**

Aus Janeway's Immunobiology [2].

VDJ=V-, D- und J-Gensegmente der schweren Kette;  $S_{\mu}$  bis  $S_{\alpha}$ = die verschiedenen Switchregionen der schwere-Ketten-Gensegmente;  $C_{\mu}$  bis  $C_{\alpha}$ =die verschiedenen C-Gensegmente der schweren Kette

Entscheidend für die Wahl der Immunglobulinklasse ist der durch andere Zellen des Immunsystems je nach vorhandenem Pathogen gebildete „Zytokincocktail“ und der Zugang zu durch Zellkontakt vermittelten Signalen von T-Zellen. So wird die Effektorklasse der affinitätsgereiften Immunglobuline den Erfordernissen des jeweiligen Erregers angepasst [63].

Der Klassenwechsel erfolgt nach dem Einsetzen der Affinitätsreifungsprozesse in den GC-B-Zellen [66]. Die affinitätsgereiften, klassengewechselten B-Zellen verlassen das GC und differenzieren dann einerseits zu antikörpersezernierenden Plasmazellen [67]. Diese sind zum Teil für den Anstieg der höheraffinen IgG-Antikörper im Laufe einer humoralen Immunantwort verantwortlich. Andererseits entstehen B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt bei einer zukünftigen Infektion den Prozeß der Differenzierung zur Immunglobulin sezernierenden Effektorzelle viel schneller durchlaufen werden [68].

Voll entwickelte GCs, in deren heller und dunkler Zone die beschriebenen Prozesse stattfinden, bleiben für einige Wochen in dieser Form erhalten und bilden sich dann zurück. Die Zahl der neu entstehenden Zellen geht zurück, während Apoptose und Zellen, die das GC verlassen, die Zellzahl reduzieren, bis hin zum Verschwinden des Keimzentrums [38-39].

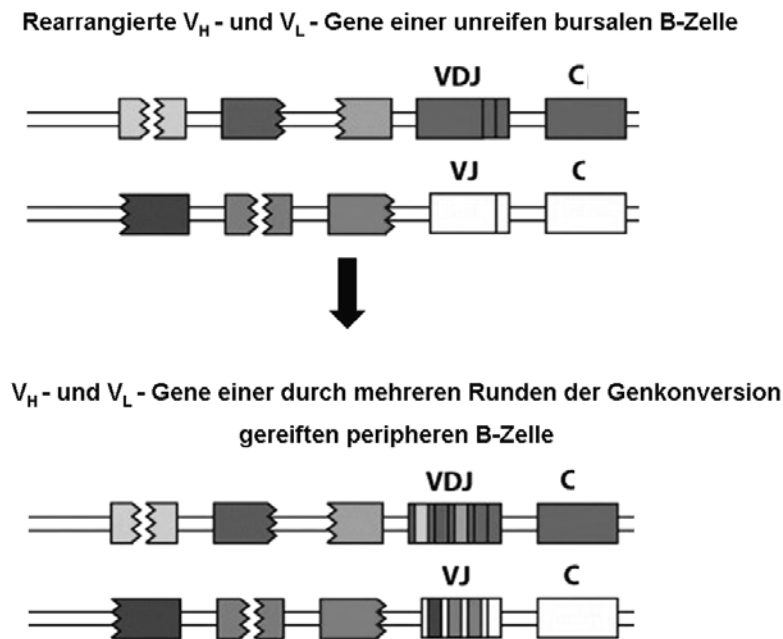
## 2.2 Das humorale adaptive Immunsystems des Haushuhnes

### 2.2.1 Entstehung des primären B-Zellrepertoires

Das Haushuhn als Vertreter der Vögel besitzt verglichen mit Mensch und Maus ein stark eingeschränktes Repertoire an Gensegmenten der Immunglobulingene, die für die Rekombination eines vollständigen Antikörpergenes zur Verfügung stehen. Das Hühnergenom weist lediglich einen Genlokus für die leichte Kette des Immunglobulins auf, dessen Genprodukte denen des  $\lambda$ -leichte-Ketten-Lokus von Mensch und Maus gleichen [69]. Innerhalb dieses Genortes finden sich jedoch lediglich ein funktionelles  $V_L$ - und ein  $J_L$ -Gensegment. Upstream des funktionellen  $V_L$ -Gensegmentes, also abgewandt von den ihm nachfolgenden  $J_L$ - und  $C_L$ -Gensegmente, finden sich jedoch zirka 25 unvollständige V-Gensegmente. Diese werden als Pseudo- $V_L$ -Gene angesprochen, da sie verglichen mit dem funktionellen  $V_L$ -Gensegment trunkiert sind. Sie besitzen keine funktionellen flankierenden Rekombinationssignalsequenzen, die notwendig sind, um an den Prozessen der somatischen Rekombination teilzunehmen. Auch eine Promotorsequenz zur Transkription fehlt ihnen [70]. Der Genlokus für die schwere Kette weist lediglich ein einziges funktionelles  $V_H$ -Segment gefolgt von 15  $D_H$ -Segmenten auf, die sich jedoch sehr ähnlich sind. Zudem findet sich nur ein funktionelles  $J_H$ -Segment [71-72]. Auch hier findet sich in 5'-Richtung des funktionellen  $V_H$ -Gensegmentes eine Gruppe von Pseudogenen [70]. Ein  $C_{\delta}$ -schwere-Ketten-Gensegment für IgD ist im Huhn nicht bekannt. Die generierten primären B-Zellen exprimieren lediglich das  $C_{\mu}$ -schwere-Ketten-Gen für IgM. Das  $C_{\nu}$ -Gensegment für das IgY-Antikörpermolekül, das IgG-Äquivalent des Huhnes, gilt als gemeinsamer Vorläufer der  $C_{\nu}$ - und  $C_{\epsilon}$ -Gensegmente für IgG und IgE der Säuger. Entsprechend hat das Huhn auch lediglich eine dritte Immunglobulinklasse, das IgA, für die im schwere-Ketten-Lokus das  $C_{\alpha}$ -Gensegment kodiert [70].

Das Huhn beschreitet bei der Generierung seiner B-Zellvielfalt einen gänzlich anderen Weg als Mensch und Maus. Die zunächst während der Embryonalentwicklung im Dottersack, später im Knochenmark und der Milz

durch Rearrangement der wenigen vorhandenen Immunglobulingensegmente entstehenden B-Vorläuferzellen weisen keine große Variabilität in ihren B-Zellrezeptoren auf [73]. Das funktionelle V- und J- Gensegment der leichten Kette und das funktionelle V-Segment sowie die D-Segmente und das J-Segment werden rearrangiert. Zufälliges Einfügen von Einzelnukleotiden beim Zusammenfügen der Gensegmente wird nicht genutzt [74-75]. Die B-Vorläuferzellen wandern, nachdem sie das Rearrangement begonnen haben und somit auf die B-Zelllinie festgelegt wurden, in die Bursa fabricii ein. Die Bursa fabricii des Huhnes ist ein Darmanhangsorgan dorsal des Enddarmes mit Zugang zu Antigenen aus dem Darm über den Bursastiel [76]. B-Zellen, die ihre Immunglobulingene produktiv rearrangiert haben und einen B-Zellrezeptor ausbilden können, beginnen sich in der Bursa zu vermehren. Im Zuge dieser Prozesse entstehen in der Bursa B-Zellfollikel mit Rinde und Mark, in denen die sich entwickelnden B-Zellen ihr Genrepertoire sekundär nach dem Rearrangement erweitern [76]. Die rearrangierten  $VJ_L$ - und  $VDJ_H$ -Gensegment von leichter und schwerer Kette werden in der Bursa durch Einfügen von Teilstücken aus den jeweils 5` gelegenen Pseudogenen in das rearrangierte Segment verändert. Dabei wird wiederholt durch zelluläre Enzyme ein kleiner Anteil eines zufällig gewählten Pseudogenes in die rearrangierten Gensegmente eingefügt. Wie in Abb. 10 dargestellt werden zwischen 10 und 300 Basenpaare übertragen. Dieser Genkonversion genannte Prozess ist ein sehr potenter Mechanismus zur Generierung eines großen Repertoires unterschiedlicher B-Zellen [70].



**Abb. 10 Genkonversion in der Bursa Fabricii**

Modifiziert nach Janeway's Immunobiology [2].

VDJ = VDJ-Gensegment und C= C-Gensegment der schweren Kette, VJ = VJ-Gensegment und C= C-Gensegment der leichten Kette des Hühnerimmunglobulins. Gezackte Symbole = Pseudogene  
Kleine DNA-Stücke mehrerer trunkierter V-Gensegmente links bzw. upstream der rearrangierten VDJ- und VJ-Segmente werden durch Genkonversion in die Sequenz der rearrangierten Segmente eingefügt und erhöhen somit deren Vielfalt.

Interessanterweise finden diese Prozesse in einem Zeitfenster von Embryonaltag 10 bis zur Geschlechtsreife der Hühner statt. Danach kommt es zur Involution der Bursa Fabricii [76]. Diversifizierte B-Zellen verlassen ab dem Schlupf die Bursa und besiedeln periphere sekundärlymphatische Organe [76]. Im Huhn konnte man noch keine Entwicklungsstadien von peripheren B-Zellen wie die T1- und T2-Stadien der Maus beschreiben. Auch eine Unterteilung der peripheren B-Zellen anhand ihrer Lokalisation und Oberflächenmarker in unterschiedliche Subtypen gestaltet sich schwierig. Letztlich kann auch keine Einteilung in die B1- und B2-B-Zelllinien vorgenommen werden. Der Mechanismus des Einfügens von N-Einzelnukleotiden bei dem Rearrangement der Immunglobulingene durch die Terminale Deoxynukleotidyl Transferase, der unter anderem die B2-B-Zelllinie charakterisiert, wird vom Huhn überhaupt nicht zur Generierung seines Repertoires genutzt [70].

Andere Spezies wie Kaninchen, Schaf, Rind und Schwein weisen ebenfalls eine weitere Differenzierung der Vielfalt ihrer B-Zellen im darmassoziierten

lymphatischen Gewebe (GALT) auf, wobei die Mechanismen zur Repertoirdifferenzierung je nach Spezies und zugrundeliegendem Repertoire an Immunglobulingensegmenten unterschiedlich sind [77-79]. Alle diese Spezies werden unter dem Überbegriff GALT-Spezies zusammengefasst [2].

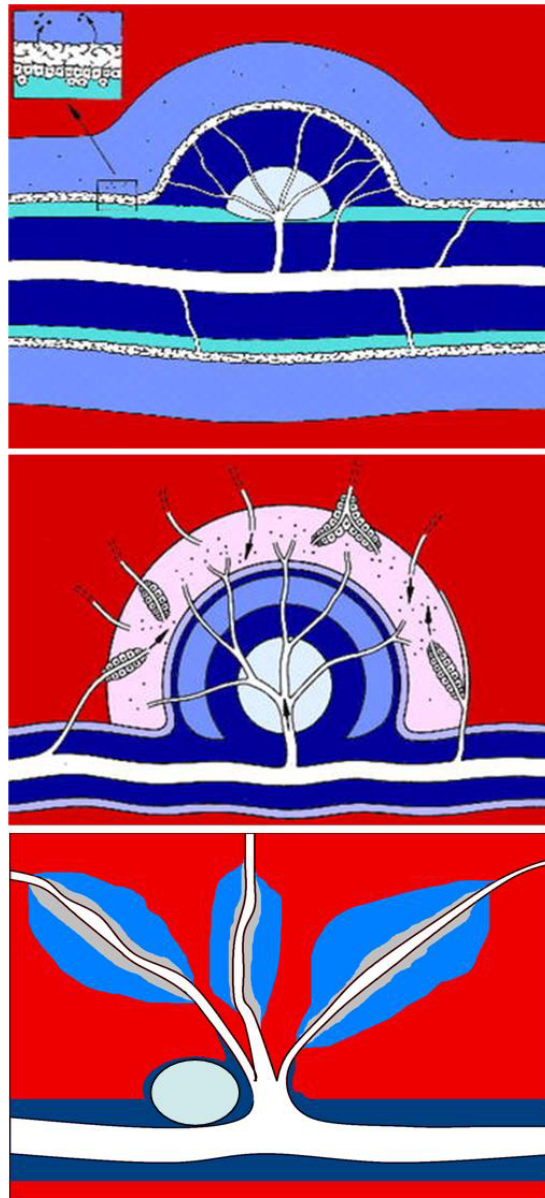
### 2.2.2 GCs

Das Haushuhn weist wie die Säugetiere GCs auf. Die B- und T-Zellregionen der vorhandenen lymphatischen Organe des Huhnes sind jedoch anders organisiert als ihre Äquivalente im Säuger [76].

Hühner besitzen keine dem Säuger vergleichbar ausgebildeten Lymphknoten. Sie weisen Murale Lymphknoten auf. Es handelt sich hierbei um im Vergleich zu Mensch und Maus deutlich geringere Mengen von einer Kapsel umschlossenen lymphatischen Gewebes. Dennoch ist eine Trennung in B- und T-Zellbereiche anzunehmen, da charakteristische GCs beschrieben werden konnten [76, 80-81]. Die muralen Lymphknoten sind der Wand der Lymphgefäße aufgelagert. Hühner besitzen weitere sekundärlymphatische Gewebe an Schleimhäuten. Dies sind z.B. die darmassoziierten Zäkaltonsillen und Peyer'schen Platten, die konjunktivaassoziierte Hader'sche Drüse und das bronchusassoziierte lymphatische Gewebe (BALT). Die Milz fungiert auch im Huhn als sekundärlymphatisches Organ [76]. Das Milzgewebe ist unterteilt in weiße und rote Milzpulpa. Das lymphatische Gewebe der weißen Pulpa besteht einerseits, vergleichbar dem der Säuger, aus periarteriolären lymphatischen Scheiden (PALS) mit vielen CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen. Die B-Zellregionen der Hühnermilz sind jedoch nicht als folliculäre Strukturen organisiert. Sie umschließen den mittleren Bereich von Penizillarkapillaren. Um die Penizillarkapillare liegen retikuläre Zellen, die das Ellipsoid bilden, einen effektiven Filtrationsapparat für Antigene aus dem Blut. Daran schließen sich die B-Zellen an. Das Ellipsoid besteht unter anderem aus spezialisierten Zellen, die am Transport von Antigenen aus dem Blut in die B-Zellregion beteiligt sind [76]. Die B-Zellregion wird entsprechend ihrer Lage als periellipsoidale weiße Pulpa (PWP) angesprochen (Abb. 11, unten) [76].

Folliculäre und Marginalzonen B-Zellen kann man im Huhn demnach anhand ihrer Lage nicht unterscheiden. Die Marginalzonen-B-Zellen der Säuger sind

dadurch gekennzeichnet, dass sie sich nicht, wie die rezirkulierenden follikulären B-Zellen, im Primärfollikel des lymphatischen Organs aufhalten. Sie befinden sich hingegen in der Marginalzone, einer B-Zellregion die im Säuger lediglich die Milz aufweist [82]. Am Übergang der Marginalzone von Ratte und Maus zum primären B-Zellfollikel befindet sich ein Netz kleiner Blutgefäße, das sich in Marginalsinusse öffnet. Dorthin gelangen über das Blut Antigene und werden von den ansässigen Phagozyten aufgenommen. Gleichzeitig haben die dort residierenden Marginalzonen-B-Zellen Zugang zu diesen Antigenen direkt aus der Blutbahn (Abb. 11, oben). In der Marginalzone der humanen Milz hingegen gehen B-Zellfollikel und Marginalzone direkt ineinander über, ohne durch einen Marginalsinus räumlich getrennt zu sein. Während sich in der Nagermilz der B-Zellfollikel umsäumt von den Marginalzonen B-Zellen räumlich lediglich an die T-Zellzone (PALS) anschließt, sind B-Zellfollikel und Marginalzone in der humanen Milz zusätzlich von einer Schicht  $CD4^+$ -T-Zellen umrahmt. Daran schließt sich eine weitere dünne B-Zellschicht an, und darauf folgt die Perifollikuläre Zone mit Sinus und Blutgefäßen. Von dieser Seite können Antigene aus dem Blut an die Marginalzone und den B-Zellfollikel herangetragen werden. (Abb. 11, Mitte) [82].



**Abb. 11 Aufbau der weißen Milzpulpa bei Maus und Ratte, Mensch und Huhn**

Modifiziert nach Steiniger et al. [82].

Vergleichende Schemata des Aufbaus der weißen Milzpulpa von Ratte und Maus (oben), Mensch (Mitte) und Huhn (unten).

Oben: Ratten- bzw. Mäusemilz: Eine Zentralarterie (weiß) durchzieht umgeben von der T-Zellzone=PALS (dunkelblau) die Milz. Ein B-Zellfollikel mit einem germinalem Zentrum (hellblau) und den davon verdrängten folliculären B-Zellen als folliculärer Mantel (ebenfalls dunkelblau) schließen sich dem PALS an. Die Marginalzone (mittelblau) umgibt den Follikel und das PALS. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Grenze der Marginalzone zum PALS und dem Follikel, den Marginalsinus. Die äussere PALS-Zone (türkis) ist der Bereich durch den rezirkulierende folliculäre B-Zellen zum folliculären Mantel gelangen.

Mitte: Milz des Menschen: GC (hellblau) und Folliculärer Mantel (dunkelblau) sind von der Marginalzone (mittelblau) direkt umrahmt. Die Marginalzone umschließt lediglich den Follikel. Eine Schicht  $CD4^+$ -T-Zellen (beides dunkelblau) umschließt Follikel und Marginalzone. An diese T-Zellschicht schließt sich eine dünne B-Zellschicht an (violett). Follikel und Marginalzone mit der umgebenden T-Zell- und B-Zellschicht werden eingerahmt von der gefäßreichen perifolliculären Zone (rosa).

Unten: Hühnermilz: Das GC (hellblau) liegt innerhalb der T-Zellzone (dunkelblau). An das Ellipsoid (grau) um kleine Gefäße der Milz (weiß) schließt sich die periellipsoidale weiße Pulpa (mittelblau) mit B-Zellen an.

Das Ellipsoid der Hühnermilz dient wie der Marginalsinus der Filtration von Antigen aus dem Blut. Auch um das Ellipsoid in der Hühnermilz herum befindet sich eine permanent vorhandene Zone, die reich an B-Zellen ist [76]. Aus diesem Grund schließt man auch auf funktionelle Gemeinsamkeiten der B-Zellkompartimente der periellipsoidalen weißen Pulpa der Hühnermilz und der Marginalzone der Säugermilz. Die PWP wird deshalb als Marginalzonenäquivalent des Huhnes angesprochen [83].

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass bei Mensch und Maus ein Charakteristikum der Marginalzonen-B-Zellen ihre Aktivierbarkeit durch T-Zellunabhängige Antigene vom Typ II ist. Im Gegensatz zu follikulären B-Zellen entwickeln die Marginalzonen-B-Zellen neben T-zellabhängigen Immunantworten auch eine humorale Immunantwort ohne dazu T-Zellhilfe zu benötigen [84].

Die B-Zellregion der Hühnermilz ist jedoch auf die B-Zellen der periellipsoidalen weißen Pulpa beschränkt. Dennoch entwickeln auch Hühner in der Milz GCs, die, wie im Folgenden näher dargelegt wird, B-Zellen beherbergen, welche die Prozesse einer T-zellabhängigen Immunantwort auf Proteinantigene durchlaufen. Diesen entsprechende Antigene lösen in der Maus eine Antwort durch follikuläre B-Zellen aus [59, 85]. Dies wirft die Frage auf, ob die morphologischen ähnlichen Milzkompartimente Marginalzone der Säuger und PWP des Vogels Huhn tatsächlich funktionell gleichartige B-Zellen beherbergen [83].

Die B-Zellregion der Hühnermilz liegt isoliert umgeben von roter Pulpa und ist somit räumlich von dem  $CD4^+$ -T-zellreichen PALS getrennt. Die nach Immunisierung mit einem typischen T-zellabhängigen Antigen entstehenden GCs in der Hühnermilz bilden sich jedoch direkt innerhalb der T-Zellzone und nicht innerhalb der primär vorhandenen B-Zellregionen der weißen Pulpa (Abb. 11, unten) [86].

Etablierte GCs in der Hühnermilz sind kugelige Gebilde von 50 bis 150 $\mu$ m Durchmesser mit einer bindegewebigen Kapsel, die die GC-B-Zellen umschließt und gegen die umgebenden T-Lymphozyten abschließt [87-88]. Im germinalen Zentrum des Huhns finden sich B-Zellen, FDCs, die Antigen als Immunkomplexe auf ihrer Oberfläche speichern und  $CD4^+$ -T-Helferzellen [83, 87, 89]. Auch im



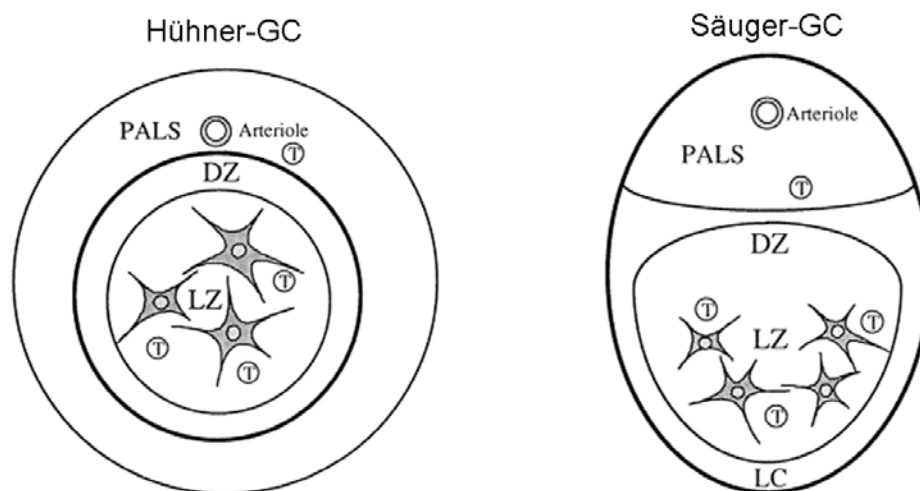
Huhn treten GCs in der Milz um einige Tage zeitversetzt nach der Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen auf. [90] Das Antigen aus dem Blut gelangt zunächst innerhalb weniger Stunden nach intravenöser Immunisierung über das Ellipsoid in die Region der periellipsoidalen weißen Pulpa. Schon zwei Tage nach Immunisierung findet sich das Antigen auch gebunden auf Zellen, die als FDCs ansprechbar sind, in der T-helferzellreichen PALS-Region. Ein bis zwei Tage nach Immunisierung treten Ansammlungen von antigenspezifischen antikörpertragenden Zellen in der Nähe des in der T-Zellzone abgelagerten Antigens auf. Nach drei Tagen befinden sich die antigenspezifischen Zellen am Übergang der T-Zellzone zur roten Pulpa und in der Umgebung großer Gefäße innerhalb der roten Pulpa. Diese Zellen weisen das Erscheinungsbild von Plasmazellen mit großem Zytoplasma auf. Ab diesem Zeitpunkt finden sich auch GCs mit bindegewebiger Kapsel innerhalb der T-Zellzone, in deren Zentrum das Antigen auf FDCs abgelagert ist. Ob es sich zu diesem Zeitpunkt um spezifische GCs handelt, die auf die Immunisierung hin entstanden sind, oder ob das Immunisationsantigen lediglich auf FDCs schon vorhandener GCs aus anderen Immunantworten abgelagert wird, ist noch unklar. Vier Tage nach Antigenapplikation sind in den GCs der Milz antigenspezifische Zellen mit dem Phänotyp von Plasmazellen zu finden [83].

Genanalysen der Verwandtschaft von B-Zellen aus einzelnen GCs aus der Hühnermilz haben gezeigt, dass mehrere antigenaktivierte B-Zellen zu Beginn der germinalen Zentrumsreaktion ein GC besiedeln. Im Verlauf der im germinalen Zentrum stattfindenden Proliferation der antigenspezifischen, aktivierten B-Zellen wird zunächst über den aus der bursalen B-Zellentwicklung bekannten Mechanismus der Genkonversion, im späteren Verlauf, wie beim Säuger beschrieben, durch somatische Hypermutation der Immunglobulingene das primär nach Differenzierung in der Bursa während der B-Zellentwicklung geschaffene antigenspezifische B-Zellrepertoire erweitert. Es findet dann durch Selektionsprozesse eingeschränkt eine oligoklonale Weiterentwicklung der GC-B-Zellen statt [85, 91-92].

Hühner sind nicht nur dazu in der Lage, die Affinität der im Verlauf einer Antikörperantwort gebildeten Antikörper über Prozesse der germinalen

Zentrumsreaktion zu steigern. Auch der Klassenwechsel von IgM zu den bei Hühnern bekannten Immunglobulinklassen IgY und IgA wird durchgeführt. Auch in dieser Spezies wird ein Zusammenhang dieser Prozesse mit dem Auftreten von GCs vermutet [93].

Die beiden funktionell unterschiedliche Zonen des germinalen Zentrums des Säugers wurden zunächst rein histologisch beschrieben aufgrund des Auftretens von kleinen locker gepackten Zentrozyten in der hellen Zone und großen blastoiden dicht gepackten Zentroblasten in der dunklen Zone [94]. Die GCs des Huhnes weisen keine rein histologisch erkennbare Zonierung auf. Jedoch gibt es auch im germinalen Zentrum des Huhns einen Bereich sich stark teilender B-Zellen. Die Proliferation der B-Zellen erscheint hier am stärksten in einer B-Zellschicht direkt unter der Kapsel des germinalen Zentrums. Im Zentrum des Follikels teilen sich die Zellen nicht so stark. Hier finden sich hingegen antigenbeladene FDCs. Diese sind in der äusseren Schicht des germinalen Zentrums mit stark proliferierenden B-Zellen kaum vertreten (Abb. 12) [87].



**Abb. 12 Schematischer Vergleich des Aufbaus von Hühner- und Säuger-GCs**

Modifiziert nach Yasuda et al. [87].

DZ=Dunkle Zone, LZ= Helle Zone, T=T-Zelle, PALS= Periarteriöläre Lympheische Scheide, LC=Lymphozytenkorona.

So wird vermutet, dass das FDC-reiche Zentrum des germinalen Zentrums der Hühner funktionell der hellen Zone der Säuger entspricht. Hier soll die Selektion der neuen B-Zellvarianten stattfinden. Es wird gemutmaßt, dass die Schicht stark proliferierenden Zellen am äusseren Rand des germinalen Zentrums funktionell

der dunklen Zone der Säuger entspricht und die beschriebenen Veränderungen der Immunglobulingene durch Genkonversion und somatische Mutation dort erfolgen (Abb. 12) [87].

Die Verteilung der auch im Huhn vorhandenen CXC- und CC-Chemokine und der entsprechenden Chemokinrezeptoren im Gewebe der Milz, die eventuell homolog zu ihrer Rolle in der Maus der vermuteten räumlichen Trennung der im germinalen Zentrum stattfindenden Prozesse zugrunde liegen, ist noch nicht näher untersucht [95]. Auch über die zelluläre Interaktion der GC-B-Zellen mit T-Helferzellen und die Bedeutung von Zytokinen für die GC-Bildung und -Funktion im Haushuhn ist noch nichts bekannt.

### **2.3 Die Funktion des Zytokins B-Zell-Aktivierungsfaktor der Tumor Nekrose Faktor-Familie (BAFF)**

Die tatsächliche Größe des B-Zellpool eines Organismus wird bestimmt durch ein Gleichgewicht von Bildung, Erhaltung, Abbau, und Neubildung der B-Zellen. Der Zugang zu Überlebensfaktoren wie dem Zytokin Interleukin 7 (IL-7) beeinflusst entscheidend die Entwicklung eines B-Lymphozyten der Maus [8]. Das Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Familienmitglied B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF, auch genannt TNFSF13B, BLyS oder TALL1) ist ein besonders bedeutsamer Überlebensfaktor für periphere B-Zellen. BAFF, ebenso wie ein weiteres TNF-Familienmitglied A proliferation inducing Ligand (APRIL oder TNFSF13), sind lösliche Liganden, die über Rezeptoren, unter anderem auf B-Zellen, Einfluß nehmen auf die B-Zellhomöostase des Organismus [8].

#### **2.3.1 Das BAFF-System**

##### **2.3.1.1 Liganden**

BAFF und APRIL sind homotrimere Typ-II-Transmembranproteine. TWE-PRIL ist eine membrangebundene Form von APRIL, deren physiologische Bedeutung weitgehend unbekannt ist [8]. BAFF und APRIL werden hingegen proteolytisch gespalten und so zu löslichen Zytokinen prozessiert. Dies gilt besonders für APRIL, wohingegen BAFF auch als membranständiges Protein gefunden wird [96]. Prozessiertes lösliches BAFF und APRIL lagern sich jeweils zu einer für

TNF-Familienliganden charakteristischen homotrimeren Form zusammen. Lediglich BAFF ist auch in der Lage, 60-mere aus 20 Homotrimeren aufzubauen, deren Rezeptorbindungsfähigkeit erhalten ist [97]. APRIL-Trimere hingegen können an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) binden und dadurch eine höhere Oligomerisierung erfahren [98]. Auch die Bildung von gemischten Trimeren aus APRIL und BAFF ist beschrieben [99].

### 2.3.1.2 Rezeptoren

BAFF und APRIL binden beide an die TNF-Rezeptoren B-cell maturation antigen (BCMA oder TNFRSF17) und Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI oder TNFRSF13B). Lediglich BAFF bindet zusätzlich an den BAFF-Rezeptor (BAFFR, BR3 oder TNFRSF13C) [100]. Auch das an HSPGs gebundene APRIL ist über eine Interaktion mit TACI und BCMA biologisch aktiv [101].

### 2.3.1.3 BAFF-Signale in die B-Zelle

BAFF-Bindung an den BAFFR führt in B-Zellen zu einer schwachen Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B und starker Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B2 Pfades. Die Bindung an TACI stimuliert stark den klassischen NF- $\kappa$ B Weg. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der B-Zelle durch BAFF führt zu erhöhter Expression antiapoptotischer Proteine. Die Expression von Myeloid cell leukaemia sequence 1 (MCL1), ein antiapoptotisches B cell-lymphoma 2 (BCL-2)-Familienmitglied, wird durch BAFF in der B-Zelle hochreguliert [102-103]. MCL1 ist notwendig für den Erhalt peripherer B- und T-Zellen [104]. Die Bedeutung von weiteren antiapoptotischen Faktoren, ebenso wie die Rolle der Herunterregulation proapoptotischer Faktoren durch BAFF, ist noch nicht ganz so klar herausgearbeitet, wie es für den Signalweg zur MCL1-Expression der Fall ist [8]. BAFF bewirkt die Expression eines Integrinmusters in der B-Zelle, das sie zum starken Homing in die Marginalzone der Milz befähigt und kann auch einen von T-Zellsignalen unabhängigen Klassenwechsel induzieren [105]. Die Glykolyse, die Proteinsynthese und das Zellwachstum in der B-Zelle werden aktiviert. Somit ist BAFF ein Zytokin, das als starker Überlebensfaktor für B-Zellen fungiert [8].

#### 2.3.1.4 Expression von BAFF, APRIL und ihren Rezeptoren

In der Maus werden BAFF und APRIL von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen (DC) und FDCs gebildet [106]. Die BAFF-Expression durch diese Zellen ist in der Gegenwart von Typ 1 Interferonen (IFN  $\alpha/\beta$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), Interleukin 10 (IL-10) und durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) wie TLR4 und TLR9 erhöht [106-108]. Auch T-Zellen, aktivierte B-Zellen und tumorös entartete B-Zellen können BAFF produzieren [106, 109-110]. BAFF-mRNA wird von allen B-Zellentwicklungsstufen und -subtypen exprimiert, wobei die Expression von BAFF am Übergang zum T1/T2-Stadium auf niedrigere Level herunterreguliert wird. Die BAFF-mRNA-Expression korreliert für B1-B-Zellen mit einer BAFF-Oberflächenexpression auf der B-Zelle. B-Zellentwicklungsstadien und folliculäre B-Zellen zeigen hingegen keine BAFF-Oberflächenexpression. APRIL-mRNA wird von B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark und von reifen B1-B-Zellen exprimiert, während in reifen folliculären B-Zellen keine Expression mehr nachweisbar ist [109]. Über Toll-like-Rezeptoren aktivierte B-Zellen erhöhen die Expression von BAFF auf ihrer Oberfläche und sezernieren BAFF in ihre Umgebung [109]. Neuerdings wurde die Expression von BAFF auch für nichthämatopoetische Zellen nachgewiesen. Dazu gehören unter anderem Synoviozyten aus der Synovia von Menschen mit rheumatoider Arthritis oder auch Osteoklasten im Knochenmark bei Patienten mit multiplen Myelom [111-112]. BAFF wird dabei eine Rolle in der Aufrechterhaltung lokaler Nischen für das Überleben von B-Zellen und Plasmazellen nicht nur im Gesunden, sondern auch im Sinne der aufrechterhaltung krankhafter Prozesse zugesprochen. In der Maus wird der BAFFR schwach auf neuentstandenen, immaturren B-Zellen exprimiert. Mit der Weiterentwicklung der Zellen zur maturaen B-Zelle steigt der Grad der BAFFR-Expression. Alle maturaen B-Zellen exprimieren BAFFR. TACI wird ebenfalls von allen peripheren B-Zellen exprimiert, besonders von Marginalzonen B-Zellen und B1-B-Zellen. BCMA wird lediglich auf antikörperproduzierenden Plasmazellen gefunden [8]. Somit ist neben dem parakrinen auch ein autokriner Regelmechanismus für das BAFF-System des Säugers denkbar.

### 2.3.1.5 Phänotyp defizienter und transgener Mäuse

Eine B-Zelle, die im Knochenmark Genrearrangement gemacht hat und einen B-Zellrezeptor exprimiert, entwickelt sich in der Peripherie, z.T. auch im Knochenmark über drei transitionelle Stadien (T1 bis T3) zur reifen folliculären B-Zelle oder zur Marginalzonen B-Zelle [113]. Dabei entscheidet die Beschaffenheit des entstandenen B-Zellrezeptors darüber, ob eine folliculäre B-Zelle oder eine Marginalzonen B-Zelle entsteht. Defiziente Mäuse haben gezeigt, dass BAFF für einige der B-Zellentwicklungsstadien auf dem Weg zur reifen B-Zelle einen essentiellen Überlebensfaktor darstellt. In BAFF- und BAFFR-defizienten Mäusen entwickeln sich Marginalzonen B-Zellen und folliculäre B-Zellen nicht über das T1-Stadium hinaus [106, 114]. Das Überleben von einmal entstandenen B-Gedächtniszellen ist dagegen völlig BAFF-unabhängig [115]. BAFF-transgene Mäuse hingegen entwickeln eine B-Zellhyperplasie des T2-B-Zellstadiums. Die Marginalzonen und folliculären B-Zellkompartimente sind in diesen Tieren stark vergrößert [116]. APRIL-Knockout-Mäuse entwickeln normale B-Zellkompartimente, sodass davon auszugehen ist, dass APRIL keinen Einfluss auf die B-Zellentwicklung nimmt, oder seine Wirkung durch BAFF in diesen Tieren übernommen wird [117]. TACI-defiziente Mäuse haben erhöhte B-Zellzahlen. TACI scheint entsprechend einen negativ-regulatorischen Effekt auf das B-Zellkompartiment *in vivo* auszuüben [118]. Auch auf aktivierten B-Zellen, die sich zu Effektorzellen entwickeln, wie Plasmablasten auf dem Weg zur Plasmazelle und auf das Überleben von Plasmazellen hat das BAFF- und APRIL-System einen Einfluß. APRIL-Knockout-Mäuse zeigen einen gestörten Klassenwechsel zu IgA. APRIL ist wichtig für das Überleben klassengewechselter Mäuse-B-Zellen. Über die Zeit akkumulieren jedoch auch in APRIL<sup>-/-</sup>-Mäusen, die neonatal keine Plasmazellen im Knochenmark aufweisen, langlebige Plasmazellen im Knochenmark. Dies dafür spricht, dass die Funktion von APRIL auch von BAFF übernommen werden kann [117, 119]. Der die B-Zellzahl negativ regulierende Rezeptor TACI ist notwendig für eine effiziente T-zellunabhängige Typ II Immunantwort. TACI<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine weitgehend normale T-zellabhängige humorale Immunantwort, während die Antwort auf T-zellunabhängige Antigene stark reduziert ist. TACI ist stark exprimiert auf B1- und Marginalzonen B-Zellen, die für T-zellunabhängige Immunantworten vom

Typ II verantwortlich sind. Eine naheliegende Vermutung ist, dass TACI Überlebenssignale für Plasmablasten liefert, die aus diesen Zellen hervorgehen [8, 118]. BCMA-Knockout-Mäuse zeigen lediglich ein eingeschränktes Überleben langlebiger Plasmazellen des Knochenmarks. Das restliche B-Zellkompartiment ist nicht beeinträchtigt [120-121]. Die GC-Reaktion durch folliculäre B-Zellen ist ebenfalls BAFF-abhängig. BAFF scheint nicht zur Induktion von GCs notwendig zu sein, es beeinflusst jedoch die Prozesse im germinalen Zentrum dahingehend, dass die germinale Zentrumsreaktion früher beendet wird. Das FDC-Netzwerk der GCs, ein wichtiger Bestandteil dieser Mikroumgebung, ist in BAFF-defizienten Tieren nicht ausreichend entwickelt. Die Frequenz von Mutationen in GC-B-Zellen ist jedoch unverändert. Es wird diskutiert, dass die reduzierte B-Zellzahl in BAFF-defizienten Tieren nur geringere Mengen des FDC-induzierenden Lymphotoxins (LT) zur Verfügung stellt. Der Mangel dieses für FDC essentiellen Faktors könnte die gestörte FDC-Umgebung der GCs erklären [122-123].

Zusammenfassend zeigen diese Mausmodelle, dass BAFF und der BAFFR die Entwicklung und das Überleben von folliculären und Marginalzonen B-Zellen kontrollieren. APRIL reguliert Aspekte des T-zellunabhängigen Klassenwechsels und ist wichtig für das Überleben von Plasmazellen. TACI unterstützt die Immunantwort von B1- und Marginalzonen B-Zellen gegen repetitive Antigene und wirkt negativ regulierend auf die Größe des B-Zellpools. BCMA unterstützt den Erhalt von Plasmazellen [8].

### **2.3.1.6 Bedeutung von BAFF in der B-Zellhomöostase und Toleranz**

BAFF-transgene Mäuse, deren B-Zellen viel mehr BAFF zur Verfügung steht als dies normalerweise der Fall wäre, entwickeln autoimmune Krankheitsbilder. Sie zeigen eine T-zellunabhängig, jedoch eine von MYD88-abhängige Produktion von Autoantikörpern mit Glomerulonephritis und Entzündung und Zerstörung der Speicheldrüsen [8, 124]. Diese Symptome entsprechen denen des Systemischen Lupus Erythematosus und des Sjögren´s Syndrom des Menschen. T-zelldefiziente BAFF-transgene Mäuse entwickeln im gleichen Ausmaß die genannten Symptome. Der Effekt von BAFF im Überschuss scheint darin zu liegen, dass der uneingeschränkte Zugang zu dem Zytokin BAFF niedrigaffine selbstreaktive B-Zellen, vor allem Marginalzonen B-Zellen und B1-B-Zellen positiv selektiert [8,

125]. BAFF-transgene Mäuse, die keine Marginalzonen B-Zellen besitzen, zeigen keine Speicheldrüsenerkrankung [126]. BAFF-transgene Mäuse die mit MYD88-defizienten B-Zellen rekonstituiert wurden entwickeln auch keine Nephritis [124]. MYD88, ein Protein das in der Zelle an Toll-like-Rezeptoren gekoppelt ist, scheint notwendigerweise aktiviert werden zu müssen, um die Bildung von autoimmunen Antikörpern zu induzieren. Der Rezeptor TACI könnte die Verbindung zwischen der BAFF-Überexpression und der MYD88-abhängigen Aktivierung der B-Zellen herstellen. Die Expression von TACI auf der B-Zelle wird durch TLR7 (RNA-Erkennung) - und TLR9 (DNA-Erkennung) -Aktivierung stark hochreguliert [124]. TACI gilt als ein Rezeptor für BAFF, der positive Signale für die Reifung und das Überleben von Plasmablasten in T-zellunabhängigen Immunantworten von Marginalzonen und B1-B-Zellen liefert [105].

## **2.4 Die Bedeutung von BAFF im Haushuhn**

### **2.4.1 Das chBAFF-System des Haushuhnes**

Das Zytokin BAFF beeinflusst auch im phylogenetisch weit entfernten Huhn die Entwicklung und Homöostase der B-Zellen. Das BAFF-System des Huhnes erscheint, verglichen mit dem der Maus, jedoch weniger komplex aufgebaut.

#### **2.4.1.1 Liganden**

Das BAFF-Molekül des Haushuhns chBAFF wurde als Homolog zum BAFF des Säugers beschrieben. Auf Proteinebene zeigen die löslichen Zytokine humanes BAFF und chBAFF 76% Aminosäureidentität [127]. ChBAFF ist somit ein stark konserviertes Gen [128]. Bis dato konnten kein vollständiges Gen für APRIL noch Hinweise auf einen unvollständigen APRIL-Überrest im Hühnergenom, noch in einer Hühner-Expressed-Sequence-Tag-Datenbank (EST-Datenbank) entdeckt werden [95].

#### **2.4.1.2 Rezeptoren**

Auch die Zahl der für chBAFF im Huhn vorhandenen Rezeptoren ist reduziert. ChBAFFR und chTACI sind als Homologe zu den Säugerproteinen beschrieben.



Für chBCMA besitzt das Huhn kein funktionelles Gen, sondern lediglich einen trunkierten BCMA-Überrest. Dieser befindet sich an der, verglichen mit der Lage des menschlichen BCMA-Genes orthologen Stelle im Hühnergenom [129].

#### 2.4.1.3 Expression von chBAFF und seinen Rezeptoren

Im Huhn wird ein Großteil des chBAFF von B-Zellen produziert [130]. Da BAFF auch für Hühner-B-Zellen einen Überlebensfaktor darstellt, mit antiapoptotischen Eigenschaften für die unterschiedlichen B-Zellentwicklungsstadien, wird ein autokriner Regulationsmechanismus vermutet [130]. Einen möglichen Regelmechanismus dieses autokrinen Systems könnte die differentielle Expression der beiden BAFF-Rezeptoren darstellen. In der Tat sind beide Rezeptoren in peripheren muren B-Zellen auf mRNA-Ebene in ähnlicher Weise exprimiert. BAFFR wird ebenfalls von embryonalen bursalen B-Zellen exprimiert. TACI zeigt allerdings eine starke Hochregulation seiner Expression auf mRNA-Ebene in bursalen B-Zellen erst in den ersten Tagen nach dem Schlupf [129]. Interessanterweise fällt diese höhere Expression des Rezeptors TACI zeitlich mit einem weiteren Meilenstein in der Reifung der bursalen B-Zellen zusammen. Während der embryonalen Phase der Diversifizierung des B-Zellrepertoires in den Bursafollikeln benötigen die B-Zellen lediglich ein tonisches Signal ihres B-Zellrezeptors. Dieses wird in die Zelle vermittelt durch mit dem Immunglobulinmolekül in der Zellmembran zusammengelagerte Heterodimere aus den signaltransduzierenden Ketten  $Ig\alpha$ - und  $Ig\beta$  [131-132]. Hühner-B-Zellen, die lediglich eine trunkierte  $IgM$ -Form ohne Antigenbindungsdomänen zusammengelagert mit  $Ig\alpha$  exprimieren, können embryonal produktiv die Bursa besiedeln und überdauern bis zum Schlupf [133]. Sayegh et al. und Aliahmad et al. konnten jedoch zeigen, dass dieses tonische Signal in der Phase nach dem Schlupf nicht mehr ausreicht zum Erhalt der bursalen B-Zellen [134-135]. Die B-Zellen benötigen hingegen einen aktivierbaren Zellrezeptor wie den B-Zellrezeptor inklusive Antigenbindungsstellen. Dieser, assoziiert mit dem  $Ig\alpha I g\beta$ -Heterodimer, vermittelt nach Aktivierung durch Antigenbindung Überlebenssignale in die B-Zelle [134-135]. Nach dem Schlupf werden Antigene aus dem Bursalumina in die B-Zellfollikel der Bursa transportiert [136-138]. Die Fähigkeit mit ihrem B-

Zellrezeptor diese Antigene zu erkennen, könnte eine Rolle spielen für den Erhalt und die Weiterentwicklung der bursalen B-Zellpopulationen nach dem Schlupf. Humane B-Zellen erhöhen die Expression von TACI nach B-Zellrezeptor-Aktivierung unter Vorhandensein von Interleukin 2 (IL-2), IL-10 und Zugang zu T-Zellhilfe [139]. TACI, der durch BAFF vermittelt negativ regulatorisch auf das B-Zellkompartiment der Maus einwirkt, wird genau zu dem Zeitpunkt ab dem die bursale B-Zelle auf die Antigenbindungsfähigkeit ihres B-Zellrezeptors angewiesen ist, hochreguliert [118, 129].

#### **2.4.1.4 *In vitro*-Daten zum Einfluß von chBAFF**

Zellkulturarbeiten mit isolierten primären Hühner-B-Zellen gaben erste Hinweise darauf, dass BAFF trotz seiner ungewöhnlichen Bildung durch B-Zellen auch im Huhn deren Überleben beeinflusst. Mature B-Zellen aus der Milz überlebten in Kultur unter Zugabe von chBAFF deutlich länger. Das gleiche gilt für unreife bursale B-Zellen, die aus Bursen nach dem Schlupf gewonnen wurden[127].

#### **2.4.1.5 Phänotyp defizienter und chBAFF-überexprimierender Hühner**

Hühner, die das chBAFF-Protein nach embryonaler Infektion mit dem retroviralen Vektor RCASBP(A) chBAFF überexprimieren, weisen ein stark vergrößertes B-Zellkompartiment auf [140]. Da man beim Haushuhn bisher noch keine peripheren B-Zellentwicklungsstadien unterscheiden kann und die Unterscheidung reifer B-Zelltypen nicht möglich ist, gestaltet sich die Interpretation des Phänotyps der BAFF-überexprimierenden Hühner schwieriger als in der Maus. Zwei Wochen alte chBAFF-überexprimierende Hühner zeigen eine Verdopplung der B-Zellfrequenzen im Blut. Diese höhere B-Zellzahl im Vergleich zu Kontrolltieren bleibt während der ersten beiden Lebensmonate erhalten. Kontrolltiere hingegen bauen ihr B-Zellkompartiment im Blut innerhalb der ersten beiden Lebensmonate vergleichsweise stärker aus, sodass nach sieben Wochen BAFF-überexprimierende und Kontrolltiere die gleichen Anteile peripherer Blut-B-Zellen aufweisen. Auch in der Milz BAFF-überexprimierender Hühner finden sich zunächst ungefähr doppelt so viele B-Zellen. Jedoch ist auch hier nach zwei Lebensmonaten kein Unterschied zu den Kontrolltieren mehr

darstellbar. Mit dem erhöhten Aufkommen von B-Zellen geht ein zunächst signifikant erhöhter Gesamt-IgM- und -IgA-Spiegel einher. Die IgY-Spiegel sind hingegen nicht konstant signifikant erhöht, eine Tendenz zu höheren IgY-Spiegeln ist jedoch nachvollziehbar. Nach zwei Monaten haben sich die Immunglobulinspiegel im Blut von BAFF-überexprimierenden und Kontrolltieren angeglichen [140]. Betrachtet man jedoch lediglich die spezifischen Antikörper einer in der vierten Lebenswoche induzierten T-zellabhängigen Immunantwort, so sind die antigenspezifischen IgM-Spiegel signifikant erhöht. Die IgY-Spiegel zeigen auch in diesem Fall keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren [141].

ChBAFF kann aufgrund seiner großen Homologie an humane und murine BAFF-Rezeptoren binden [127]. ChBAFF-defiziente Hühner, die nach embryonaler RCASBP(A) huBCMA-Infektion einen menschlichen BCMA-Rezeptor überexprimieren, zeigen eine starke Reduktion der B-Zellkompartimente. Die Bursa dieser Tiere an Embryonaltag 18 (ED18) ist fast vollständig von B-Zellen depletiert. Bis zum Alter von drei Wochen akkumulieren jedoch auch in der Bursa ChBAFF-defizienter Hühner B-Zellen. Die Zahl der bursalen B-Zellfollikel und die Zahl der sie besiedelnden B-Zellen sind jedoch geringer ausgeprägt als in gleichalten Kontrolltieren. Die B-Zellzahlen im Blut und in der Milz chBAFF-defizienter Tiere sind deutlich verringert [140].

Auch die Überexpression eines löslichen chBAFFR resultiert in stark verringerten peripheren B-Zellzahlen in Blut und Milz junger Hühner [129].

Diese Tiermodelle zeigen, dass die Entwicklung bursaler und peripherer Hühner-B-Zellstadien chBAFF-abhängig erfolgt. Die Effekte der chBAFF-Überexpression werden innerhalb der ersten Lebensmonate kompensiert. Die Angleichung der B-Zellzahlen und Immunglobulinspiegel erfolgt trotz konstanter Spiegel des im Tier überexprimierten chBAFF. Ob dies ein regulatorischer Mechanismus des autokrin agierenden BAFF-Systems im Huhn, oder ein Artefakt der RCAS-Technik ist, bleibt aufzuklären.

Dennoch kann die *in vivo* B-Zellantwort maturer B-Zellen auf eine Immunisierung unter chBAFF-Überexpression oder -Defizienz in den generierten Tieren näher untersucht werden. Die Induktion einer T-zellabhängigen

Immunantwort hat stabile Ergebnisse geliefert [141]. Sie kann genutzt werden um weitere Rückschlüsse auf die BAFF-Abhängigkeit antigenaktivierter Hühner-B-Zellen während einer Immunantwort zu ziehen. Aufgrund des Mangels an Markern für Hühner-B-Zell-Aktivierungsstadien und -Effektorzellen müssen solche Studien anhand der histologischen Beurteilung der Verteilung als antigenspezifisch anzusprechender aktivierter B-Zellen nach Immunisierung in sekundärlymphatischen Organen durchgeführt werden [83].

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die germinale Zentrumsreaktion des Haushuhnes anhand immunhistologischer Untersuchungen charakterisiert werden. Die zelluläre Zusammensetzung, Zonierung und die Anbildung von GCs in der Hühnermilz sollten untersucht werden, um das physiologische Erscheinungsbild von GCs zu einem definierten Zeitpunkt nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen erheben zu können. Die erhobenen Daten über den physiologischen Verlauf der Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Modellantigen sollten genutzt werden, um die Rolle des Zytokins chBAFF in der sekundären Diversifizierung von B-Zellen innerhalb von GCs *in vivo* zu untersuchen.

Um die Funktion des Zytokins chBAFF zu untersuchen sollten Unterschiede und Parallelen zum physiologischen Ablauf der germinalen Zentrumsreaktion nach Immunisierung mit dem charakterisierten Modellantigen in Hühnern, die mittels des retroviralen Vektorsystems RCAS(BP)A das Zytokin chBAFF überexprimierten, beschrieben werden. Durch die Überexpression des Dekoy-Rezeptors huBCMA chBAFF-defiziente Hühner sollten in gleicher Weise untersucht werden.

Aus den Abweichungen und Parallelen zum physiologischen Ablauf der germinalen Zentrumsreaktion und der GC-Morphologie in Tieren, deren B-Zellen stark limitierten bzw. unbegrenzten Zugang zu chBAFF hatten, sollte auf den Einfluß von chBAFF auf die sekundäre Diversifizierung antigenaktivierter B-Zellen in GCs des Huhns rückgeschlossen werden.

## 4 Material und Methoden

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang aufgeführten Bezugsquellen. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Chemikalien, Medien und Zusätze bei 4°C gelagert. Verwendete Alkohole waren soweit nicht anders angegeben vergällte Alkohole. Alle angegebenen Verdünnungen dieser Alkohole wurden in Aqua dest. hergestellt. Verwendete weitere Chemikalien hatten soweit nicht anders angegeben die Qualität pro Analysis.

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

Die Tierversuche mit Hühnern, Enten und Zebrafinken wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.2-1-54-2531-121-09 genehmigt.

#### 4.1.1 Herkunft der Tiere

##### 4.1.1.1 Hühner

Die Eier der Hühnerlinien LSL (*Lohmann's selected Leghorn*) stammten von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven. Die Eier der Linie M11 (*B<sup>2/2</sup>-Haplotyp*) stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee. Alle Eier wurden im Institut für Tierphysiologie unter Standardbedingungen bebrütet und die Tiere bis zum Versuchsalter großgezogen.

##### 4.1.1.2 Enten

Die Enten wurden von einem kommerziellen Entenmastbetrieb (Rohrmeyer, Hainkirchen bei Pfaffenberg) im Versuchsalter erworben.

##### 4.1.1.3 Zebrafinken

Die Zebrafinken wurden aus der Zucht der Klinik für Vögel der LMU im Versuchsalter bezogen.

#### 4.1.2 Tierhaltung

Die Hühner wurden in Gruppen in Gitterrostkäfigen und Volieren gehalten. RCASBP(A)-transduzierte Tiere und unbehandelte Kontrollen wurden in

separaten Käfigen bzw. Volieren gehalten. Die Enten wurden paarweise in Bodenhaltung gehalten, die Zebrafinken paarweise in Käfigen. Es wurde handelsübliches Alleinfutter gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Käfige und Volieren waren mit Sitzstangen und Sandbädern ausgestattet, den Enten stand ein Wasserbad zur Verfügung.

## 4.2 Immunisierungen und Probennahme

### 4.2.1 Material

#### Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0g Natriumchlorid<sup>5</sup> (NaCl)  
1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat<sup>5</sup> (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)  
0,2g Kaliumhydrogenphosphat<sup>5</sup> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
0,2g Kaliumchlorid<sup>5</sup> (KCl)  
ad 1000ml Aqua dest.  
Einstellen des pH-Werts mit 1M Salzsäure<sup>5</sup> (HCL) auf pH 7,2  
Lagerung bei Raumtemperatur  
PBS für die Zellkultur wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert

#### Dinitrophenyliertes Keyhole Limpet Hemocyanin<sup>1</sup> (DNP-KLH)

#### Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe<sup>2</sup> (RPAP)

#### Freund's komplettes Adjuvans<sup>3</sup> (FCA)

Lagerung bei 4°C

#### Freund's inkomplettes Adjuvans<sup>3</sup> (FIA)

Lagerung bei 4°C

### 4.2.2 Durchführung

Um eine ausreichende Zahl von GCs in der Milz der Versuchstiere zu garantieren wurden diese mit verschiedenen T-zellabhängigen Antigenen immunisiert.

#### 4.2.2.1 Immunisierungen mit DNP-KLH

In Versuchen in denen die Spezifität der induzierten GCs nicht von Interesse war, erfolgte die Immunisierung mit dem dinitrophenylierten Protein Keyhole Limpet Hemocyanin (DNP-KLH).

Acht bis 12 Wochen alte M11-Hühner wurden einmalig intravenös mit 100µg DNP-KLH pro Tier in 300µl sterilem PBS immunisiert. Sieben und 14 Tage

danach wurden die Milzen der Tiere entnommen.

#### **4.2.2.2 Immunisierungen mit Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen**

##### **4.2.2.2.1 Einmalige intravenöse Immunisierung**

Für Versuche in denen die Ablagerung von Antigen und die Spezifität der GCs untersucht wurden, erfolgte die Immunisierung mit Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen.

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Anbildung antigenspezifischer GCs wurden 8 bis 12 Wochen alte LSL-Hühner einmalig intravenös mit 200 $\mu$ g Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen pro Tier in 300 $\mu$ l sterilem PBS immunisiert. Drei, sieben 14 und 28 Tage danach wurden Milz, Knochenmark- und Plasmaproben entnommen.

Zur Untersuchung der GC-Reaktion in chBAFF-überexprimierenden oder – huBCMA-überexprimierenden LSL-Hühnern wurden 5 Wochen alte Tiere ebenfalls einmalig intravenös mit 200 $\mu$ g Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen pro Tier in 300 $\mu$ l sterilem PBS immunisiert. 14 Tage danach wurden Organ- und Plasmaproben gewonnen.

Adulte Zebrafinken wurden einmalig intraperitoneal mit 200 $\mu$ g Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen pro Tier in 300 $\mu$ l sterilem PBS immunisiert. 14 Tage später erfolgte die Entnahme der Milz.

##### **4.2.2.2.2 Immunisierung zur Etablierung eines Standardserums**

Um Standardseren mit hohem Gehalt spezifischer Antikörper für die ELISA zur Detektion von antigenspezifischen IgM- und IgY-Antikörpern aus Plasmaproben zu generieren wurden 12 bis 15 Wochen alte M11-Hühner immunisiert. Den Tieren wurden je 100 $\mu$ g Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe in 0,5ml sterilem PBS 1:1 versetzt mit komplettem Freund'schem Adjuvanz intramuskulär in den Brustmuskel injiziert. Drei Wochen später wurde die gleiche Menge Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe versetzt mit inkomplettem Freund'schem Adjuvanz zur erneuten



Immunisierung in den gleichen Muskel eingesetzt. Zur Gewinnung eines Standardserums für den antigenspezifischen IgM-ELISA wurden die Hühner eine Woche nach der zweiten Injektion entblutet. Für die Gewinnung eines Standardserum für den antigenspezifischen IgY-ELISA wurden die Tiere zwei Wochen nach dem Boost entblutet.

### **4.3 BrdU- und Thymidin-Behandlung**

#### **4.3.1 Material**

**PBS, steril**

**Bromdeurioxidin 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)<sup>3</sup>**

**Thymidin<sup>3</sup>**

#### **4.3.2 Durchführung**

##### **4.3.2.1 BrdU-Gabe i.p.**

Um die Lokalisation proliferierender Zellen in GCs der Milz zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde Hühnern hochdosiert 50mg/kg BrdU in einer Konzentration von 10mg/ml gelöst in sterilem PBS intraperitoneal injiziert. Drei, sieben und 20 Stunden später wurden die Organe der Tiere entnommen.

Um die Proliferation in GCs der Zebrafinkenmilz zu untersuchen wurde diesen ebenfalls 50mg/kg BrdU in einer Konzentration von 10mg/ml gelöst in sterilem PBS intraperitoneal injiziert und drei Stunden später die Milz entnommen.

##### **4.3.2.2 BrdU-Gabe i.v.**

Für das BrdU-Pulse-Chase-Experiment wurde Hühnern 10mg/kg BrdU in einer Konzentration von 10mg/ml in sterilem PBS gelöst intravenös injiziert.

Enten, deren Milz-GCs auf das Vorhandensein definierter Proliferationszonen drei Stunden nach BrdU-Injektion überprüft werden sollten, wurden ebenfalls mit 10mg/kg BrdU intravenös in einer Konzentration von 10mg/ml in sterilem PBS gelöst behandelt.

### 4.3.2.3 Block der BrdU-Einlagerung durch Thymidin-Gabe

Um den weiteren Einbau von BrdU in die DNA von in der S-Phase befindlichen Zellen zu hemmen, wurde den Hühnern im Pulse-Chase-Experiment drei Stunden nach intravenöser BrdU-Gabe (siehe 4.3.2.2) im 150fachen Überschuß Thymidin verabreicht. Das Thymidin wurde zu 0,17g/ml in sterilem PBS gelöst je zur Hälfte intravenös und intraperitoneal injiziert. Wie von Paramithiotis et al. gezeigt hemmt Thymidin im Überschuß kompetitiv die BrdU-Inkorporation [142]. Um die Aufrechterhaltung einer hohen Konzentration an Thymidin im Körper zu gewährleisten wurde die Thymidingabe zweistündlich bis zur Milzentnahme acht Stunden nach initialer BrdU-Injektion wiederholt. Kontrolltieren wurde einmalig wie unter 4.3.2.2 beschrieben BrdU appliziert. Direkt im Anschluss wurde ihnen die 150fache Menge Thymidin zu 0,17g/ml in sterilem PBS gelöst intravenös injiziert. Weitere Kontrolltiere erhielten nach initialer BrdU-Gabe kein Thymidin. Die Milzen dieser Kontrolltiere wurden drei Stunden nach BrdU-Gabe entnommen.

## 4.4 Histologie

### 4.4.1 Vorbereitung der Gewebeproben für die Histologie, Erstellen von Gewebeschnitten

#### 4.4.1.1 Material

##### Einbettkassetten für Paraffinhistologie<sup>4</sup>

##### 10% Neutral gepufferte Formalinlösung (NBF)

100ml Formalin<sup>4</sup>  
4g Natriumdihydrogenphosphat<sup>4</sup> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
6,5g Di-Natriumphosphat wasserfrei<sup>4</sup> (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
ad 1000ml Aqua dest.  
Lagerung bei Raumtemperatur

##### Aufsteigende Alkoholreihe + Paraffinreihe

2x Ethanol 40%	je 12 Stunden
2x Ethanol 50%	je 12 Stunden
2x Ethanol 60%	je 12 Stunden

2x Ethanol 70% je 12 Stunden  
 2x Ethanol<sup>6</sup> 100% je 12 Stunden  
 2x Isopropanol<sup>6</sup> je 12 Stunden  
 2x Xylol<sup>6</sup> je 24 Stunden  
 Einmalige Verwendung bei Raumtemperatur

1er Paraffin<sup>18</sup> für 24 Stunden  
 3er Paraffin<sup>18</sup> für 24 Stunden  
 6er Paraffin<sup>18</sup> für 24 Stunden  
 9er Paraffin<sup>18</sup> für 24 Stunden  
 Anwendung und Lagerung bei 65°C im Wärmeschrank

#### **TissueTek<sup>®7</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

#### **Peel-Off-Einbettkassetten für Kryohistologie<sup>8</sup>**

#### **Flüssiger Stickstoff<sup>19</sup>**

#### **Aluminiumfolie<sup>9</sup>**

#### **SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträger<sup>7</sup>**

#### **Aceton<sup>5</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur, Verwendung eisgekühlt

#### **Absteigende Alkoholreihe**

Xylol<sup>6</sup> 1 15Min  
 Xylol<sup>6</sup> 2 15Min  
 Isopropanol<sup>6</sup> 1 5Min  
 Isopropanol<sup>6</sup> 2 5Min  
 Ethanol<sup>6</sup> 100% 5Min  
 Ethanol 70% 5Min  
 Lagerung bei Raumtemperatur

#### **PBS**

Lagerung bei Raumtemperatur

### **4.4.1.2 Durchführung**

#### **4.4.1.2.1 Probeneinbettung**

Organproben von Hühnern, Enten und Zebrafinken wurden zum einen in TissueTek eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C mit Aluminiumfolie umwickelt gelagert. Zum anderen wurden Proben für 12 Stunden in NBF fixiert. Danach wurden Formalinreste aus den fixierten Präparaten durch zweimaliges Waschen in PBS für je 12 Stunden entfernt und die Präparate im

Anschluß über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Im Anschluß wurden die dehydrierten Präparate jeweils für 24 Stunden in den vier verflüssigten Paraffinen im Wärmeschrank bei 65°C gelagert um die Diffusion der Paraffine in das Gewebe der Proben zu erlauben. Die Proben wurden dann an einer Ausgießstation in Paraffinblöcke eingebettet. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

#### **4.4.1.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Von Kryoblöcken wurden mit einem Kryotom 8µm dicke Gefrierschnitte der Präparate angefertigt. Desgleichen wurden von den Paraffinblöcken mit einem Mikrotom 5µm dicke Paraffinschnitte gefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost® Plus Objektträger aufgezogen und in beiden Fällen getrocknet. Die Gefrierschnitte trockneten bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Paraffinschnitte wurden für 48 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

#### **4.4.1.2.3 Vorbereitung der Schnitte für die Färbung**

Gefrierschnitte wurden vor Beginn der immunhistologischen Färbungen mit eisgekühltem Aceton zwei Minuten fixiert, zehn Minuten luftgetrocknet und dann für 15 Minuten in PBS gewässert. Paraffinschnitte wurden vor Beginn der immunhistologischen und histologischen Färbungen über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und dann ebenfalls 15 Minuten in PBS gewässert.

### **4.4.2 Histologische Färbungen**

#### **4.4.2.1 Material**

##### **Eosin-Lösung<sup>4</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Mayer's Hämatoxylin-Lösung<sup>4</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Aufsteigende Alkoholreihe**

Ethanol 70%

Ethanol<sup>6</sup> 100% 1

Ethanol<sup>6</sup> 100% 2

Isopropanol<sup>6</sup> 1

Isopropanol<sup>6</sup> 2  
Xylol<sup>6</sup> 1  
Xylol<sup>6</sup> 2  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### **Deckgläser<sup>4</sup>**

#### **Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium<sup>4</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

### **4.4.2.2 Durchführung**

Für die histologischen Färbungen wurden entparaffinierte gewässerte Paraffinschnitte verwendet.

#### **4.4.2.2.1 H&E-Färbung**

Die Schnitte wurden für vier Minuten in Mayer's Hämatoxylin-Lösung verbracht. Danach wurden sie für fünf Minuten unter fließendem Wasser ausgespült um sie zu bläuen. Daran schlossen sich drei Minuten Färbung in Eosin an, gefolgt von Eintauchen für 15 Sekunden in 70%ige Ethanollösung und zweimaligem Auswaschen der Eosinreste in reinem Ethanol für je fünf Minuten. Die Schnitte wurden dann über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol verbracht und mit Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium und Deckgläsern eingedeckelt.

### **4.4.3 Immunhistochemische Einfachfärbungen**

#### **4.4.3.1 Material**

##### **Feuchte Kammer**

##### **Parafilm<sup>®9</sup>**

##### **PBS**

##### **30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>5</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Methanol<sup>6</sup> 40%**

Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Bovines Serumalbumin<sup>3</sup> (BSA)**

##### **Magermilchpulver<sup>5</sup>**

**Pferdeserum<sup>10</sup>**

Lagerung bei -20°C

**Natriumtetraborat-Lösung, 0,1M, pH 8,5**

3,81g Natriumtetraborat<sup>5</sup> (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)

ad 100ml Aqua dest.

Lagerung bei Raumtemperatur

**Salzsäure, 3N**

54,7ml Salzsäure<sup>5</sup> (HCL) 20%

45,3ml Aqua dest.

Lagerung bei Raumtemperatur

**Vectastain<sup>®</sup> ABC-Kit -PK4002<sup>10</sup>**

**Vector<sup>®</sup> DAB-Kit<sup>10</sup>**

**Aqua dest.**

**Mayer's Hämatoxylin-Lösung<sup>4</sup>**

**Aufsteigende Alkoholreihe**

**Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium<sup>4</sup>**

**Deckgläser<sup>4</sup>**

Antikörper (Klonname)	Antigen	erkannter Zelltyp/Struktur	Verdünnung	Referenz
$\alpha$ -Bu1a+b	chB6.1, chB6.2	Hühner-B-Zellen	1:200	[143]
$\alpha$ -CD3 (CT3)	chCD3	Hühner-T-Zellen	1:50	[144]
$\alpha$ -CD4 (2-6)	chCD4	Hühner-T-Helferzellen	1:5	[145]
$\alpha$ -CD8 (3-298)	chCD8	Zytotoxische Hühner-T-Zellen	1:50	[146]
$\alpha$ -IgM	chIgM	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	1:3000	[147]
$\alpha$ -IgY (4D12)	chIgY	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	0,5 $\mu$ g/ml	[147]
$\alpha$ -IgA (K3)	chIgA	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	0,5 $\mu$ g/ml	[147]
(74.3)	unbekannt	Hühner-FDCs	1:200	[148]
(Kul 01)	unbekannt	Myeloidezellen/Makrophagen	1:50	[149]
$\alpha$ -BrdU (Bu1)**	BrdU	Zellen die in der S-Phase BrdU in die DNA inkorporiert haben	1:10000 bzw.1:625	[150]

**Tabelle 2** Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Einfachfärbungen

\*\* Verwendung 1:10000 für Tiere die 50mg/kg BrdU i.p. erhielten; 1:625 für Tiere die 10mg/kg BrdU i.v. erhielten

#### 4.4.3.2 Durchführung

Immunhistochemische Einfachfärbungen wurden von gewässerten Gefrierschnitten und entparaffinierten Paraffinschnitten angefertigt.

Um endogene Peroxidaseaktivität zu blocken wurde zunächst 0,3% Wasserstoffperoxid in 40%igem Methanol für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben und diese mit Parafilm bedeckt. Die Lösung wurde danach durch dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für je fünf Minuten entfernt. Die Schnitte wurden dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen für eine Stunde mit Pferdeserum 1:40 in PBS mit 1% BSA verdünnt inkubiert. Die Lösung wurde abgekippt und der jeweilige Primärantikörper verdünnt in PBS (siehe Tabelle 2) aufgetragen. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen in PBS. Die Markierung der gebundenen Antikörper mit Peroxidase wurde mit Hilfe des Vectastain<sup>®</sup> ABC-Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Peroxidaseaktivität wurde dann mit dem Vector<sup>®</sup> DAB-Kit nachgewiesen (Braunfärbung). Zur Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte zunächst für eine Minute in Aqua dest. gelagert, dann für 35 Sekunden in Mayer's Hämatoxylin-Lösung verbracht und im Anschluß fünf Minuten in fließendem Wasser gebläut. Die Schnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium und Deckgläsern eingedeckelt. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer mit Aqua dest. befeuchteten Inkubationskammer.

Im Falle des  $\alpha$ -BrdU-Antikörpers wurden die Milzgewebeschnitte vor Beginn der Färbungen einer Säurevorbehandlung unterzogen. Hierzu wurde 3N HCl für 3 Minuten auf den Objektträgern inkubiert und abgekippt, gefolgt von zwei je einminütigen Inkubationen mit 10 mmolarer Natriumtetraborat-Lösung. Im Anschluß daran wurde 1% Magermilch in PBS für 15 Minuten auf den Schnitten inkubiert und wieder abgekippt. Die Verdünnung des  $\alpha$ -BrdU-Antikörpers erfolgte ebenfalls in PBS mit 1% Magermilch. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität unterblieb in diesem Fall, da sie schon mit der geschilderten Säurebehandlung erreicht wurde.



#### 4.4.4 Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten

##### 4.4.4.1 Material

**Aqua dest.**

**Feuchte Kammer**

**PBS**

**Natriumtetraborat-Lösung, 0,1M, pH 8,5**

**HCL<sup>5</sup>, 3N**

**BSA<sup>3</sup>**

**Ziegenserum<sup>11</sup>**

Lagerung bei -20°C

**Eselserum<sup>11</sup>**

Lagerung bei -20°C

**Mausserum<sup>11</sup>**

Lagerung bei -20°C

Antikörper (Klonname)	Antigen	erkannter Zelltyp/Struktur	Verdünnung	Tierart (Isotyp)	Referenz
$\alpha$ -Bu1a+b	chB6.1, chB6.2	Hühner-B-Zellen	1:200	Maus (IgG1)	[143]
$\alpha$ -CD3 (CT3)	chCD3	Hühner-T-Zellen	1:50	Maus (IgG1)	[144]
$\alpha$ -CD4 (2-6)	chCD4	Hühner-T-Helferzellen	1:5	Maus (IgG1)	[145]
$\alpha$ -IgM	chIgM	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	1:3000	Maus (IgG1)	[147]
$\alpha$ -IgY (4D12)	chIgY	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	0,5 $\mu$ g/ml	Maus (IgG1)	[147]
$\alpha$ -IgA (K3)	chIgA	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	0,5 $\mu$ g/ml	Maus (IgG2a)	[147]
(74.3)	unbekannt	Hühner-FDCs	1:50	Maus (IgG1)	[148]
(Kul 01)	unbekannt	Makrophagen	1:50	Maus (IgG1)	[149]
$\alpha$ -BrdU (Bu1)**	BrdU	Zellen die in der S-Phase BrdU in die DNA inkorporiert haben	1:10000 bzw 1:625	Maus (IgG2a)	[150]
$\alpha$ -dulgA1	dulgA	Plasmazellen, B-Zellen, Zellen mit Fc-Rezeptoren (FDCs)	1:500	Maus (IgG2a)	[151]
$\alpha$ -duCD4-1	duCD4	Enten-T-Helferzellen	1:500	Maus (IgG1)	[151]
$\alpha$ -Peroxidase <sup>Biotin</sup>	Peroxidase	Zellen mit endogener Peroxidase, bzw Peroxidaseablagerung nach Immunisierung	1:200	Kaninchen	<sup>10</sup>

**Tabelle 3** Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

\*\* Verwendung 1:10000 für Tiere die 50mg/kg BrdU i.p. erhielten; 1:625 für Tiere die 10mg/kg BrdU i.v. erhielten

Immunisierungsantigen	erkannter Zelltyp/Struktur	Verdünnung	Referenz
RPAP = Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe	Zellen mit spezifischen Rezeptoren für das Immunisierungsantigen	0,2mg/ml	[83]

Tabelle 4 Inkubation mit Antigen für Immunfluoreszenzfärbungen

Tierart	Antigen	Konjugat	Verdünnung
Ziege <sup>13</sup>	Maus IgG1	Alexa 568	1:400
Ziege <sup>13</sup>	Maus IgG H+L	Alexa 568	1:400
Ziege <sup>13</sup>	Maus IgG2a	Alexa 488	1:400
Esel <sup>13</sup>	Kaninchen IgG H+L	Alexa 568	1:400
Ziege <sup>12</sup>	Maus IgG H+L	Dylight 488**	Stammlösung 1:100
Pferd <sup>10</sup>	Maus IgG H+L	Biotin	1:100

Tabelle 5 Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

\*\*Lagerung lichtgeschützt, 1:2 in Glycerol verdünnt bei -20°C (=Stammlösung)

Antikörper	Antigen	erkannter Zelltyp	Verdünnung	Tierart	Referenz
AV20	chB6.1, chB6.2	Hühner-B-Zellen	1:100	Maus	[152]

Tabelle 6 Verwendete mit FITC markierte Direktkonjugate für Immunfluoreszenzfärbungen

**Streptavidin-FITC<sup>13</sup>****4'6'Diamidino-2-phenylindol<sup>3</sup> (DAPI)****DAPI-Arbeitslösung**

500µg DAPI  
ad 10ml Aqua dest.

**Vectashield<sup>®</sup> Hard+Set Mounting Medium<sup>10</sup>****Deckgläser<sup>4</sup>****4.4.4.2 Durchführung**

Immunfluoreszenzfärbungen wurden von gewässerten Gefrierschnitten angefertigt. Wurde der  $\alpha$ -BrdU-Antikörper verwendet, so wurden die Milzgewebeschnitte vor Beginn der Färbungen einer Säurevorbehandlung unterzogen (siehe 4.4.3.2.).

**4.4.4.2.1 Doppelfärbungen mit einer direkten und einer indirekten Färbung**

Serum der Tierart, aus der der verwendete Sekundärantikörper stammt, wurde zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungen 1:40 in PBS mit 1% BSA verdünnt für 30 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Nach dem Abkippen dieser Lösung wurde der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS (siehe Tabelle 3) für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS. Im Anschluß wurde der Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS (siehe Tabelle 5) mit 1% BSA verdünnt für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert und nicht gebundener Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS wieder entfernt. Da der direktkonjugierte Antikörper ebenfalls aus der Maus stammt, wurde Mausserum 1:10 in PBS mit 1% BSA verdünnt für eine Stunde auf den Präparaten inkubiert und im Anschluß die Lösung abgekippt, um freie Bindungsstellen des Sekundärantikörpers abzusättigen.

Das Direktkonjugat in PBS verdünnt mit 0,1% DAPI (siehe Tabelle 6) wurde im Anschluß ebenfalls für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert und nicht gebundener konjugierter Antikörper durch dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS wieder entfernt. Die gefärbten Präparate wurden mit Vectashield® Hard+Set Mounting Medium eingedeckelt. Alle Arbeitsschritte ab dem Einsatz der Fluorochrom-Konjugate erfolgten lichtgeschützt.

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper
$\alpha$ -CD4	$\alpha$ -mSlgG H+L-Alexa 568	AV20-FITC
$\alpha$ -CD3	$\alpha$ -mSlgG H+L-Alexa 568	AV20-FITC
Kul01	$\alpha$ -mSlgG H+L-Alexa 568	AV20-FITC
$\alpha$ -BrdU	$\alpha$ -mSlgG H+L-Alexa 568	AV20-FITC

**Tabelle 7** Färbeschemata für Doppelfärbungen mit einer direkten und einer indirekten Färbung

#### 4.4.4.2.2 Doppelfärbungen mit zwei indirekten Färbungen

Serum der Tierart, aus der der verwendete Sekundärantikörper stammt, wurde zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungen 1:40 (Ziege) bzw 1:10 (Esel) in PBS mit 1% BSA verdünnt für 30 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Nach dem Abkippen dieser Lösung wurden die primären Antikörper oder der Primärantikörper und das Immunisierungsantigen in der jeweiligen Verdünnung in PBS (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4) für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS. Im Anschluß wurden die Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS (siehe Tabelle 5) mit 1% BSA und 0,1% DAPI verdünnt für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert und nicht gebundene Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS wieder entfernt. Die gefärbten Gewebeschnitte und Ausstriche wurden mit Vectashield® Hard+Set Mounting Medium eingedeckelt. Alle Arbeitsschritte ab dem Einsatz der Fluorochrom-Konjugate erfolgten lichtgeschützt. Im Falle einer Einfachfärbung mit einer indirekten Färbung wurde entsprechend genauso vorgegangen.

1. Antikörper/Immunisierungsantigen	2. Antikörper
$\alpha$ -dulga1+ $\alpha$ -duCD4-1	$\alpha$ -mslgG1-Alexa 568 + $\alpha$ -mslgG2a-Alexa 488
$\alpha$ -Bu1a+b +RPAP	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -Bu1a+b	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -BrdU+RPAP	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -BrdU	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgM+RPAP	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgM	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgY+RPAP	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgY	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgA+RPAP	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgA	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488 + $\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -IgM+Y+A	$\alpha$ -mslgGH+L-Dylight 488

Tabelle 8 Färbeschemata für Doppelfärbungen mit zwei indirekten Färbungen

#### 4.4.4.2.3 Färbungen mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper und einem biotinylierten Sekundärantikörper und Streptavidin-FITC

Serum der Tierart, aus der der verwendete Sekundärantikörper stammt, wurde zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungen 1:10 in PBS mit 1% BSA verdünnt für 30 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Nach dem Abkippen dieser Lösung wurde der primäre Antikörper in der angegebenen Verdünnung in PBS für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Präparate für je fünf Minuten in PBS. Im Anschluß wurde der biotinylierte Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS mit 1% BSA verdünnt für eine Stunde auf den Objektträgern inkubiert und nicht gebundene Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen der Präparate in PBS wieder entfernt. Dann wurde Streptavidin-FITC 1:50 in PBS mit 1% BSA verdünnt für eine Stunde auf den Schnitten inkubiert und durch dreimaliges Waschen in PBS

für je fünf Minuten ungebundenes Streptavidin wieder entfernt. Zur Darstellung des Peroxidaseanteils im Gewebe abgelagerten Immunisierungsantigens in einer Einfachfärbung wurde ein biotinylierter  $\alpha$ -Peroxidase-Primärantikörper in gleicher Weise verwendet. In diesem Fall wurde das Streptavidin in PBS mit 0,1% DAPI angewendet und die Färbung mit diesem Schritt beendet.

Zur Detektion des Kaninchen-IgG-Anteils des Immunisierungsantigen im Gewebe wurde der fluorochromkonjugierte  $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper mit 0,1% DAPI für eine Stunde auf den Präparaten inkubiert und ungebundene Überschüsse heruntergewaschen. Die gefärbten Gewebeschnitte und Ausstriche wurden mit Vectashield<sup>®</sup> Hard+Set Mounting Medium eingedeckelt. Alle Arbeitsschritte ab dem Einsatz der Fluorochrom-Konjugate erfolgten lichtgeschützt.

1. Antikörper	2. Antikörper	Detektion	3. Antikörper
74.3	$\alpha$ -mSlgGH+L <sub>Biotin</sub>	Streptavidin-FITC	$\alpha$ -rbIgGH+L-Alexa 568
$\alpha$ -Peroxidase <sub>Biotin</sub>		Streptavidin-FITC	

Tabelle 9 Färbeschemata für Färbungen mit Hilfe eines fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpers und eines biotinylierten Sekundärantikörpers und Streptavidin-FITC

#### 4.4.5 Immunhistochemische Doppelfärbungen von Gefrierschnitten für die Quantifizierung der GC-Zahl und -Fläche

##### 4.4.5.1 Material

Feuchte Kammer

PBS

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>5</sup>

Methanol<sup>6</sup> 40%

Vector<sup>®</sup> DAB-Kit<sup>10</sup>

Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe (RPAP)<sup>2</sup>

Histo Green<sup>®10</sup>

Aqua dest.

Mayer's Hämatoxylin-Lösung<sup>4</sup>

Aufsteigende Alkoholreihe

**Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium<sup>4</sup>**

**Deckgläser<sup>4</sup>**

#### **4.4.5.2 Durchführung**

Milzgefrierschnitte wurden zunächst für zwei Minuten mit der Färbelösung aus dem Vector<sup>®</sup> DAB-Kit inkubiert. Im Gewebe vorhandene Peroxidaseaktivität wurde dabei umgesetzt und zeigte sich als braune Färbung im Gewebeschnitt (siehe Abb. 13.1). Im Anschluß wurde die Lösung abgekippt und die Schnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Da im weiteren Verlauf mit einem zweiten Peroxidasesubstrat gearbeitet wurde, wurde die restliche im Gewebe vorhandene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit 0,3% Wasserstoffperoxid in 40%igem Methanol für 30 Minuten auf den Schnitten blockiert (siehe Abb. 13.2). Die Lösung wurde danach durch dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für je fünf Minuten entfernt. Nun wurde das Immunsierungsantigen RPAP zu 0,2mg/ml in PBS verdünnt für eine Stunde auf den Schnitten inkubiert (siehe Abb. 13.3). Im Anschluß erfolgte erneut dreimaliges Waschen der Präparate in PBS für je 5 Minuten. Die Aktivität des Peroxidaseanteils des im Gewebeschnitt nach der Inkubation gebundenen Antigens wurde mit HistoGreen<sup>®</sup> zu einer türkisen Färbung auf dem Präparat umgesetzt (siehe Abb. 13.4). Dazu wurde die HistoGreen<sup>®</sup>-Färbelösung fünf Minuten auf den Präparaten inkubiert und die Schnitte im Anschluß kurz in Aqua dest. eingetaucht. Die Schnitte wurden dann für 35 Sekunden in Mayer's Hämatoxylin-Lösung eingetaucht und im Anschluß für 30 Sekunden unter fließendem Wasser gebläut. Aufgrund der hohen Wasser- und Alkohollöslichkeit des HistoGreen<sup>®</sup>-Peroxidasesubstrates wurden die Schnitte über eine verkürzte Alkoholreihe (je 30 Sekunden 1x Ethanol 100%, 1x Isopropanol und 2x Xylol) dehydriert und zügig mit Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium eingedeckelt.



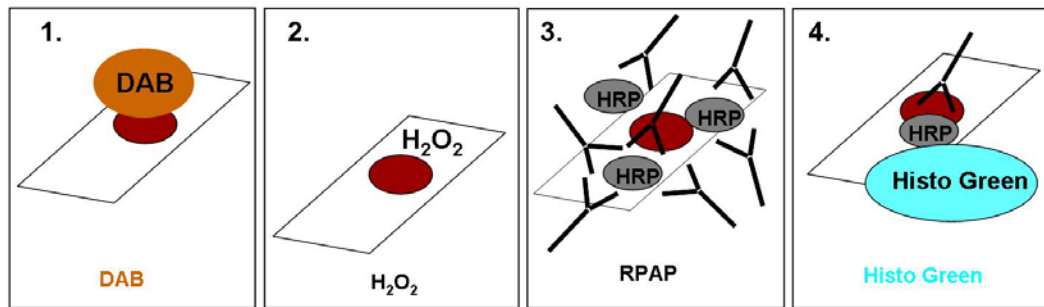


Abb. 13 Färbeschema der immunhistochemischen Doppelfärbung für die Quantifizierung der GC-Zahl und Fläche

#### 4.4.6 Quantifizierung der GC-Zahl und -Fläche

Da bekannt ist, dass GCs in der Hühnermilz einen Durchmesser von ungefähr 50 bis 150µm aufweisen [88], wurden pro Tier fünf Milzserienschnitte durch die Mitte des Organes auf Höhe des Hilus im Abstand von 300µm untersucht. Somit konnte verhindert werden, dass in einem Gewebeschnitt angeschnittene GCs im nächsten untersuchten Schnitt erneut detektiert wurden. Die Schnitte wurden dafür wie unter 4.4.5 beschrieben gefärbt.

Die Fläche der fünf untersuchten Milzschnitte, sowie die Zahl der in den Schnitten gefundenen GCs, wurden festgehalten. Die Fläche der einzelnen GCs wurde ebenfalls gemessen und zur Gesamt-GC-Fläche addiert. Aus diesen Messwerten ergaben sich die berechneten Werte Gesamt-GC-Zahl pro untersuchte Milzfläche, sowie Gesamt-GC-Fläche pro untersuchte Milzfläche. In gleicher Weise wurde die Zahl und Fläche antigenspezifischer GCs und antigenspeichernder GCs (siehe Definition solcher GCs unter 5.1.1) ermittelt und die entsprechenden Werte antigenspezifische bzw. antigenspeichernde GC-Zahl pro untersuchte Milzfläche sowie antigenspezifische bzw. antigenspeichernde GC-Fläche pro untersuchte Milzfläche berechnet.

Die Messungen wurden an einem Leica LMD6000-Mikroskop mit Hilfe einer Leica DFC400-Kamera durchgeführt. Es wurde die Software Leica Laser Microdissection V 6.7. verwendet. Die gleichen Geräte und die gleiche Software wurden benutzt, um die Größe von  $\alpha$ -BrdU-gefärbten GC-Anschnitten (siehe 4.4.3) in der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink festzustellen.

#### **4.4.7 Fotodokumentation der histologischen und immunhistologischen Färbungen**

Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen der gefärbten Schnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop in Verbindung mit einer AxioCam MRC5 angefertigt. Dazu wurde die Software Axiovision Rel. 4.8 verwendet. Weitere Durchlichtaufnahmen wurden mit einem Leica DMR-Mikroskop in Verbindung mit einer Leica DFC320-Kamera angefertigt. Dafür wurde die Software Leica Application Suite V.3.2.0 verwendet.

#### **4.5 Durchflusszytometrie**

##### **4.5.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl in Vollblut**

Die durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl in Vollblutproben wurde nach der sogenannten „no lyse – no wash“ Technik nach der von Seliger et al. erarbeiteten Methode mit direktkonjugierten Antikörpern durchgeführt. Das Vorgehen ist in der Arbeit von Seeliger et al. detailliert beschrieben [153].

#### **4.6 ELISA**

##### **4.6.1 Material**

###### **NUNC-Maxisorp<sup>®</sup> Polystyren 96-Flachlochplatten<sup>14</sup>**

###### **Beschichtungspuffer pH 9,6**

3,11g Natriumcarbonat<sup>5</sup> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)  
6g Natriumhydrogencarbonat<sup>5</sup> (NaHCO<sub>3</sub>)  
ad 1000ml Aqua bidest., Einstellung auf pH 9,6, Lagerung bei 4°C

###### **RPAP<sup>2</sup>**

Lagerung bei -20°C

###### **Magermilchlösung 4%**

4g Magermilchpulver<sup>5</sup>  
ad 100ml PBS

kurz vor Gebrauch ansetzen

### **Pierce Protein-Free Blocking Buffer<sup>15</sup>**

#### **PBS-T (0,05% Tween20)**

0,5ml Tween20<sup>®5</sup>  
ad 1000ml PBS pH 7,2  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### **TBS-T pH 7,4**

5,844g Natriumchlorid<sup>5</sup> (NaCl)  
12,114g Trishydroxymethylaminomethan<sup>5</sup> (TRIS)  
0,5ml Tween20<sup>®5</sup>  
ad 1000ml Aqua dest.  
pH auf 7,4 einstellen  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### **TMB-Stammlösung**

6mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin<sup>3</sup> (TMB)  
ad 1ml DMSO<sup>5</sup>  
Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

#### **TMB-Puffer**

8,2g Na-Acetat<sup>5</sup> (CH<sub>3</sub>COONa)  
3,15g Zitronensäure-Monohydrat<sup>5</sup> (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·xH<sub>2</sub>O)  
ad 1000ml Aqua bidest.  
Lagerung bei 4°C

#### **TMB-Gebrauchslösung**

10ml TMB-Puffer, auf 37°C erwärmt  
332µl TMB Stammlösung  
3µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

#### **Schwefelsäure 1M**

472ml Aqua dest.  
28ml 96% Schwefelsäure<sup>5</sup> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### **Vector's AP-Substrat gelb für ELISA<sup>10</sup>**

Lagerung bei 4°C

#### **AP-Substratpuffer pH 10,0**

0,84g Natriumhydrogencarbonat<sup>5</sup> (NaHCO<sub>3</sub>)  
Ad 1000ml Aqua dest.  
Einstellen mit 1M Natronlauge<sup>5</sup> auf pH 10,0  
Lagerung bei Raumtemperatur

### **AP-Substratlösung**

Menge für eine ELISA-Platte:

21ml AP-Substratpuffer

1050µl Vector's AP-Substrat gelb für ELISA

Vor der Verwendung frisch zubereitet und für eine Stunde bei 37°C im Wärmeschrank erwärmt.

### **Natronlauge 3N**

60ml NaOH<sup>5</sup> 20%ig

40ml Aqua dest.

Lagerung bei Raumtemperatur

Antikörper (Klonname)	gebundenes Antigen	Isotyp	Spezies	Konzentration/ Verdünnung	Referenz
$\alpha$ -Flag-M2	Flag	IgG1	Maus	1 $\mu$ g/ml	3
$\alpha$ -rb-IgG-POD	Kaninchen-IgG	polyklonal	Ziege	1:5000	11
$\alpha$ -hu-IgG-POD	humanes IgG	polyklonal	Ziege	1:10000	14
$\alpha$ -ms-IgG-AP**	Mäuse-IgG	polyklonal	Esel	Stammlösung 1:1000,1:2000	11
$\alpha$ -chIgM	Hühner-IgM	IgG1	Maus	2,5 $\mu$ g/ml	[147]
$\alpha$ -chIgY(4D12)	Hühner-IgY	IgG1	Maus	1 $\mu$ g/ml	[147]
$\alpha$ -chBAFF(S120)	chBAFF	IgG	Kaninchen	1 $\mu$ g/ml	[140]

**Tabelle 10: Im ELISA verwendete Antikörper**

\*\*Lagerung 1:2 in Glycerol verdünnt bei -20°C (=Stammlösung). Zur Detektion von  $\alpha$ -chIgM 1:1000 und von  $\alpha$ -chIgY 1:2000 eingesetzt

Rekombinantes Protein	Verwendung	Verdünnung
chBAFF-Flag	Standard	1:10
	Fänger	1:10
huBCMA-huFc	Standard	pur

Tabelle 11 Im ELISA verwendete Zellkulturüberstände

### Seren

Standardserum RPAP-spezifisches IgM  
 Standardserum RPAP-spezifisches IgY  
 (Herstellung siehe 4.2.2.2)  
 Lagerung bei -20°C

## 4.6.2 Durchführung

Die nachfolgenden Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der 96-Lochplatte.

### 4.6.2.1 Quantitativer ELISA zur Detektion RPAP-spezifischer Antikörper

Die jeweiligen für den Nachweis von RPAP-spezifischem IgM und IgY verwendeten Verdünnungen sind in

Tabelle 12 aufgeführt.

Arbeitsschritt	IgM-ELISA	IgY-ELISA
Beschichtung	1µg/ml RPAP	0,5µg/ml RPAP
Proben	1:100, 1:500, 1:2500	1:200, 1:1000, 1:5000
Qualitätskontrollen	1:100, 1:3000	1:1500, 1:100000
Standards	1:33 log <sub>3</sub> Standard IgM	1:333 log <sub>3</sub> Standard IgY
Primäre Antikörper	2,5µg/ml α-chIgM	1µg/ml α-chIgY
Detektionsantikörper	1:1000 α-msIgG-AP	1:2000 α-msIgG-AP

Tabelle 12 Verdünnungen für IgM und IgY-ELISAs

NUNC-Maxisorp<sup>®</sup>-Platten wurden mit 100µl RPAP in Beschichtungspuffer über

Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen auf der Platte wurden mit 200µl Pierce Protein-Free Blocking Buffer für eine Stunde blockiert. 100µl der Plasmaproben wurden anschließend als Duplikate in drei Verdünnungen auf die Platte pipettiert. 100µl Standardseren für IgM und IgY wurden ebenfalls auf die Platte in log<sub>3</sub>-Verdünnungen aufgetragen. Eine Kontrolle dieser Standardseren auf nicht beschichteten Plattenkavitäten und eine PBS-Kontrolle wurden mitgeführt. Als Qualitätskontrolle der Titrationsreihe der Standards wurden zusätzlich zwei Verdünnungen jeden Standards aus der Titrationsreihe als einzeln angesetzte Triplikate beigefügt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte mit 100µl des jeweiligen Primärantikörpers beschickt und erneut eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden 50µl des Detektionsantikörpers für eine Stunde auf der Platte inkubiert. 200µl AP-Substrat wurden für genau 30 Minuten auf der Platte inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50µl Natronlauge gestoppt. Gegebenenfalls gebundene Alkalische Phosphatase setzte die AP-Substratlösung zu einem gelben Substrat um, welches mit einem Mehrkanalphotometer bei 405nm gemessen wurde. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei 22-24°C Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten drei Mal maschinell mit TBS-T gewaschen. Alle verwendeten Antikörper- und Probenverdünnungen wurden in TBS-T hergestellt.

Die Messergebnisse der Proben wurden anhand des mitgeführten Standard über 4-Point-Curve-fit quantifiziert. Der jeweilige Standard wurde dazu auf 10000 Standardeinheiten festgelegt.

#### **4.6.2.2 ELISA zur Detektion von chBAFF**

Das RCASBP(A) chBAFF-Konstrukt kodiert neben dem chBAFF zusätzlich für ein Flag-Tag (chBAFF-Flag). Mit Hilfe dieses Flag-Tags wurde chBAFF in Zellkulturüberständen und Plasmaproben mit folgendem ELISA detektiert:

NUNC-Maxisorp<sup>®</sup>-Platten wurden mit 100µl α-Flag-M2 (1µg/ml) in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen auf der Platte wurden mit 200µl Magermilchlösung (4%) für eine Stunde blockiert. Anschließend wurde die Platte mit 100µl Zellkulturüberstand oder Plasma, welche in log<sub>2</sub>-Verdünnung aufgetragen wurden, ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Die

Plasmaproben wurden in einer Ausgangsverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die getesteten Zellkulturüberstände wurden pur benutzt. Als Standard wurde ein Zellkulturüberstand mit chBAFF-Flag in log<sub>3</sub>-Verdünnung mitgeführt, ebenso wie eine PBS-Kontrolle. Der Standard wurde in einer Ausgangsverdünnung von 1:10 eingesetzt. An diesen Schritt schloss sich die Inkubation mit 100µl Kaninchen-IgG- $\alpha$ -chBAFF für eine Stunde an. Zuletzt wurden 50µl  $\alpha$ -rb-IgG-POD 1:5000 verdünnt aufgetragen, eine Stunde inkubiert und der ELISA für 10 Minuten abgedunkelt mit 100µl TMB-Gebrauchslösung entwickelt. Gegebenenfalls vorhandene Peroxidase setzte die TMB-Gebrauchslösung zu einem blauen Substrat um. Diese Reaktion wurde mit 50µl Schwefelsäure gestoppt, was einen gelben Farbumschlag bewirkte. Das Ergebnis wurde mit einem Mehrkanalphotometer bei 450nm gemessen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei 37°C im Wärmeschrank und die Entwicklung des ELISAs bei Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten drei Mal maschinell mit PBS-T gewaschen. Plasmaproben und Zellkulturüberstände inklusive des Standards wurden in PBS verdünnt, alle weiterhin verwendeten Antikörperverdünnungen wurden in PBS-T hergestellt.

#### 4.6.2.3 ELISA zur Detektion von huBCMA

Das RCASBP(A) huBCMA-Konstrukt kodiert neben dem huBCMA zusätzlich für ein humanes Fc-Tag (huBCMA-huFc). Mit Hilfe des humanen Fc-Tags wurde huBCMA in Zellkulturüberständen und Plasmaproben in folgendem ELISA detektiert:

NUNC-Maxisorp<sup>®</sup>-Platten wurden mit 100µl  $\alpha$ -Flag-M2 (1µg/ml) in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen auf der Platte wurden mit 200µl Magermilchlösung (4%) für eine Stunde blockiert. Im nächsten Schritt wurde als Fänger für in den Proben gegebenenfalls vorliegendes huBCMA chBAFF-Flag-haltiger Zellkulturüberstand 1:100 in PBS verdünnt aufgetragen und eine Stunde inkubiert. HuBCMA aus den im nächsten Schritt aufgetragenen Proben kann aufgrund der großen Homologie der beiden Proteine huBAFF und chBAFF [127] an das als Fänger über den  $\alpha$ -Flag-M2-Antikörper an



die Platte gebundene chBAFF binden. Die Platte wurde dazu mit 100µl BCMA-haltigem Zellkulturüberstand oder Plasma, welche in log<sub>2</sub>-Verdünnung aufgetragen wurden, ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Die Plasmaproben wurden in einer Ausgangsverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die getesteten Zellkulturüberstände wurden unverdünnt benutzt. Als Standard wurde ein Zellkulturüberstand mit huBCMA-huFc in log<sub>2</sub>-Verdünnung, ebenso wie eine PBS-Kontrolle mitgeführt. Der Standard wurde unverdünnt eingesetzt. Zuletzt wurden 50µl α-hu-IgG-POD 1:10000 verdünnt aufgetragen, eine Stunde inkubiert und der ELISA für 10 Minuten abgedunkelt mit 100µl TMB-Gebrauchslösung entwickelt. Gegebenenfalls gebundene Peroxidase setzte die TMB-Gebrauchslösung zu einem blauen Substrat um. Die Reaktion wurde mit 50µl Schwefelsäure gestoppt, was einen gelben Farbumschlag bewirkte. Das Ergebnis wurde mit einem Mehrkanalphotometer bei 450nm gemessen. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C im Wärmeschrank, die Entwicklung bei Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten drei Mal maschinell mit PBS-T gewaschen. Der Fänger sowie die Plasmaproben und Zellkulturüberstände inklusive des Standards wurden in PBS verdünnt, alle weiterhin verwendeten Antikörperverdünnungen wurden in PBS-T hergestellt.

#### **4.7 Generierung RCASBP(A) chBAFF, RCASBP(A) huBCMA, und RCASBP(A) chBAFFrevers transduzierter Hühner**

##### **4.7.1 Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF)**

###### **4.7.1.1 Material**

###### **PBS**

###### **1x Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)**

10ml 10x Trypsin-EDTA<sup>16</sup> Lösung  
ad 100ml Aqua bidest.

###### **HEF-Medium**

445ml Basal ISCOVE<sup>16</sup> Medium  
25ml Fetales Kälberserum (FCS)<sup>16</sup>  
10ml Hühnerserum<sup>3</sup>  
5ml Penicillin-Streptomycin-Lösung<sup>16</sup>

FCS, Hühnerserum und Penicillin-Streptomycin wurden in Aliquots bei –

20°C gelagert.

#### **4.7.1.2 Durchführung**

Hühnerembryonen der Linie "0" wurden am 10. Tag der Bebrütung durch Dekapitation getötet. Die Torsi wurden nach Abtrennen der Gliedmaßen in ein Becherglas mit ca. 2ml PBS gegeben und mechanisch zerkleinert. Die zerkleinerten Embryonen wurden mit 20ml 1x Trypsinlösung in einem Erlenmeyerkolben in einem Wasserbad bei 37°C unter Rühren für 20 Minuten verdaut. Der Überstand wurde in 50ml-Röhrchen überführt, die restlichen Gewebeteile weiter bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Der abgenommene Überstand wurde zur erneuten Sedimentation für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der Überstand wurde danach abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C). Die pelletierten Zellen wurden mit Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt und in Kultur genommen.

#### **4.7.2 Kultivieren von primären Hühnerembryofibroblasten**

##### **4.7.2.1 Material**

###### **HEF-Medium**

###### **HEF-Einfriermedium**

35ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit 0,532g/l stabilem Glutamin<sup>16</sup>  
10ml Fetales Kälberserum<sup>16</sup>  
5ml Dimethylsulfoxid (DMSO)<sup>5</sup>  
DMSO wurde bei Raumtemperatur gelagert, das Einfriermedium bei –20°C.

###### **1x Trypsin-EDTA**

##### **4.7.2.2 Durchführung**

###### **4.7.2.2.1 Kultivieren von Zellen**

Die adhärent wachsenden Hühnerembryofibroblasten wurden zur Teilung kurz mit warmem PBS gespült und bei 40°C mit 1x Trypsin-Lösung inkubiert. Nach ca. 5 Minuten wurde das Trypsin mit HEF-Medium neutralisiert, die Zellen in PBS gewaschen, auf die gewünschten Dichte eingestellt und bei 40°C weiterkultiviert.

#### 4.7.2.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert (225g, 10 Minuten, 4°C) und in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8ml der Zellsuspension wurden in entsprechende Kryoröhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol haltigen Einfrierbox zur graduellen, langsamen Abkühlung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Für eine vorübergehende Lagerung von einigen Monaten verblieben die Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$ , für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 4.7.2.3 Auftauen von Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde möglichst rasch im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und zügig in ein 50ml-Röhrchen überführt. Dann wurde 50ml kaltes RPMI langsam zugegeben, um zellschädigendes DMSO auszuwaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

### 4.7.3 Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten

Alle Arbeiten mit dem RCAS(BP)A-System wurden unter Sicherheitsstufe 1-Bedingungen durchgeführt.

Für die Transfektion von primären HEF mit den auf RCAS(BP)A basierenden Plasmiden wurde die Methode der  $\text{CaCl}_2$  Präzipitation verwendet.

#### 4.7.3.1 Material

##### 0,1x Tris EDTA-Puffer (TE)

1,21g Trishydroxymethylaminomethan<sup>5</sup> (TRIS)  
200µl 0,5M EDTA-dinatriumhydrat<sup>5</sup> (pH 8,0)  
ad 1000ml Aqua dest., Einstellung mit 1M HCL auf pH 8,0

##### 2x HEPES buffered saline (HBS)

1,6g <sup>5</sup>NaCl  
74mg <sup>5</sup>KCl  
27mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ <sup>5</sup>  
0,2g Glucose<sup>5</sup>  
ad 80ml Aqua dest.  
5ml HEPES, 1M<sup>5</sup>

Einstellung auf pH 7,05

### **2M Calciumchlorid-Lösung**

2,22 mg Calciumchlorid<sup>5</sup> (CaCl<sub>2</sub>)  
ad 10 ml Aqua dest.

Die oben genannten Lösungen wurden nach dem Ansetzen durch einen 0,22µm Filter steril filtriert und zu 500µl aliquotiert bei -20°C gelagert.

### **HEF-Medium + 15% Glycerin**

1,5ml Glycerin<sup>5</sup> (steril)  
ad 15ml HEF Medium, Herstellung steril, Lagerung bei 4°C

#### **4.7.3.2 Durchführung**

Für die Transfektion wurden die Konstrukte RCASBP(A) chBAFF, RCASBP(A) chBAFFrv und RCASBP(A) huBCMA verwendet. Diese sind in der Arbeit von Kothlow et al. beschrieben [140].

Primäre Hühnerembryofibroblasten (HEF) der Linie „0“ wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und über Nacht bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurde zunächst das Plasmid für die Transfektion vorbereitet. Hierfür wurde es mit sterilem 0,1x TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 250µl pro Zellkulturschale in einer Konzentration von 40µg/ml eingestellt und anschließend 2 Mal für 10 Minuten bei 16000xg zentrifugiert. Dies erfolgte, um eventuelle Verunreinigungen abzuzentrifugieren.

220µl des Überstands wurden 250µl HBS zusammen in ein 5ml-Röhrchen pipettiert und gemischt. Für die Transfektion ist die Bildung eines Komplexes aus Plasmid und Calciumchlorid notwendig. Da diese Komplexbildung begünstigt unter Luftzufuhr stattfindet, wurde mit einer automatischen Pipettierhilfe Luft in das Röhrchen geblasen und gleichzeitig 31µl der Calciumchlorid-Lösung tropfenweise dazu pipettiert.

Das so hergestellte Plasmidgemisch wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die tags zuvor ausgesäten Zellen getropft. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei 40°C wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit warmem PBS gespült und mit 2ml eines auf 37°C erwärmten Gemisches von HEF-Medium mit 15% Glycerin bedeckt. Da der

hohe Glycingehalt einen „Membranschock“ verursacht, wird die Zellmembran für den Komplex aus Calciumchlorid und Plasmid durchlässig. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wurde die Medium-Glycerin-Mischung abgenommen, die Schale gründlich mit PBS gespült und mit frischem HEF-Medium gefüllt. Nach weiteren 48 Stunden in Kultur konnte der Erfolg der Transfektion überprüft werden.

#### **4.7.4 Transduktion von Hühnerembryonen**

##### **4.7.4.1 Material**

**Mit RCAS-Konstrukten transfizierte HEF**

**Bebrütete LSL-Hühnereier**

**1ml Spritzen<sup>17</sup>**

**Kanülen 22G (0,7 x 30mm)<sup>17</sup>**

**Ethanol<sup>6</sup> 70%**

**Paraffin<sup>18</sup>**

##### **4.7.4.2 Durchführung**

###### **4.7.4.2.1 Vorbereitung der Zellen**

Transfizierte Zellen wurden über mehrere Passagen hinweg vermehrt, bis für die Transduktion der Embryonen genügend Zellen zur Verfügung standen. Je Embryo wurden  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt. Zur Injektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in sterile 1ml Spritzen aufgezogen, wobei hier zum Schutz der Zellen keine Kanüle verwendet wurde.

###### **4.7.4.2.2 Injektion in embryonierte Eier**

Die infizierten Zellen wurden nun in drei Tage bebrütete LSL-Eier injiziert. Hierzu wurde die Kalkschale am stumpfen Pol mit 70% Ethanol desinfiziert und mit einem Schleifwerkzeug angeschliffen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Eihaut nicht verletzt wurde. Nun wurden die Zellen in der Spritze durch vorsichtiges Schwenken nochmals suspendiert und  $100 \mu\text{l}$  der Suspension (entspricht  $1 \times 10^6$  Zellen) in die Eier injiziert. Für die Injektion wurden Kanülen

der Größe 0,7 x 30mm verwendet, welche bei der Injektion zu ca. zwei Dritteln in das Ei eingeführt wurden. Anschließend wurde die Kalkschale mit erwärmtem Paraffin versiegelt und der Embryo weiter bebrütet. Für injizierte Eier und unbehandelte Kontrollen wurden getrennte Brüter verwendet.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Verwendung der Software Microsoft® Office Excel 2003 für Windows. Die Daten wurden mit dem Student t-Test ausgewertet. Ein Stern markiert signifikant verschiedene Daten mit  $p \leq 0,05$ , Zwei Sterne markieren signifikant verschiedene Daten mit  $p \leq 0,01$ . Ist keine solche Markierung erfolgt sind die Daten nicht signifikant verschieden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Phänotypische Charakterisierung von GCs in der Hühnermilz

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß des Zytokines chBAFF auf die Entwicklung aktivierter Hühner-B-Zellen in GCs der Hühnermilz untersucht werden. Dies sollte im Tiermodell mit Hühnern, welche experimentell erhöhte bzw. erniedrigte chBAFF-Spiegel aufwiesen, durchgeführt werden.

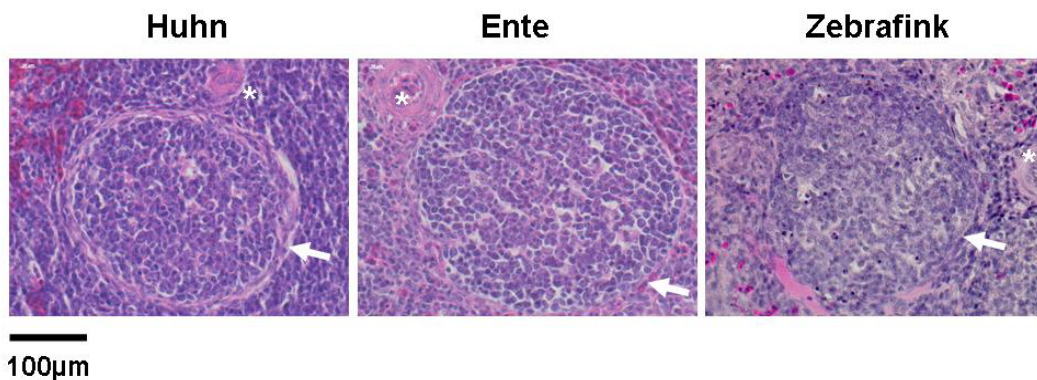
Als Voraussetzung für diese Arbeiten mussten zunächst in unveränderten Hühnern die unter physiologischen Bedingungen entstehenden GCs der Milz genauer untersucht werden. Dies geschah im Hinblick auf deren, mit Hilfe histologischer und immunhistologischer Techniken darstellbare, morphologische Eigenschaften.

#### 5.1.1 Morphologie von GCs aus der Milz ausgesuchter Vogelarten

Da, wie unter 2.2.2 beschrieben, GCs des Huhnes im Aufbau von jenen von Mensch und Nager deutlich abweichen, stellte sich die Frage, ob dies generell für GCs der Vögel gilt. Um dem Nachzugehen wurden die Struktur von GCs aus Milzen von Hühnern (*Galliformes*), Enten (*Anseriformes*) und Zebrafinken (*Passeriformes*) untersucht.

Um das Vorhandensein einer ausreichenden Zahl von GCs in der Milz der untersuchten Hühner und Zebrafinken zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere wie unter 4.2 beschrieben immunisiert. Die untersuchten Enten aus einem kommerziellen Haltungsbetrieb wiesen auch ohne Immunisierung eine Vielzahl von GCs in der Milz auf. Um die GCs in der Milz darzustellen wurden Milzparaffinschnitte der 3 Vogelarten histologisch gefärbt (siehe 4.4.2). Die eigentlich kugelförmigen GCs in der Milz des Huhnes [88], stellten sich wie in Abb. 14 gezeigt in zweidimensionalen Gewebeschnitten als runde Zellagglomerate umgeben von einer Kapsel (Pfeil) dar, die in Gefäßnähe lokalisiert sind (Stern). Das galt ebenfalls für GCs in der Milz von Ente und Zebrafink. Die Hämatoxylin&Eosin-Färbung zeigte, dass die GCs mit Zellen mit kleinem Zytoplasmasaum angefüllt waren. Die Kapsel stellte sich am deutlichsten

bei GCs aus dem Huhn dar. Die GCs des Zebrafinken ließen eine Kapsel nur erahnen.



**Abb. 14 GCs aus der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink**

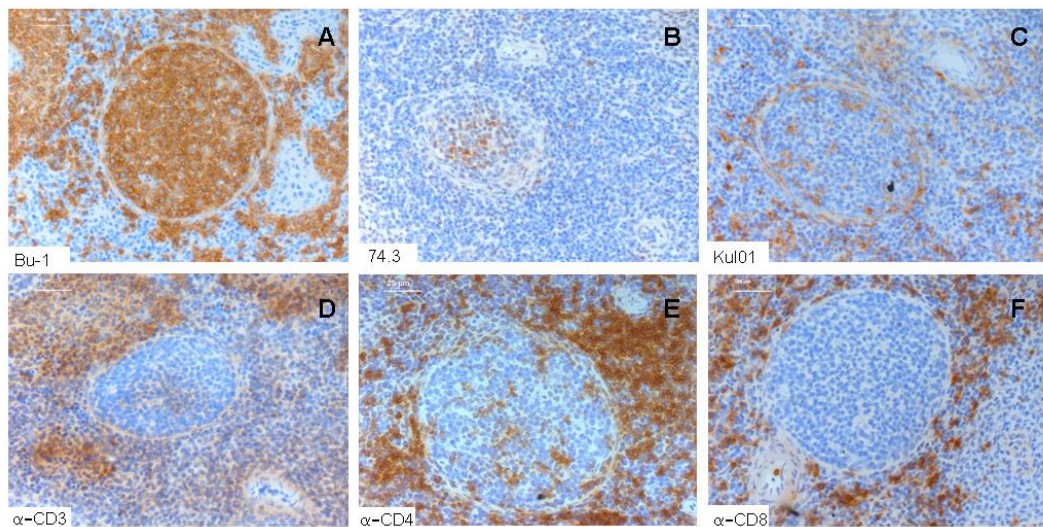
H&E-Färbungen von GCs aus Gewebeschnitten der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink. In der H&E-Färbung sind die Zellkerne dunkelblau angefärbt. Das Zytoplasma stellt sich rosa dar. Vergrößerung 40; Balken = 100µm. Stern = Milzgefäß; Pfeil = Kapsel.

### 5.1.2 Phänotypisierung der Zellen des germinalen Zentrums des Huhnes und der Ente

Die zelluläre Zusammensetzung des germinalen Zentrums ist für die Affinitätsreifung und den Klassenwechsel der GC-B-Zellen entscheidend. An einer germinalen Zentrumsreaktion sind neben B-Zellen auch andere, unterstützende Zellarten beteiligt [53]. Um die zelluläre Zusammensetzung der Hühner-GCs besser zu verstehen, wurden Gefrierschnitte einer Hühnermilz wie unter 4.4.3 beschrieben mit Hühnerzellmarkern immunhistochemisch untersucht.

Abb. 15 zeigt, dass die GCs in der Hühnermilz in der Hauptsache aus B-Zellen bestehen (A). Der FDC-Marker 74.3 färbte Zellen zentral im GC (B). Die GCs waren umgeben von einer T-Zellregion mit vielen  $CD4^+$ -T-Zellen. Einige  $CD4^+$ -T-Zellen befanden sich auch im Zentrum der GCs.  $CD8^+$ -T-Zellen waren nicht innerhalb der GCs zu finden, jedoch im umliegenden Gewebe. Ein Ring  $Kul01^+$ -Myeloider Zellen/Makrophagen umgab die GC-Follikel. Auch innerhalb der Follikels fanden sich einige  $Kul01^+$ -Zellen. Im Hühner-GC fanden sich demnach in der Hauptsache B-Zellen die ein Zentrum von FDCs und  $CD4^+$  T-Zellen umgaben.





100μm

**Abb. 15 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs aus der Hühnermilz mit Zellmarkern**

Gefrierschnitte von Hühnermilzen wurden mit Zellmarkern für B-Zellen (A,  $\alpha$ -Bu1a+b), FDCs (B, 74.3), Myeloide Zellen/Makrophagen (C, Kul01), T-Zellen (D,  $\alpha$ -CD3),  $CD4^+$ -T-Helferzellen (E,  $\alpha$ -CD4),  $CD8^+$ -T-Zellen (F,  $\alpha$ -CD8). Die Primärantikörper wurden mit dem Vectorstain ABC-Kit® und dem Vector DAB-Kit® braun markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 40x; Balken = 20μm.

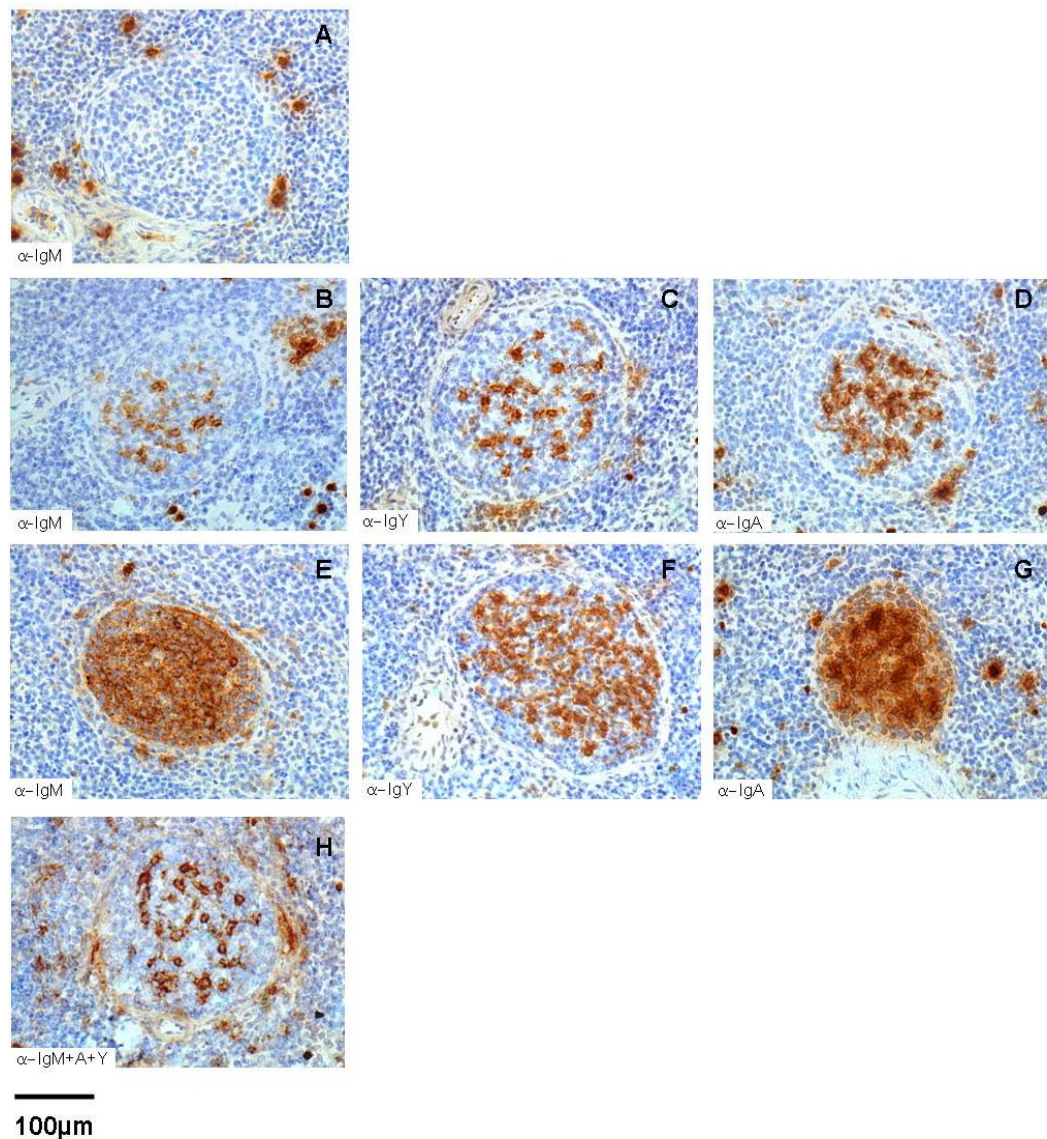
Da FDCs mit dem Marker 74.3 nur unzufriedenstellend angesprochen werden konnten, wurde zur Untersuchung der Lokalisation von FDCs innerhalb der GCs deren Fähigkeit genutzt, Antigen mit spezifischen Antikörpern in Immunkomplexen auf ihrer Zelloberfläche zu speichern [53]. Dazu wurden Gefrierschnitte mit Markern gegen Hühnerimmunglobuline immunhistochemisch angefärbt. Abb. 16 zeigt, dass sich in den untersuchten Milzen GC-Anschnitte fanden, in deren Zentrum IgM, IgY und IgA angefärbt werden konnte (Abb. 16 B-D). Es gab auch GC-Anschnitte, die keine zentrale IgM-Färbung zeigten (Abb. 16 A), jedoch keine solchen die keine zentrale IgA- oder IgY-Färbung zeigten. Weiterhin traten GC-Anschnitte auf, in denen die Mehrzahl der Zellen des GC-Anschnittes sich mit den Immunglobulinmarkern anfärbte. Dies galt eindeutig für Marker gegen IgM und IgA und weniger deutlich ausgeprägt für den Marker gegen IgY (Abb. 16 E-G).

Es stellte sich somit die Frage, ob die für eine Immunglobulinklasse negativen Zellen jener GCs, die lediglich zentrale Färbung zeigten (B-D), eventuell eine jeweils andere Immunglobulinklasse exprimierten. Um dem auf den Grund zu

gehen wurden Gefrierschnitte derselben Milzen mit einem Immunglobulinmarker-Cocktail inkubiert. Auch in derart gefärbten Schnitten traten GCs auf, die lediglich zentral eine Färbung zeigten, während der Großteil der im GC vorhandenen Zellen sich nicht mit dem Immunglobulinmarker-Cocktail anfärbte (H).

Da der Großteil der im GC vorhandenen Zellen B-Zellen sind, während FDCs nur zentral im GC anfärbbar sind (siehe Abb. 15A+B), kann es sich bei den in Abb. 16 B-D und H zentral im GC angefärbten Zellen um immunkomplexspeichernde FDCs handeln.

Interessanterweise traten einerseits GCs auf, die in diesen Färbungen peripher immunglobulinnegative (Abb. 16 A-D + H) und andererseits solche die peripher immunglobulinpositive Zellen aufwiesen (Abb. 16 E-G). Da es sich bei den Zellen peripher im GC in der Regel um B-Zellen handelt (siehe Abb. 15), traten somit GCs auf, die in der Mehrzahl in diesen Färbungen immunglobulinnegative Zellen aufwiesen und solche, die in der Mehrzahl immunglobulinexprimierende B-Zellen aufwiesen.



**Abb. 16 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs aus der Hühnerspleen mit Markern gegen Immunglobuline**

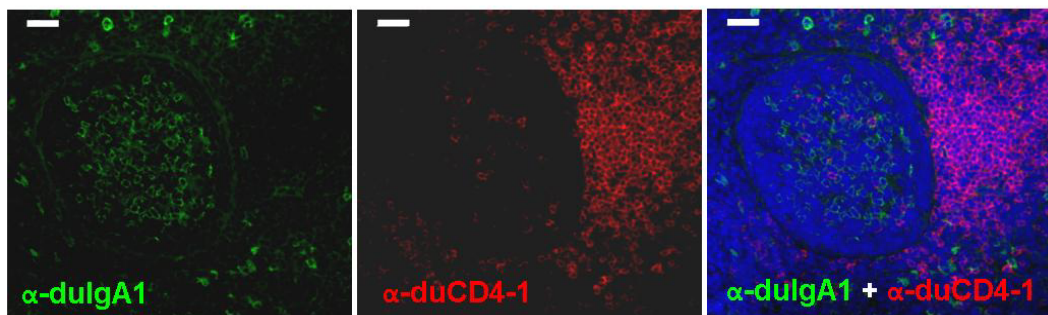
Gefrierschnitte von Hühnerspleen wurden mit Markern gegen Hühner-IgM B-Zellen (A, B, E), Hühner-IgY (C,F), Hühner-IgA (D, G) und einem Markermix gegen Hühner-IgM, -IgY und -IgA (H) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit dem Vectorstain ABC-Kit® und dem Vector DAB-Kit® braun markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 40x; Balken = 100μm.

Der Aufbau des Hühner-GCs weicht somit von dem des germinalen Zentrums einer Maus oder des Menschen deutlich ab. Während sich immunkomplexspeichernde FDCs im Säuger abgewandt von der T-Zellzone nur an einem Pol des germinalen Zentrums befinden, sind sie im Hühner-GC zentral gelegen (siehe Abb. 15 B und Abb. 16 B-D+H) [87]. Um zu überprüfen, ob dies auch für die GCs anderer Vogelspezies zutrifft wurden Gefrierschnitte von

Entenmilzen wie unter 4.4.4 erläutert mit Antikörpern gegen Entenimmunglobuline und Oberflächenmarkern von T-Helferzellen der Ente immunfluoreszenzgefärbt.

Abb. 17 zeigt dass sich auch in der Milz der Ente GCs finden, die zentral Zellen aufweisen, auf deren Oberfläche Immunglobuline abgelagert werden (grün,  $\alpha$ -duIgA1). In enger Assoziation zu diesen Zellen finden sich auch hier  $CD4^+$ -T-Zellen zentral im GC ( $\alpha$ -duCD4-1, rot). Auch das Enten-GC ist umgeben von einer Zone  $CD4^+$ -T-Zellen.

Die Struktur von Hühner- und Enten-GCs stellte sich demnach als identisch dar.

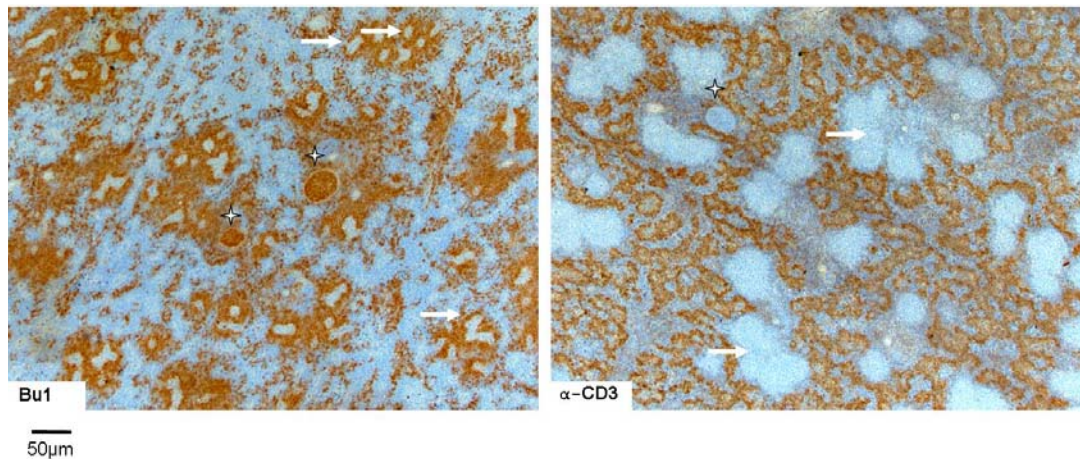


**Abb. 17 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen in GCs der Entenmilz**

Gefrierschnitte einer Entenmilz wurden mit einem Marker für Enten-IgA (grün,  $\alpha$ -duIgA1) und  $CD4^+$ -T-Zellen (rot,  $\alpha$ -duCD4-1) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x; Balken = 50 $\mu$ m.

### 5.1.3 Lokalisation von GCs in der Hühnermilz

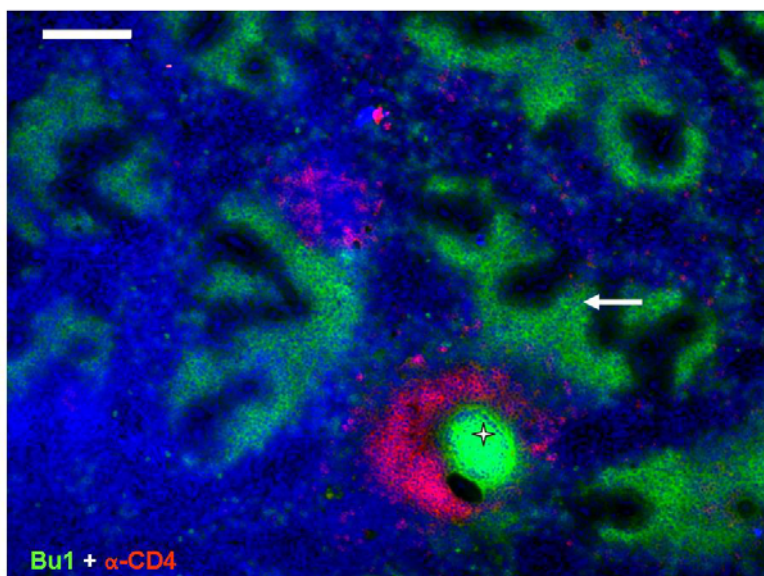
Um die Lage der B- und T-Zellareale der Hühnermilz aufzuzeigen wurden in Milzgefrierschnitten B-Zellen mit  $\alpha$ -Bu1a+b und T-Zellen mit einem Marker für das Molekül CD3 kenntlich gemacht (siehe 4.4.3). Die in Abb. 18 mit einem Pfeil markierten Bereiche zeigen, dass sich ein Großteil der B-Zellen der Milz in der abgegrenzten B-Zellzone der periellipsoidalen weißen Pulpa um kleine Milzgefäße konzentrierte. Die mit einem Stern gekennzeichneten, ebenfalls mit B-Zellen angefüllten GCs waren anhand ihrer Kapsel gut zu erkennen. Innerhalb der periellipsoidalen weißen Pulpa und der GCs färbten sich mit dem Marker für  $CD3^+$ -T-Zellen lediglich Einzelzellen an. Die GCs lagen jedoch innerhalb eines Bereiches  $CD3^+$ -Zellen (siehe Abb. 18).



**Abb. 18 Lage von GCs innerhalb der B- und T-Zellareale der Hühnermilz**

Hühnermilzschnitte wurden mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b (links) und dem T-Zellmarker  $\alpha$ -CD3 inkubiert (rechts). Die Primärantikörper wurden mit dem Vectorstain ABC-Kit® und dem Vector DAB-Kit® braun markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 10x; Pfeil = periellipsoidale weiße Pulpa; Stern = GC.

Um die Lage der GCs innerhalb des T-Zellareals der Hühnermilz genauer zu untersuchen wurde wie unter 4.4.4 beschrieben eine Doppelfärbung gegen den Hühner-B-Zellmarker Bu1a+b und gegen CD4, einen Marker für  $CD4^+$ -T-Helferzellen angefertigt. Abb. 19 zeigt beispielhaft ein GC (Stern), das von der  $CD4^+$ -T-zellreichen PALS-Region der Milz umgeben ist und außerhalb der periellipsoidalen weißen Pulpa (Pfeil) liegt.



**Abb. 19 Lage von GCs innerhalb der PALS-Regionen der Hühnermilz**

Gefrierschnitte einer Hühnermilz wurden mit einem Marker für  $CD4^+$ -T-Zellen (rot,  $\alpha$ -CD4) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Im Anschluß wurde ein direktkonjugierter B-Zellmarker (grün,  $\alpha$ -Bu1a+b) auf den Schnitten inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 10x; Balken = 200µm; Pfeil = Periellipsoidale Weiße Pulpa; Stern = GC.

### 5.1.4 Kinetik der Anbildung antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Der Weg von der Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen bis zur Ausbildung voll etablierter GCs nimmt in Maus und Ratte zirka sieben bis zehn Tage in Anspruch [39-40]. Die gebildeten GCs bleiben dann mindestens 14 Tage nach Immunisierung erhalten [40]. Um die Kinetik der Anbildung und Rückbildung antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz zu untersuchen wurden Hühner mit dem T-zellabhängigen Antigen Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexen (RPAP) immunisiert (siehe 4.2.2.2.1). Zu den in Abb. 20 dargestellten Zeitpunkten wurde von je vier Tieren eine Plasmaprobe für die Antikörperbestimmung gewonnen. Milz und Knochenmark der Tiere wurden entnommen und für die Histologie konserviert. Lediglich zum Zeitpunkt drei Stunden nach Immunisierung wurde nur ein Tier histologisch untersucht. Die Kontrollgruppe wurde nicht immunisiert.

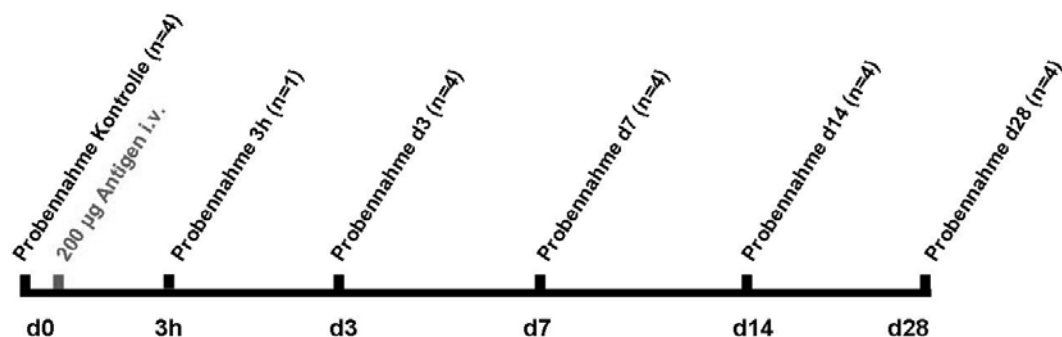


Abb. 20 Zeitplan der Immunisierung und Probennahme zur Untersuchung der Kinetik der Anbildung von GCs in der Hühnermilz nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe

#### 5.1.4.1 Ablagerung des Immunisierungsantigens in der Milz

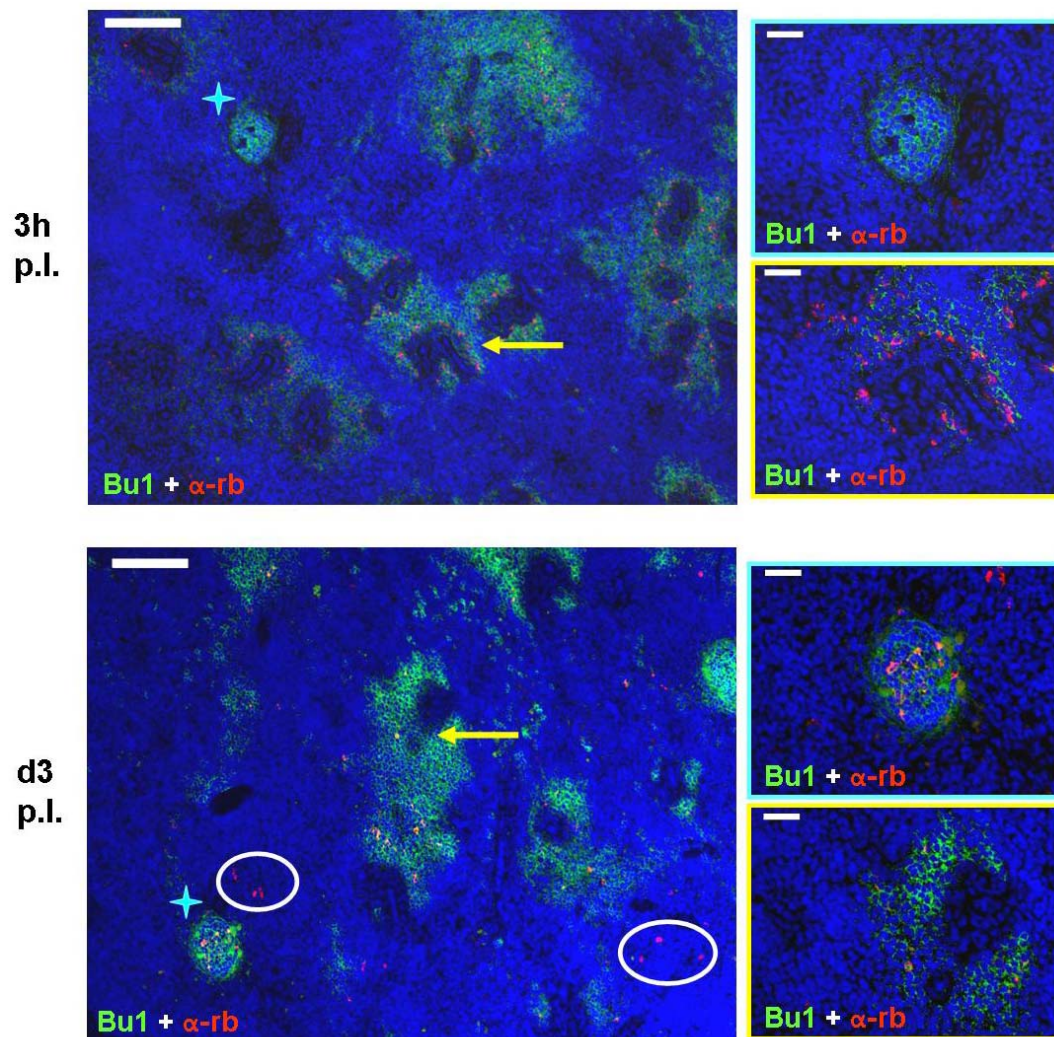
##### 5.1.4.1.1 Ablagerung von Immunisierungsantigen in der B-Zellzone und der T-Zellzone der weißen Milzpulpa

Abb. 21 zeigt die Ergebnisse von Doppelfärbungen (4.4.4) von Milzgefrierschnitten immunisierter Hühner drei Stunden und drei Tage nach der Immunisierung. Das in der Milz abgelagerte Antigen wurde mit einem  $\alpha$ -

Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert. Zur Eingrenzung von dessen Lokalisation wurden zusätzlich die B-Zellareale der Milz mit dem  $\alpha$ -Bul1a+b-Antikörper kenntlich gemacht.

Drei Stunden nach intravenöser Applikation befand sich das Antigen am Übergang des Ellipsoids (siehe Abb. 11) zur periellipsoidalen weißen Pulpa (Pfeil). Drei Tage nach der Applikation konnte Antigen auf FDCs von GCs (Stern) nachgewiesen werden. Auch innerhalb der periellipsoidalen weißen Milzpulpa (Pfeil) fand sich weiterhin Antigen. Zusätzlich konnte Antigen auch in Bereichen der Milz, die nicht zum B-Zellareal gehören (Oval), nachgewiesen werden.

Intravenös appliziertes Antigen gelangt demnach offenbar über kleine Milzgefäße und das diese umgebende Ellipsoid während der ersten drei Stunden nach Applikation in das B-Zellareal der Milz (periellipsoidale weiße Pulpa). Drei Tage nach Applikation befindet sich Antigen zusätzlich in bestehenden GCs und im Bereich zwischen den Milz-B-Zellregionen.

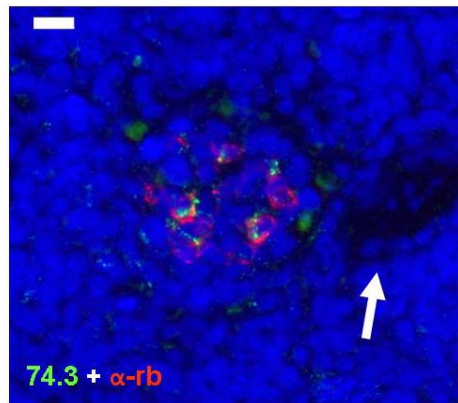


**Abb. 21 Ablagerung von Immunisierungsantigen innerhalb und außerhalb der B-Zellzone der Hühnermilz**

Gefrierschnitte von Hühnermilzen drei Stunden und drei Tage nach Immunisierung wurden mit einem B-Zellmarker (grün,  $\alpha$ -Bu1a+b) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. In der Milz abgelagertes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 10x, Balken 200 $\mu$ m (links) und Ausschnittvergrößerung 40x, Balken 50 $\mu$ m (rechts), jeweils von dem GC (türkis) und der mit Pfeil markierten B-Zellregion (periellipsoidale weiße Pulpa) (gelb); Oval = außerhalb GCs und der periellipsoidalen weißen Pulpa nachgewiesenes Antigen.

Um die Lokalisation des drei Tage nach Immunisierung außerhalb der B-Zellareale befindlichen Antigens näher zu charakterisieren wurden Doppelfärbungen für Antigen und den FDC-Marker 74.3 auf Milzgefrierschnitten angefertigt. Abb. 22 zeigt abgelagertes Antigen, welches auf netzartig zusammengelagerten 74.3<sup>+</sup> FDCs in Nachbarschaft zu einem Milzgefäß gefunden wurde.





**Abb. 22 Ablagerung von Immunisierungsantigenen auf gefäßassoziierten FDCs**

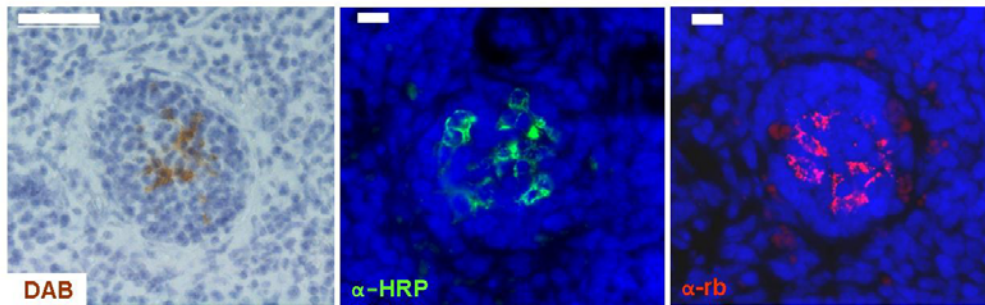
Gefrierschnitte von Hühnermilzen wurden drei Tage nach Immunisierung mit dem FDC-Marker 74.3 (grün) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. In der Milz abgelagertes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Pfeil = Milzgefäß; Vergrößerung 40x; Balken = 20 $\mu$ m.

#### 5.1.4.1.2 Ablagerung von Immunisierungsantigen in GCs

##### 5.1.4.1.2.1 Ablagerung von Antigen im Zentrum von GCs

Antigen wird im etablierten Säuger-GC innerhalb der hellen Zone auf FDCs in Form gebundener Immunkomplexe gefunden [53]. Um die Verteilung abgelagerter Immunkomplexe innerhalb von Hühner-GCs zu untersuchen wurde drei Tage nach Immunisierung die Lokalisation des Antigens in Milz-GCs genauer untersucht.

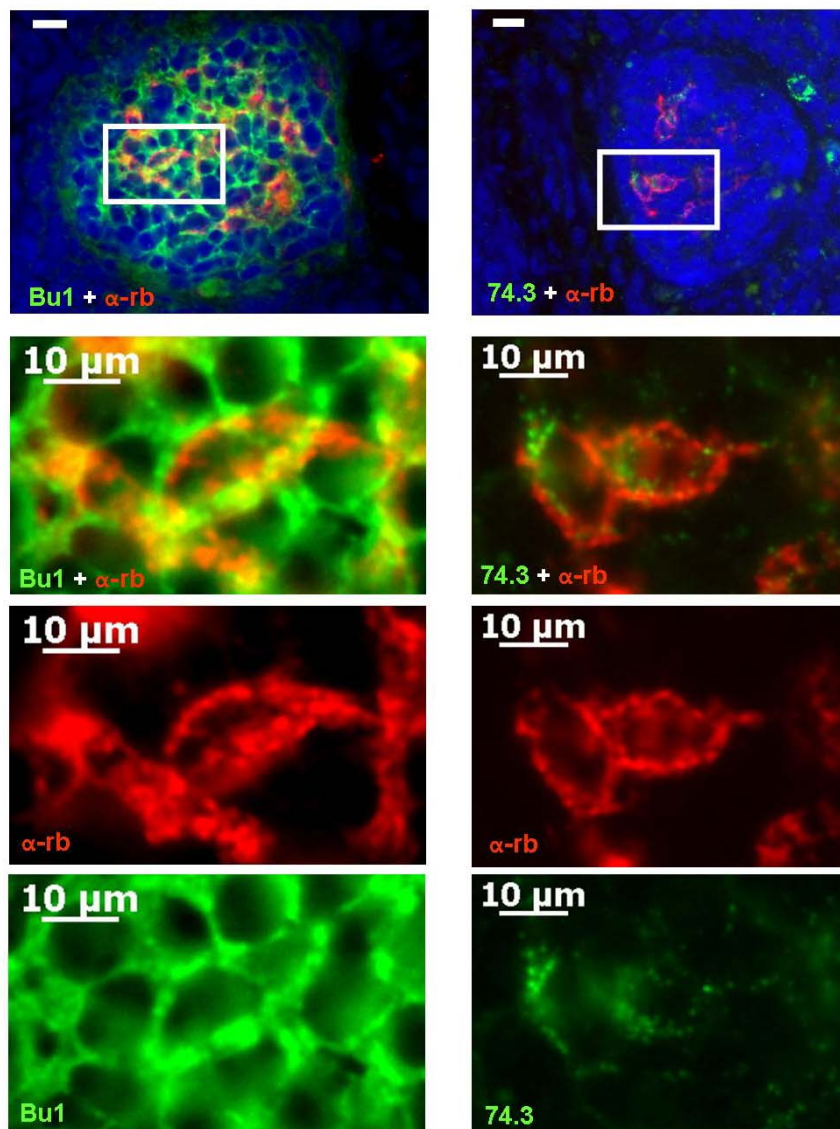
Dazu wurde zunächst die Aktivität der im Gewebe abgelagerten Peroxidase in Milzgefrierschnitten wie unter 4.4.5 beschrieben durch den Nachweis der Enzymaktivität lokalisiert. In anderen Schnitten wurde das im Gewebe abgelagerte Antigen mit einem  $\alpha$ -Peroxidase-Antikörper oder einem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper angefärbt (4.4.4). Mit allen drei Methoden zeigte sich, dass das injizierte Antigen, wie in Abb. 23 dargestellt, in der Mitte des GC-Anschnittes lokalisiert war.



**Abb. 23 Ablagerung von Antigen erfolgt auf Zellen im Zentrum des germinalen Zentrums**

Drei Tage nach Immunisierung wurde die Peroxidaseaktivität in Milzgefrierschnitten mit dem Vector<sup>®</sup> DAB-Kit braun nachgewiesen (links). Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Weitere Gefrierschnitte wurden mit einem  $\alpha$ -Peroxidaseantikörper inkubiert (mitte, grün). Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Zusätzlich wurde abgelagertes Antigen mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rechts, rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x; Balken = 20 $\mu$ m.

Um diese antigenbindenden Zellen anzusprechen, wurden wie unter 4.4.4 beschrieben Doppelfärbungen durchgeführt (siehe Abb 24 Speicherung von Antigen in GCs erfolgt auf 74.3<sup>+</sup>FDCs Abb 24). Das Antigen wurde mit einem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper markiert. Die GC-B-Zellen wurden mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b angefärbt. Eine Ausschnittvergrößerung zeigt, dass die Bereiche der Antigenablagerung nicht mit dem Verlauf der Zellgrenzen der Bu-1<sup>+</sup>-B-Zellen im GC übereinstimmten. Eine weitere Doppelfärbung mit dem FDC-Marker 74.3 und dem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper ergab, dass es sich bei den Zellen, auf denen sich das Antigen im germinalen Zentrum wiederfand, um FDCs handelte.



**Abb 24 Speicherung von Antigen in GCs erfolgt auf 74.3<sup>+</sup>FDCs**

Gefrierschnitte von Hühnermilzen drei Tage nach Immunisierung wurden mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b (links) und dem FDC-Marker 74.3 (rechts) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). In der Milz abgelagertes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x; Balken oben = 20 $\mu$ m; Ausschnittvergrößerung unten Balken = 10 $\mu$ m.

#### 5.1.4.1.2.2 Zeitlicher Verlauf der Ablagerung von Antigen im Kontext mit bestimmten Immunglobulinklassen in GCs

Intravenös appliziertes Antigen wird in der Hühnermilz wie in 5.1.4.1.1 gezeigt innerhalb der ersten drei Tage auf FDCs in bestehenden GCs und auf weiteren antigenbindenden Zellen der weißen Pulpa im Bereich arterieller Gefäßaufzweigungen abgelagert. Die Antigenablagerung auf FDCs erfolgt

definitionsgemäß in Form von Immunkomplexen [83, 86, 154]. Um die Immunkomplexe darzustellen wurde wie unter 4.4.4 beschrieben in Milzschnitten immunisierter Hühner das vorhandene Antigen mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper markiert. In dieser Färbung ging der Detektion des Antigens ein zusätzlicher Inkubationsschritt der Milzschnitte mit dem Immunisierungsantigen voraus. Folglich färbte der  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper in den Schnitten neben *in situ* abgelagertem Antigen auch von antigenspezifischen Zellen nach Inkubation gebundenes Antigen. Vorhandenes IgM, IgY oder IgA wurde zusätzlich mit einem zweiten Fluorochrom detektiert.

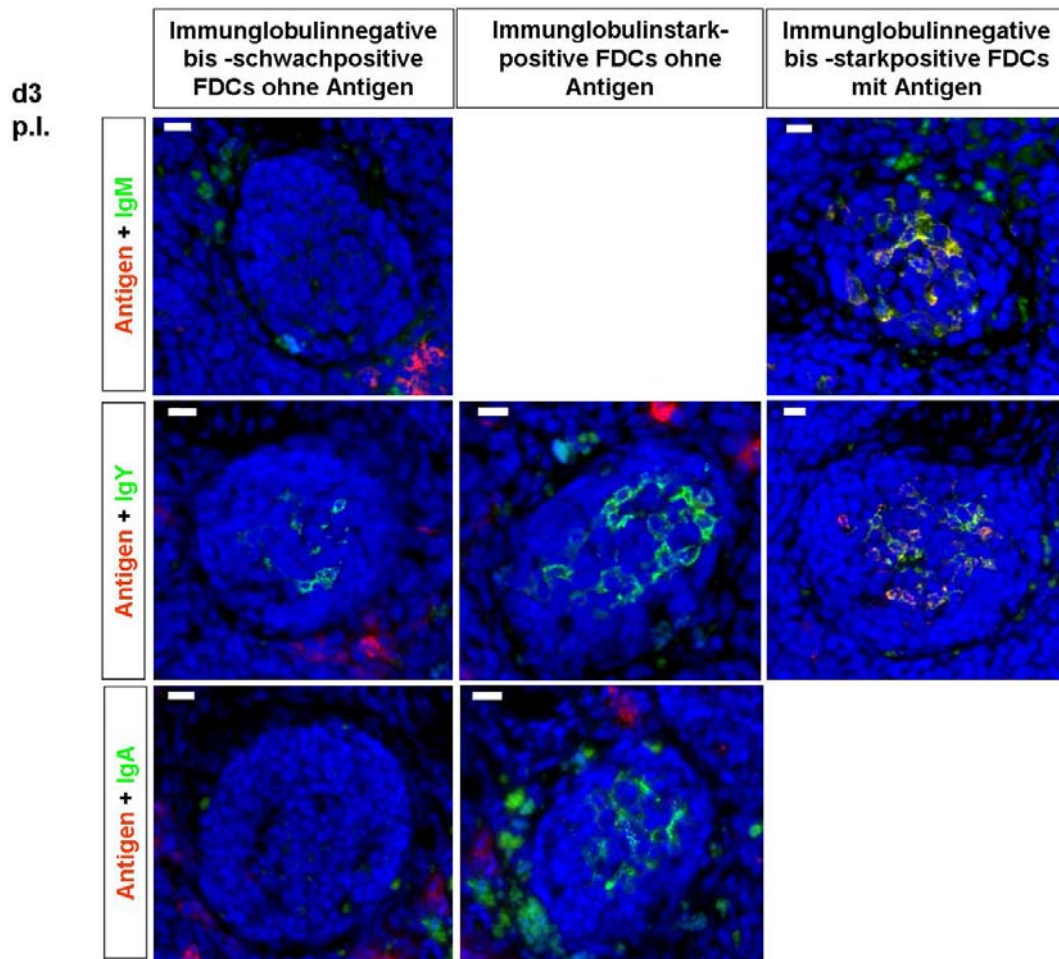
Alle in den Tieren gefundenen Kombinationen der Ablagerung von Immunglobulinen und Antigen in GCs drei Tage nach Immunisierung sind exemplarisch in Abb. 25 abgebildet.

Drei Tage nach Immunisierung konnte Antigen lediglich in einem Teil der in der Milz vorhandenen GCs angefärbt werden. Das auf den FDCs dieser GCs anfärbbare Antigen kolokalisierte deutlich mit IgM-Antikörpern. In der Doppelfärbung mit IgY zeigte sich, dass die Überlappung von Antigen auf FDCs mit IgY-Ablagerungen nicht eindeutig nachzuvollziehen war. Während alle Antigenablagerungen bei der Doppelfärbung mit IgM im Überlagerungsbild gelb gefärbt waren, traf dies für die Überlagerung der Einzelfluoreszenzen der IgY-Doppelfärbung weitgehend nicht zu. Es gab zusätzlich zu doppeltangefärbten Zellen im GC auch Zellen, auf denen nur IgY, ebenso wie Zellen auf denen nur das Antigen detektierbar war.

Bezüglich der Ablagerung von Immunglobulinen auf FDCs in den GCs der Milz fiel auf, dass sich GCs ohne IgM-Ablagerungen auf FDCs fanden, sowie solche mit IgM in Kolokalisation mit Antigen. Die IgY-Färbung ergab keine GCs ohne IgY-Ablagerung auf FDCs in den untersuchten Schnitten. Die IgA-Färbung ergab GCs mit und ohne IgA-Ablagerungen auf FDCs. Es wurden keine GCs gefunden, die auf zentralen FDCs gleichzeitig Antigen- und IgA-Ablagerungen zeigten.

Auf die in Abb. 25 ebenfalls vorhandenen antigenbindenden antigenspezifischen Zellen im Milzgewebe außerhalb der GCs, wird unter 5.1.4.2 detailliert eingegangen.

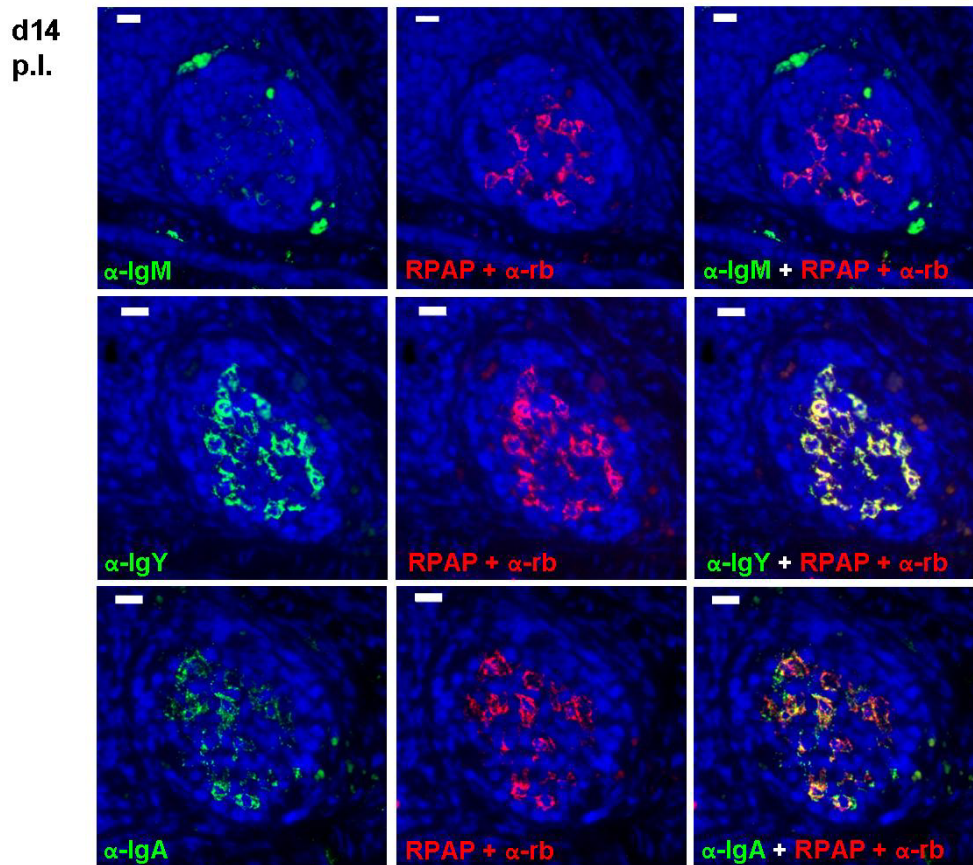
In der Milz gab es also drei Tage nach Immunisierung GCs mit FDCs die IgM, IgY oder IgA auf ihrer Oberfläche trugen. Es gab GCs ohne nachweisbares von FDCs gebundenes IgM und IgA. IgY war hingegen auf den FDCs bestehender GCs immer präsent. Das Immunisierungsantigen fand sich innerhalb dreier Tage nach Applikation auf FDCs in der Milz vorhandener GCs offensichtlich im Kontext mit IgM wieder.



**Abb. 25** Kolokalisation von IgM und Immunisierungsantigen als Immunkomplexe auf FDCs im Zentrum von GCs der Hühnermilz drei Tage nach Immunisierung  
Milzgefrierschnitte wurden mit Markern für IgM (oben), IgY (mitte) und IgA (unten) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Schnitte wurden weiterhin mit dem Immunisierungsantigen inkubiert. In der Milz abgelagertes Antigen und von antigenspezifischen Zellen nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x; Balken = 20 $\mu$ m.

Um die Frage zu klären, ob Immunglobuline unterschiedlicher Klassen innerhalb eines germinalen Zentrums im Kontext mit Immunisierungsantigen auf FDCs abgelagert werden, wurden wie unter 4.4.4 erläutert doppeltgefärbte Serienschnitte durch ein GC untersucht. Abb. 26 zeigt Doppelfärbungen dreier

konsekutiver GC-Anschnitte für die Immunglobulinklasse IgM, IgY und IgA mit dem Immunisierungsantigen 14 Tage nach Immunisierung. Das Antigen fand sich 14 Tage nach Immunisierung auf FDCs in GCs wieder, die kaum IgM-Färbung zeigten. Es kolokalisierte auf den FDCs hingegen stark mit IgY-Antikörpern. Auch IgA und das Antigen kolokalisierten 14 Tage nach der Immunisierung zum Teil auf FDCs des germinalen Zentrums.

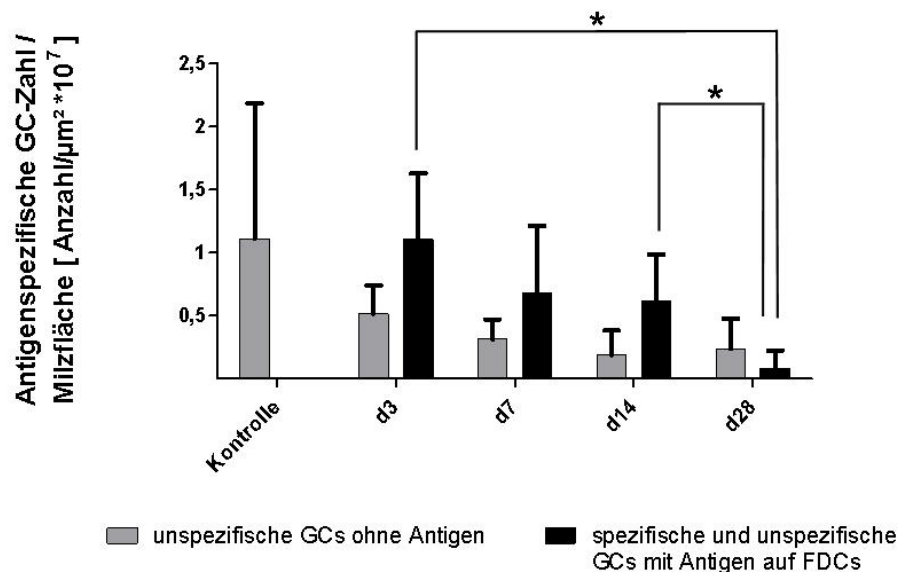


**Abb. 26 Simultane Ablagerung von IgM, IgY, IgA und Antigen auf FDCs eines GCs 14 Tage nach Immunisierung**

Serienschnitte der Hühnermilz wurden mit Markern für IgM (oben), IgY (mitte) und IgA (unten) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit einem fluorchromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Schnitte wurden weiterhin mit dem Immunisierungsantigen inkubiert (RPAP). In der Milz abgelagertes Antigen und von antigenspezifischen Zellen nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorchromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Serienanschnitte des gleichen GCs. Vergrößerung 40x; Balken = 20 $\mu$ m.

Um die Dauer der Speicherung von Antigen in GCs zu beurteilen wurde in Milzen immunisierter Tieren drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Antigengabe GCs auf Antigenablagerungen untersucht. Dazu wurden in fünf 300 $\mu$ m entfernten Milzschnitten die Anzahl GC-Anschnitte pro untersuchte Milzquerschnittsfläche bestimmt. Es wurden Milzgefrierschnitte wie unter 4.4.5 beschrieben gefärbt und

GCs die entweder keine Antigenablagerungen oder Antigenablagerungen aufwiesen gezählt. GCs die Antigenablagerungen aufwiesen, waren z.T. spezifisch für die Immunisierung. Auf solche GCs wird unter 5.1.4.2.2 genauer eingegangen. Abb. 27 zeigt, dass die Zahl der GC-Anschnitte mit abgelagertem Antigen über den Versuchszeitraum von vier Wochen nach Immunisierung abnahm. Die Kontrollgruppe wurde nicht immunisiert.



**Abb. 27 Abnahme von GCs mit Antigenablagerungen auf FDCs nach Antigenapplikation bis 28 Tage nach Immunisierung**

In 5 Milzgefrierschnitten mit 300µm Abstand von immunisierten Hühnern wurde die Zahl antigenspeichernder und nicht speichernder GCs pro untersuchte GC-Fläche zu definierten Zeitpunkten nach einer Immunisierung untersucht [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung; n=4; Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test; \*p≤0,05.

## 5.1.4.2 Auftreten antigenspezifischer Zellen nach Immunisierung

### 5.1.4.2.1 Auftreten antigenspezifischer Zellen in der roten Milzpulpa

Schon 24 Stunden nach der intravenösen Gabe von Antigen treten im Milzgewebe erste Ansammlungen antigenspezifischer Zellen auf. Diese Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie auf Milzgewebeschnitte aufgebrachtes Immunisationsantigen binden können [83]. Um die Lokalisation antigenspezifischer Zellen in der Milz einzugrenzen, wurden, wie unter 4.4.4 beschrieben, Doppelfärbungen einmal für das Antigen und die B-Zellzone der Milz sowie für antigenbindende Zellen, Antigen und die B-Zellzone der Milz angefertigt.

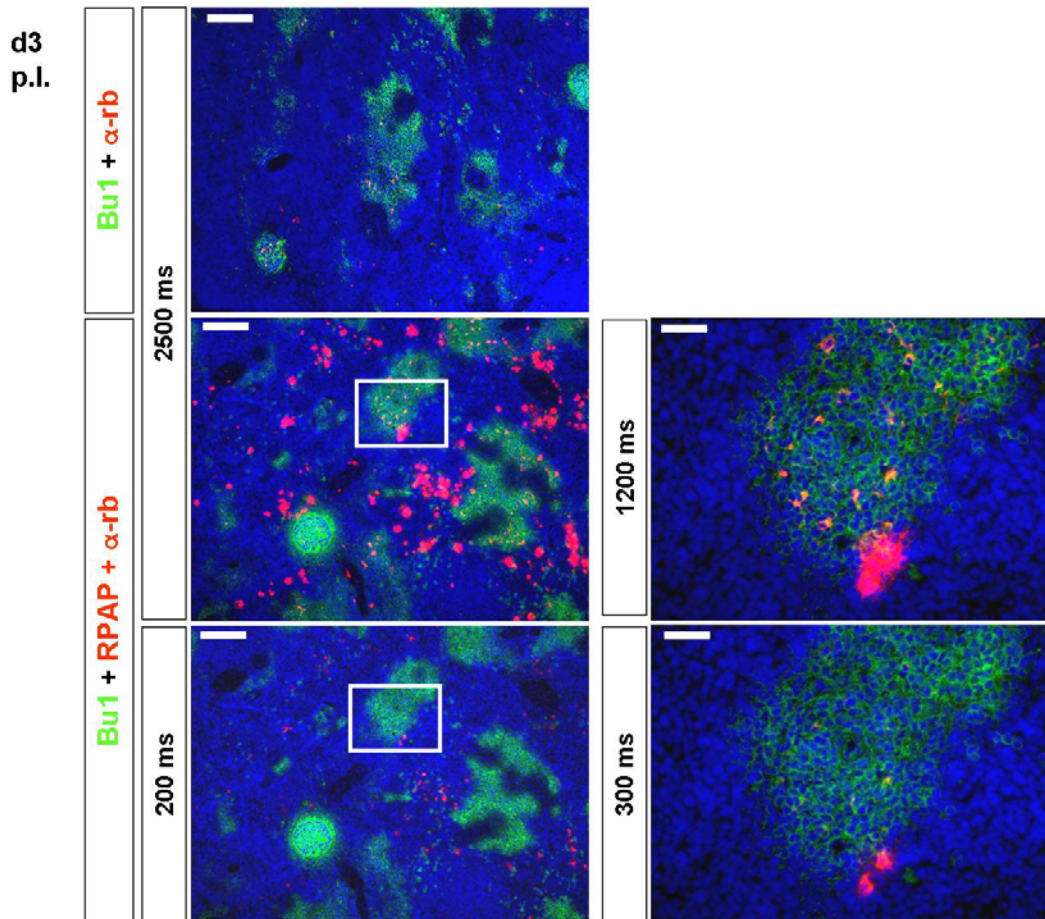
Abb. 28 zeigt derart gefärbte Milzschnitte eines Tieres drei Tage nach intravenöser Immunisierung. In dem oberen Präparat wurde zunächst lediglich das Antigen mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in seiner Relation zu B-Zellen, die mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b markiert sind, detektiert. Das Antigen befand sich wie unter 5.1.4.1.1 detailliert beschrieben in der Hauptsache innerhalb der B-Zellregion der Milz. Die untere der beiden Fotoreihen zeigt ein Präparat, welches vor der Detektion mit dem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper zunächst mit dem Immunisierungsantigen inkubiert wurde. Während dieser Inkubationsphase konnte das Antigen von Zellen die einen spezifischen Rezeptor dafür besitzen, gebunden werden. Der nachfolgend aufgetragene  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper konnte sowohl das *in situ* in der Milz gespeicherte Antigen detektieren, als auch das von antigenspezifischen Zellen während der Inkubationsphase gebundene Antigen markieren. Die obere Reihe der beiden Fotos mit der Antigeninkubationsphase wurde mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen, wie das Foto des Präparates ohne Antigeninkubationsphase. Diese lange Belichtungsdauer ermöglichte es, das *in situ* in der Milz in geringer Menge gespeicherte Antigen zu detektieren. Bei einer solch langen Belichtungszeit stellten sich die Zellen, die in dem Antigeninkubationsschritt das Antigen binden konnten, als stark überbelichtete helle Flecken dar. Aus diesem Grund zeigt die untere Reihe der Fotos mit Antigeninkubationsschritt den gleichen Bildausschnitt, jedoch mit einer kürzeren Belichtungszeit, um die antigenspezifischen Zellen korrekt abzubilden. Das *in situ* gespeicherte Antigen war bei dieser Belichtungszeit nicht mehr vollständig darstellbar.

Während sich das Antigen in der Hauptsache innerhalb der B-Zellregion der periellipsoidalen weißen Pulpa und auf FDCs von GCs fand, befinden sich die antigenspezifischen Zellen, die nach dem Antigeninkubationsschritt nachweisbar waren, in den Milzregionen zwischen den B-Zellarealen. Diese stark angefärbten Zellen mit großem Zytoplasmasaum waren bereits in den stärkeren Vergrößerungen eines Milzausschnittes mit einem GC in Abb. 25 um die GCs herum aufgefallen.

Drei Tage nach Immunisierung ist der Bereich der roten Milzpulpa zwischen den B-Zellarealen mit antigenbindenden antigenspezifischen Zellen mit großem



Zytoplasma angefüllt. Die Gegenüberstellung der Belichtungszeiten zeigt, dass im Vergleich zu dem in der B-Zellregion und in GCs abgelagerten Antigen diese Zellen größere Mengen an Immunisierungsantigen binden können und folglich eine große Menge spezifischer Rezeptoren für das Immunisierungsantigen aufweisen müssen.



**Abb. 28 Lokalisation antigenspezifischer Zellen drei Tage nach Immunisierung im Milzgewebe zwischen den B-Zellarealen**

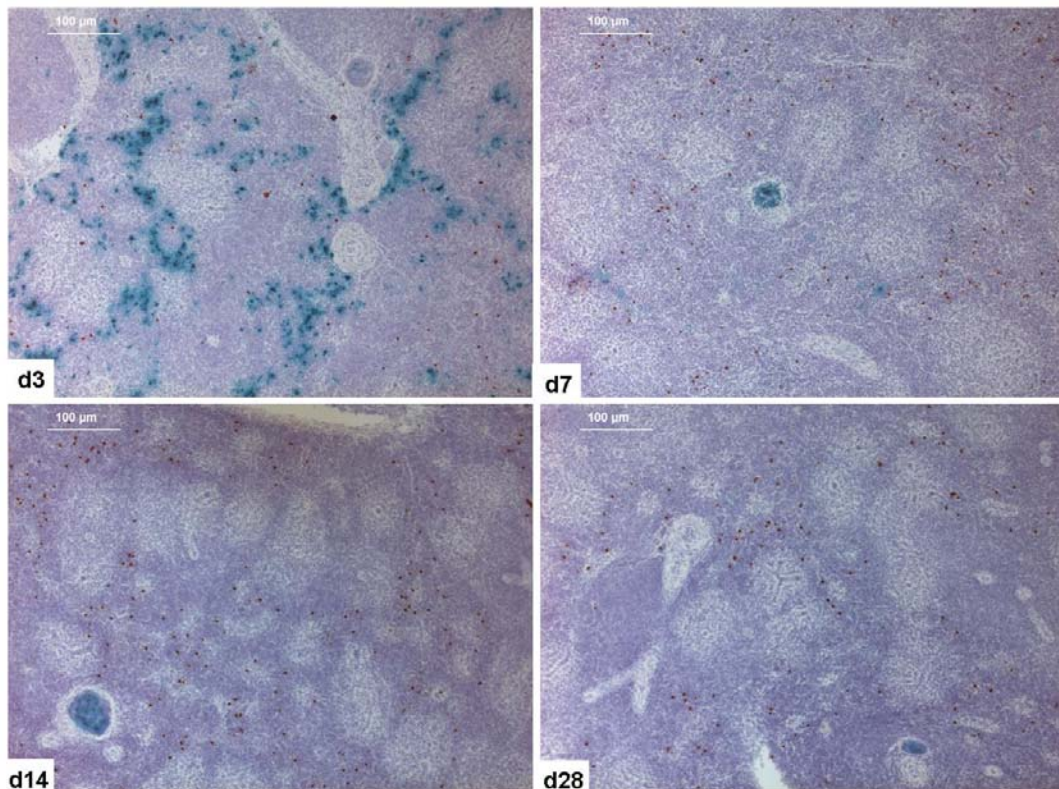
Zwei Milzpräparate wurden mit dem B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). In dem oberen Präparat wurde lediglich abgelagertes Antigen mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Das Präparat in den unteren beiden Fotoreihen wurde mit dem Immunisierungsantigen inkubiert (RPAP). In der Milz abgelagertes Antigen und von antigenspezifischen Zellen nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Zellkerne wurden mit DAPI anfärbt (blau). Vergrößerung links 10x, Balken links = 200 $\mu$ m und Vergrößerung der mit Rechtecken markierten Bildausschnitte 40x, Balken rechts = 50 $\mu$ m. Die oberen beiden Bildreihen wurden mit der angegebenen langen Belichtungszeit fotografiert. Die untere Bildreihe wurde mit der angegebenen kürzeren Belichtungszeit aufgenommen.

#### 5.1.4.2.2 Auftreten antigenspezifischer GCs

Aus Arbeiten an der Maus ist bekannt, dass antigenspezifische B-Zellen sich zunächst in Foki außerhalb der Primärfollikel vermehren, bevor sie diese besiedeln und ein GC begründen. Die Foki verschwinden bald nach Etablierung antigenspezifischer GCs [40, 46]. Um die Frage ob dies auch im Huhn geschieht zu klären, wurden Übersichtsaufnahmen von Milzschnitten angefertigt. In Milzgefrierschnitten wurde dazu wie unter 4.4.5 beschrieben zunächst die Peroxidaseaktivität von nach Immunisierung in der Milz abgelagertem Antigen ebenso wie jene immer vorhandener Peroxidase<sup>+</sup>-Zellen in der roten Milzpulpa mit einem braunen Peroxidasesubstrat umgesetzt. Zusätzlich wurden die Milzschnitte dann mit dem Immunisierungsantigen inkubiert. Das in diesem Schritt von antigenspezifischen Zellen gebundene Antigen wurde mit einem zweiten Peroxidasesubstrat türkis angefärbt. Antigenspezifische Zellen stellen sich in dieser Färbung demnach türkis dar.

Abb. 29 zeigt, dass in Hühnermilzen sieben Tage nach Immunisierung, die antigenspezifischen Zellen außerhalb von GCs weitgehend verschwunden waren. 14 und 28 Tage nach Immunisierung fanden sich nur noch ganz vereinzelt antigenspezifische Zellen in der Milzpulpa außerhalb von GCs. Stattdessen traten GCs auf, die mit antigenspezifischen Zellen angefüllt waren. Die durchgeführte Färbung mit zwei Peroxidasesubstraten musste ohne die übliche initiale Blockierung endogener Peroxidase auf den Gewebeschnitten auskommen, um in GCs abgelagerte Peroxidase anfärben zu können. Aus diesem Grund sind neben braun gefärbten Peroxidaseablagerungen des Antigens auf FDCs auch jedem untersuchten Zeitpunkt braun gefärbte Einzelzellen, die endogen Peroxidase enthalten, in der roten Milzpulpa angefärbt.

Die Ansammlungen antigenspezifischer Zellen, die drei Tage nach Immunisierung innerhalb der roten Milzpulpa auftraten, verschwanden demnach auch im Huhn zeitgleich mit dem Auftreten erster antigenspezifischer GCs in der Milz.



**Abb. 29 Nachweis antigenspezifischer Zellen in der Milz**

Die Peroxidaseaktivität in Milzgefrierschnitten drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Immunisierung wurde mit dem Vector® DAB-Kit braun umgesetzt. Das Immunisierungsantigen wurde anschliessend auf den Schnitten inkubiert. Von spezifischen Zellen gebundenes Antigen wurde mit Vector HistoGreen® türkis angefärbt, sodass sich antigenspezifische Zellen türkis darstellen. Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 10x; Balken = 100µm.

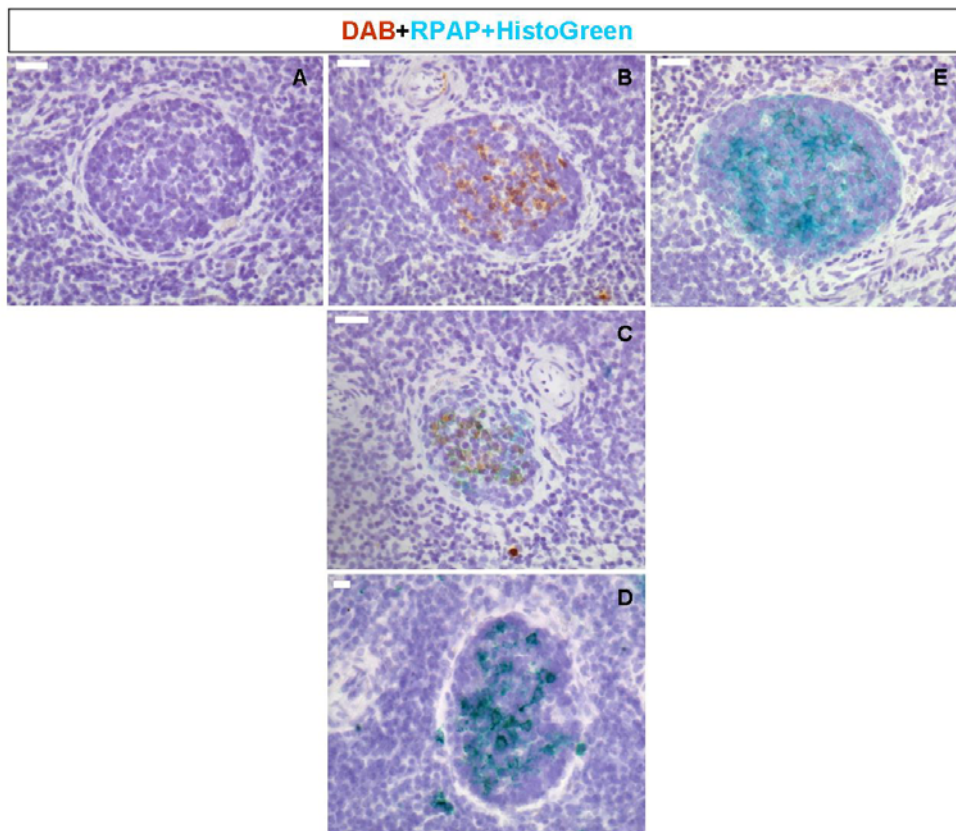
#### 5.1.4.2.2.1 Phänotyp antigenspezifischer GCs in der Hühnermilz

Um antigenspezifische GCs in der Milz immunisierter Hühner nachzuweisen, wurde das zur Immunisierung verwendete Antigen auf Milzgefrierschnitten inkubiert. Gebundenes Immunisierungsantigen wurde dann mit einem Peroxidasesubstrat oder einem fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert. Um die von antigenspezifischen Zellen gebundenen Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Komplexe von *in situ* in GCs nach Immunisierung abgelagertem Antigen abzugrenzen wurde jeweils auch das abgelagerte Antigen angefärbt.

Abb. 30 zeigt verschiedene GCs in Milzgefrierschnitten in denen zunächst die Peroxidaseaktivität von nach Immunisierung in der Milz abgelagertem Antigen mit einem braunen Peroxidasesubstrat umgesetzt wurde. Zusätzlich wurden die Milzschnitte dann mit dem Immunisierungsantigen inkubiert. Das in diesem Schritt von antigenspezifischen Zellen gebundene Antigen wurde mit einem

zweiten Peroxidasesubstrat türkis angefärbt.

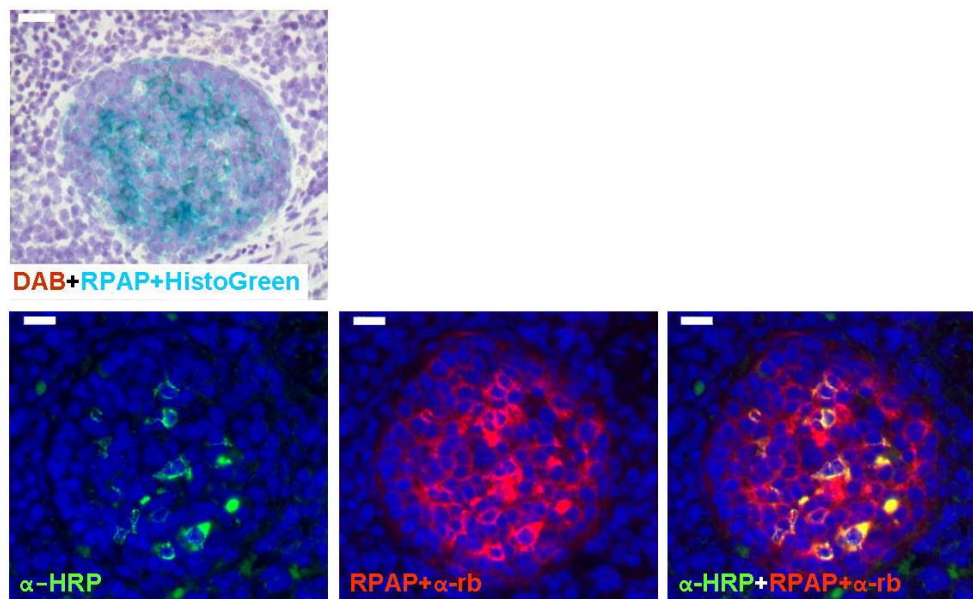
In den so behandelten Milzschnitten fanden sich GCs, in denen kein abgelagertes Antigen nachgewiesen werden konnte (Abb. 30 A). Es fanden sich auch GCs in denen Antigen abgelagert wurde (Abb. 30 B-D, Antigen: braun). Diese traten in dreierlei Form auf. Es gab GCs, in denen sich keine türkis angefärbten Zellen fanden, die das Antigen spezifisch binden konnten (Abb. 30 B). Andere GCs wiesen zusätzlich zu zentralen FDCs mit braun angefärbten Antigenablagerungen einige türkis gefärbte Zellen auf, die das Antigen nach Inkubation auf dem Gewebeschnitt unterschiedlich deutlich gebunden hatten (Abb. 30 C+D). Aufgrund der Lokalisation zentral im GC können diese Zellen in dieser Doppelfärbung nicht eindeutig als spezifische B-Zellen oder als FDCs angesprochen werden. FDCs könnten Immunkomplexe aus Immunisierungsantigen und spezifischen Hühnerimmunglobulinen mit noch freien Antigenbindungsstellen der Hühnerimmunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen, die auf dem Schnitt inkubiertes Antigen binden konnten. Deshalb wurden solche GCs im Weiteren nicht als antigenspezifisch angesehen. Eine weitere Form der GCs mit zentralen Antigenablagerungen waren solche, die mit der Mehrzahl der im Anschnitt befindlichen Zellen innerhalb der Kapsel des germinalen Zentrums das Immunisierungsantigen nach Inkubation binden konnten (Abb. 30 E). Diese GCs, in denen offensichtlich auch alle B-Zellen dazu in der Lage waren das Antigen bei Inkubation zu binden, wurden im Folgenden als antigenspezifische GCs angesprochen.



**Abb. 30 Phänotypen von GCs nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen**

Die Peroxidaseaktivität in Milzgefrierschnitten sieben Tage nach Immunisierung wurde mit dem Vector<sup>®</sup> DAB-Kit braun nachgewiesen, sodass abgelagertes Antigen braun angefärbt ist. Das Immunisierungsantigen wurde anschließend auf den Schnitten inkubiert (RPAP). Von antigenspezifischen Zellen gebundenes Antigen wurde mit Vektor HistoGreen<sup>®</sup> türkis angefärbt. Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 40x.

Abb. 31 zeigt zusätzlich zu einem konsekutiv mit zwei Peroxidasesubstraten gefärbten antigenspezifischen GC eine wie unter 4.4.4 beschriebene Fluoreszenz-Doppelfärbung eines antigenspezifischen GCs. In dieser Doppelfärbung wurde zunächst die in den auf FDCs abgelagerten Immunkomplexen befindliche Peroxidase mit einem  $\alpha$ -Peroxidase-Antikörper angefärbt. Dann wurde das Immunisierungsantigen auf dem Milzschnitt inkubiert und gebundenes Antigen mit einem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert. Die FDCs mit abgelagertem Immunisierungsantigen sind umgeben von Zellen, die das Antigen spezifisch binden konnten. Da das Immunisierungsantigen ein Komplex aus Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase und Peroxidase ist, färben sich die Bereiche der Peroxidaseablagerung ebenfalls durch den  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper stark an.

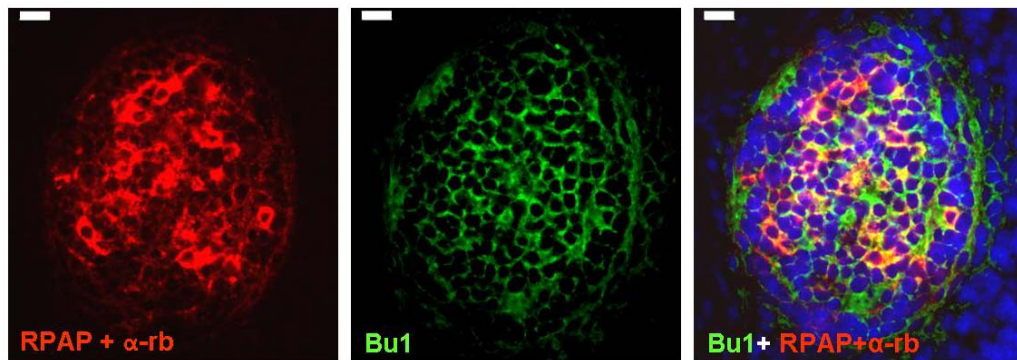


**Abb. 31 Bindung des Immunisierungsantigens in antigenspezifischen GCs**

Milzgefrierschnitten sieben Tage nach Immunisierung wurden wie in Abb. 30 beschrieben gefärbt. Andere Milzpräparate wurden mit einem biotinylierten  $\alpha$ -Peroxidase-Antikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit fluorochromkonjugierten Streptavidin detektiert (grün). Das Präparat wurde dann mit dem Immunisierungsantigen inkubiert (RPAP). In der Milz abgelagertes Antigen und von antigenspezifischen Zellen nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper kenntlich gemacht (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m.

In Abb. 32 ist ein antigenspezifisches GC aus einem wie unter 4.4.4 erläutert doppeltgefärbten Präparat dargestellt. Das nach Inkubation auf dem Milzschnitt gebundene Immunisierungsantigen wurde mit einem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert. Die B-Zellen wurden mit dem  $\alpha$ -Bu1a+b-Antikörper markiert. Diese Doppelfärbung zeigt dass sich die peripher in dem GC-Anschnitt gelegenen antigenspezifischen Zellen auch mit dem B-Zellmarker anfärben. Auch in diesem GC-Anschnitt färben sich die Antigenablagerungen auf den FDCs zentral im GC besonders stark mit dem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper an.

Bei den peripher im GC gelegenen GC-Zellen handelt es sich somit um antigenspezifische B-Zellen, die das Antigen mit ihrem spezifischen B-Zellrezeptor nach Inkubation des Antigens auf dem Gewebeschnitt binden konnten.

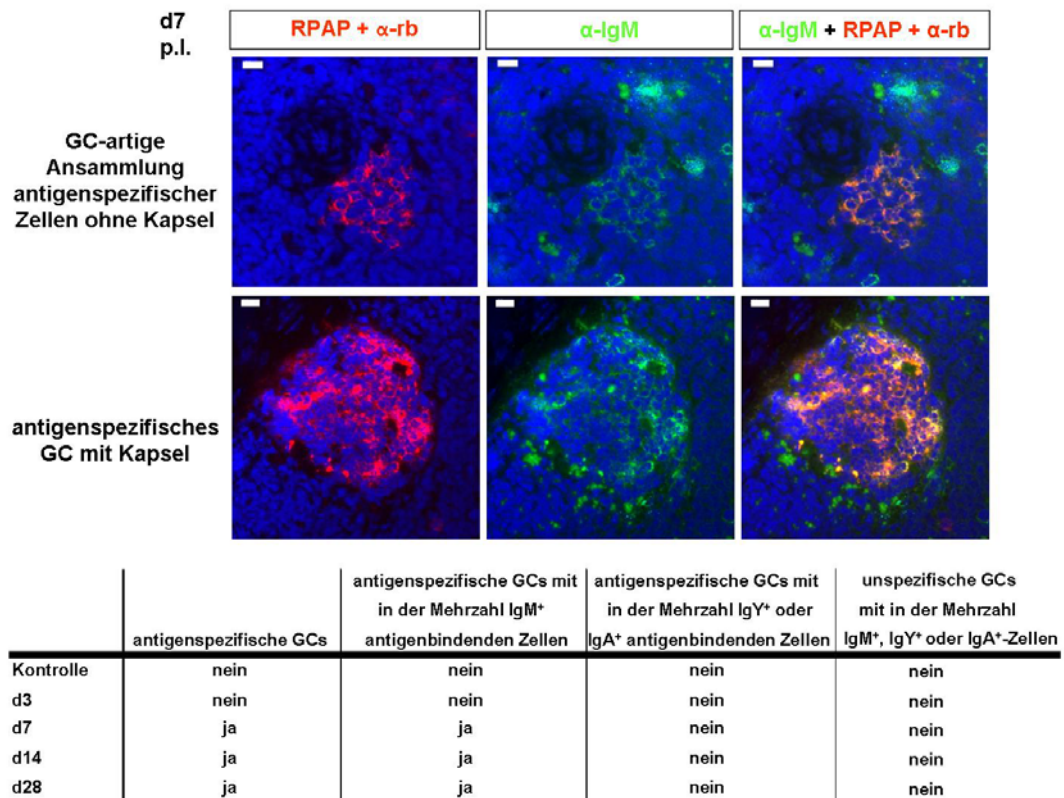


**Abb. 32 Bindung des Immunisierungsantigens in antigenspezifischen GCs durch antigenspezifische B-Zellen**

Milzgefrierpräparate wurden mit dem B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Präparate wurden nachfolgend mit dem Immunisierungsantigen inkubiert (RPAP). In der Milz abgelagertes Antigen und nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper markiert (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x.

Abb. 33 zeigt eine Doppelfärbung mit einem Marker für IgM und für das Antigen detektiert mit dem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper (siehe 4.4.4). Dargestellt sind eine GC-artige Ansammlung antigenspezifischer Zellen und ein voll entwickeltes antigenspezifisches GC jeweils sieben Tage nach Immunisierung. In beiden Fällen färben sich die Zellen, die das Antigen nach Inkubation binden konnten auch mit dem IgM-Marker an. Zu keinem der Probennahmezeitpunkte (Tag drei, sieben, 14 und 28) trat in einer der untersuchten Milzen ein für das Immunisierungsantigen spezifisches GC auf, in dem die Mehrzahl der nach Inkubation das Antigen bindenden Zellen nicht  $\text{IgM}^+$  sondern für eine andere Immunglobulinklasse positiv waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass antigenspezifische GC-B-Zellen über den für vier Wochen untersuchten Verlauf der Immunisierung mit dem T-zellabhängigen Antigen Kaninchen-IgG- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe IgM-positiv waren. Es konnten während dieses Zeitraums keine GCs beobachtet werden, deren GC-B-Zellen in einem GC-Anschnitt in der Mehrzahl  $\text{IgY}^+$  oder  $\text{IgA}^+$  waren.



**Abb. 33 Antigen-spezifische B-Zellen in antigen-spezifischen GCs und Zellen in GC-artigen Zellansammlungen sind IgM<sup>+</sup>**

Milzgefrierschnitte wurden mit einem Marker für IgM inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Präparate wurden dann mit dem Immunisierungsantigen inkubiert (RPAP). In der Milz abgelagertes Antigen und nach Inkubation gebundenes Antigen wurde mit einem fluorochromkonjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper markiert (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m.

#### 5.1.4.2.2 Kinetik der Anbildung antigen-spezifischer GCs in der Hühnermilz

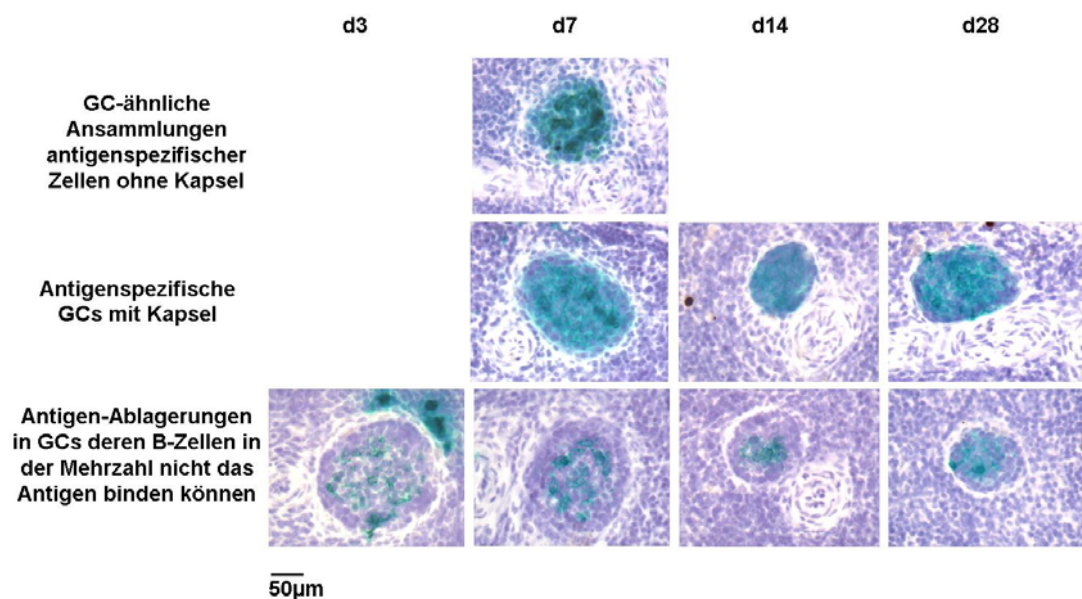
Um die Kinetik der GC-Reaktion nach einer intravenösen Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen zu beschreiben wurden die induzierten antigen-spezifischen GCs in der Milz quantifiziert. Als antigen-spezifische GCs wurden wie unter 5.1.4.2.1 definierte mit antigen-spezifischen B-Zellen angefüllte GCs angesprochen. Die Quantifizierung der spezifischen GCs erfolgte wie unter 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung) erläutert.

Abb. 34 zeigt alle zu den untersuchten Zeitpunkten (Tag drei, sieben, 14 und 28 nach Immunisierung) gefundenen Formen antigen-spezifischer GCs bzw. GC-ähnlicher Ansammlungen spezifischer Zellen in je vier untersuchten Hühnern pro



Probennahmezeitpunkt. Zusätzlich sind exemplarisch die zu jedem untersuchten Zeitpunkt stets vorhandenen GCs die lediglich Antigenablagerungen aufwiesen dargestellt.

Sieben Tage nach Immunisierung traten GC-ähnliche Ansammlungen antigenspezifischer Zellen die ein antigenspeicherndes Netz von FDCs umgaben auf. Diese frühen GCs zeigten keine Kapsel. Antigenspezifische GCs konnten sieben, 14 und 28 Tage nach Immunisierung gefunden werden. Antigen-speichernde GCs waren zu allen untersuchten Zeitpunkten ab dem dritten Tag nach der Immunisierung präsent.

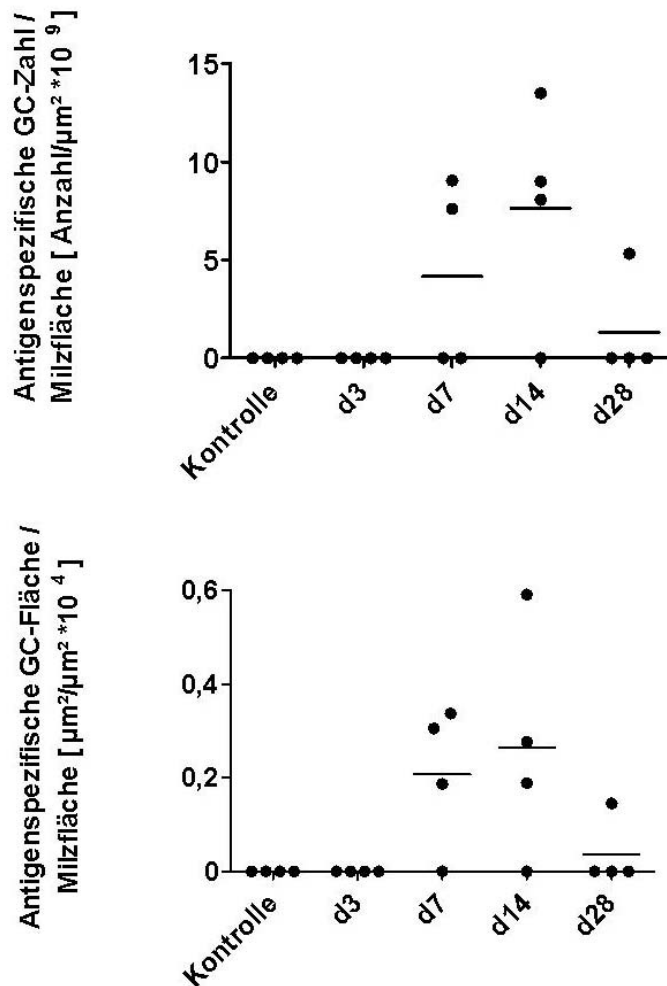


**Abb. 34** Auftreten antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Die Peroxidaseaktivität in Milzgefrierschnitten drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Immunisierung wurde mit dem Vector DAB-Kit ® braun umgesetzt, sodass abgelagertes Antigen sich braun darstellt. Das Immunisierungsantigen wurde dann auf den Schnitten inkubiert. Von spezifischen Zellen gebundenes Antigen wurde mit Vektor HistoGreen ® türkis angefärbt. Antigenspezifische Zellen stellen sich folglich türkis dar. Da es möglich ist, dass auf FDCs gebundene Immunkomplexe freie Bindungsstellen für das Antigen aufweisen, und dies nach Inkubation binden können, finden sich auch türkis angefärbte FDCs. Überlagert die türkise Färbung die braune Färbung dieser Zellen, so stellt sich dies als dunkelgrüne Färbung dar. Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Gezeigt sind alle beobachteten Typen von GCs. Vergrößerung 40x.

In Abb. 35 ist die Quantifizierung der spezifischen GCs zu den oben genannten untersuchten Zeitpunkten in den Milzen von je vier Tieren pro Probenahmezeitpunkt dargestellt. GCs in denen die Mehrzahl der B-Zellen das Antigen binden konnte traten ab Tag sieben nach der Immunisierung auf. Auch 14 Tage nach der Immunisierung waren in den untersuchten Tieren noch spezifische GCs in ähnlicher Zahl vorhanden. 28 Tage nach Antigen-gabe waren immer noch

spezifische GCs vorhanden, allerdings war ihre Zahl im Vergleich zu den Tiergruppen an Tag sieben und 14 reduziert. In der Kontrollgruppe nicht immunisierter Tiere konnten keine antigenspezifischen GCs nachgewiesen werden.



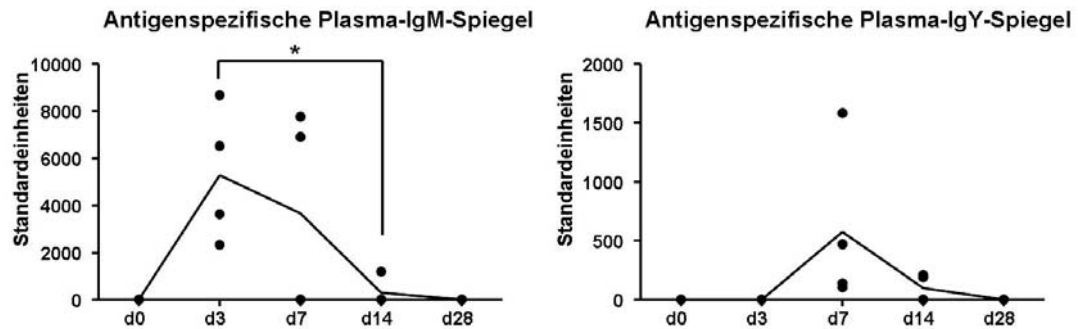
**Abb. 35 Quantifizierung antigenspezifischer GCs**

Oben: In 5 Milzgefrierschnitten mit  $300\mu\text{m}$  Abstand von immunisierten Hühnern wurde zu definierten Zeitpunkten nach Immunisierung die Zahl spezifischer GCs pro untersuchte Milzfläche festgestellt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Unten: In 5 Milzgefrierschnitten mit  $300\mu\text{m}$  Abstand von immunisierten Hühnern wurde zu definierten Zeitpunkten nach Immunisierung die Gesamtfläche antigenspezifischer GCs pro untersuchte Milzfläche festgestellt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Die Kontrollgruppe wurde nicht immunisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Einzeltiere als Punkte. Der Mittelwert der Gruppen ist als Linie gezeigt;  $n=4$ ; Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test.

### 5.1.5 Kinetik der Bildung antigenspezifischer Antikörper nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Die Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen führt zur Entstehung von antigenspezifischen Plasmazellen [1]. Da für das Huhn noch kein eindeutiger Marker für Plasmazellen bekannt ist, konnte sich der Anbildung antigenspezifischer antikörpersezernierender Plasmazellen nur insofern angenähert werden, dass der zeitliche Verlauf der antigenspezifischen Antikörperproduktion beschrieben wurde. Dazu wurden Plasmaproben drei, sieben, 14 und 28 Tage immunisierter Hühner wie unter 4.6.2.1 beschrieben in einem ELISA zur Detektion antigenspezifischer IgM- und IgY-Antikörper untersucht.

Abb. 36 zeigt den Verlauf der antigenspezifischen IgM und IgY-Spiegel. Aufgetragen sind die Werte der vier untersuchten Einzeltiere als Punkte zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Linie verbindet die Mittelwerte der Spiegel der Einzeltiere zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Der antigenspezifische IgM-Gehalt des Blutes stieg zeitgleich mit dem in Abb. 28 gezeigten zahlreichen Auftreten antigenspezifischer Zellen in der Milzpulpa zu Tag drei nach Immunisierung stark an. Der spezifische IgM-Spiegel sank danach wieder und war vier Wochen nach Immunisierung unter das Detektionslimit des ELISAs gefallen. Antigen-spezifische IgY-Antikörper wurden zeitversetzt zu Tag sieben nach der Immunisierung vermehrt gebildet. Auch der spezifische IgY-Spiegel des Blutes sank bis zu Tag 28 nach Antigenapplikation wieder unter das Detektionslevel des Assays.



**Abb. 36** Verlauf der antigenspezifischen IgM und IgY-Plasmaspiegel nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Antigenspezifisches IgM und IgY in Plasmaproben wurden mittels ELISA bestimmt (siehe 4.6.2.1). Aufgetragen sind ELISA-Spiegel von vier untersuchten Einzeltieren als Punkte zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. Die Linie verbindet die Mittelwerte der Spiegel der Einzeltiere. Der Verlauf des antigenspezifischen IgM-Spiegels im Blut ist links dargestellt, der von antigenspezifischem IgY rechts. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test; \* $p \leq 0,05$ ;  $n=4$ .

### 5.1.6 B-Zellproliferation im germinalen Zentrum des Huhnes

Dunkle und helle Zone stellen zwei funktionell unterschiedliche Kompartimente innerhalb des Säuger-GCs dar (siehe 2.1.4.2). B-Zellen proliferieren unter Veränderung ihrer B-Zellrezeptorgene durch somatische Hypermutation in der dunklen Zone. Daran schließt sich die Selektion anhand der Antigenaffinität der modifizierten B-Zellrezeptoren in der hellen Zone an [53]. Die Speicherung von Antigen auf FDCs im Zentrum von GCs der Hühnermilz und das Auftreten eines Ringes von B-Zellen in der S-Phase unter der Kapsel der GCs drei Stunden nach BrdU-Applikation deuten an, dass diese GC-Bereiche im Huhn funktionell der hellen und dunklen Zone entsprechen [87].

#### 5.1.6.1 Verteilung proliferierender Zellen im GC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BrdU-Injektion

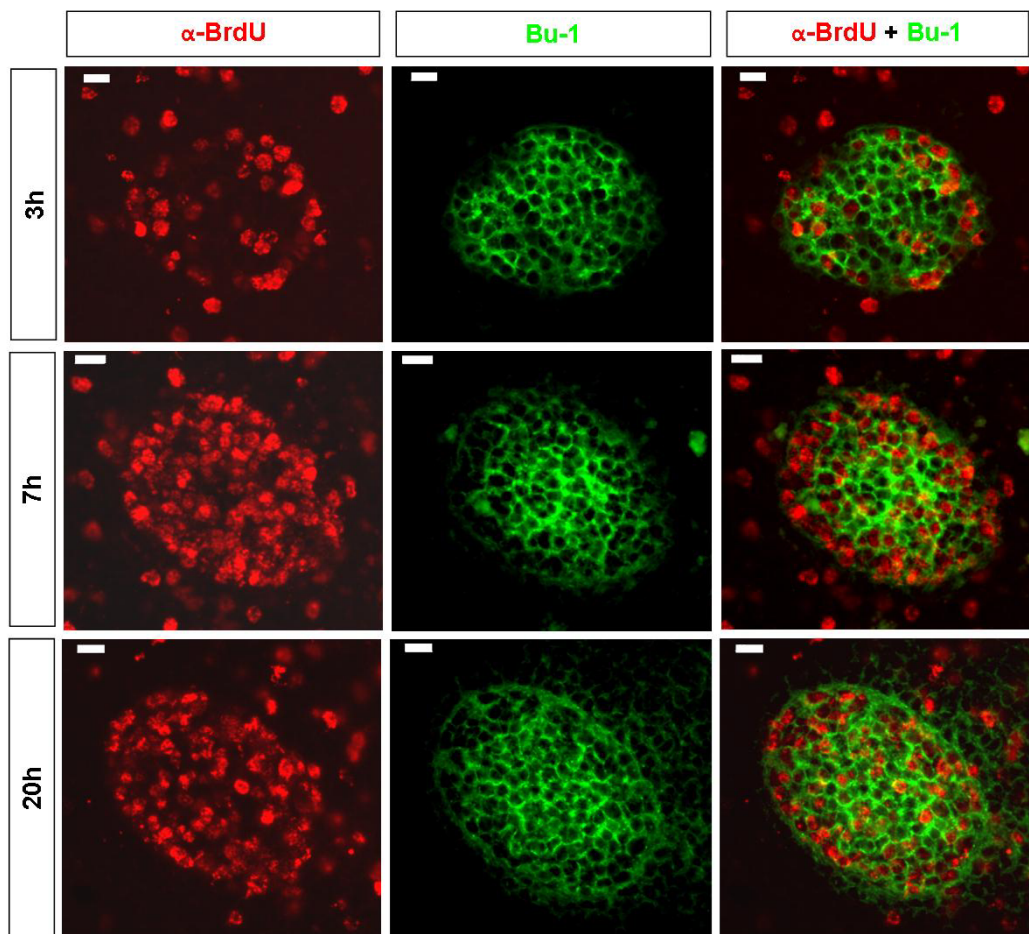
Da der Translokation von GC-B-Zellen eines Säugers zwischen der hellen und dunklen Zone des GCs von funktioneller Bedeutung für die GC-Reaktion ist, ist auch der Verbleib der GC-B-Zellen im Hühner-GC von Interesse.

Um die Proliferation in Hühner-GCs näher zu untersuchen wurden Hühner wie unter 4.2 beschrieben immunisiert um GCs zu induzieren. Den Tieren wurde dann sieben oder 14 Tage nach Immunisierung, einem Zeitintervall in dem mit spezifischen GCs zu rechnen ist (siehe 5.1.4), wie unter 4.3.2.1 dargelegt, BrdU

intraperitoneal injiziert. Drei, sieben und 20 Stunden nach BrdU-Applikation wurden die Milzen der Tiere entnommen und Gefrierschnitte immunhistologisch wie unter 4.4.4 erläutert angefärbt.

Abb. 37 zeigt eine Doppelfärbung gegen den B-Zellmarker Bu1a+b um die GCs kenntlich zu machen, sowie gegen während der Inkubationsdauer im Tier in Zellen in der S-Phase eingebautes BrdU. Eine Abbildung eines GCs zu den gewählten Zeitpunkten ist stellvertretend für die gemachten Beobachtungen dargestellt. Drei Stunden nach BrdU-Applikation befanden sich einige Zellen des GCs, hauptsächlich direkt unterhalb der GC-Kapsel in der S-Phase der Zellteilung und färbten sich entsprechend mit dem  $\alpha$ -BrdU-Antikörper an. Nach siebenstündiger BrdU-Inkorporationsphase im Tier war eingebautes BrdU in fast allen Zellen des GCs über den ganzen GC-Querschnitt vorhanden. Nach 20 stündiger BrdU-Inkorporationsphase stellte sich ein ähnliches Ergebnis dar. Zellen verteilt über den ganzen GC-Querschnitt zeigten BrdU-Inkorporation, allerdings fanden sich dazwischen auch viele Zellen im GC, die kein BrdU eingebaut hatten. Der äußerste GC-Bereich unter der Kapsel war nicht so prominent mit BrdU<sup>+</sup>-Zellen angefüllt wie dies drei und sieben Stunden nach BrdU-Applikation der Fall gewesen ist.

Ein Ring proliferierender Zellen unter der GC-Kapsel ist demnach nur nach dreistündiger BrdU-Inkorporationsphase zu beobachten. Nach längerer BrdU-Inkorporationsphase finden sich BrdU<sup>+</sup>-Zellen verteilt auf der ganzen GC-Anschnittsfläche.



**Abb. 37 BrdU-Inkorporation in GC-B-Zellen 3h, 7h und 20h nach Injektion**

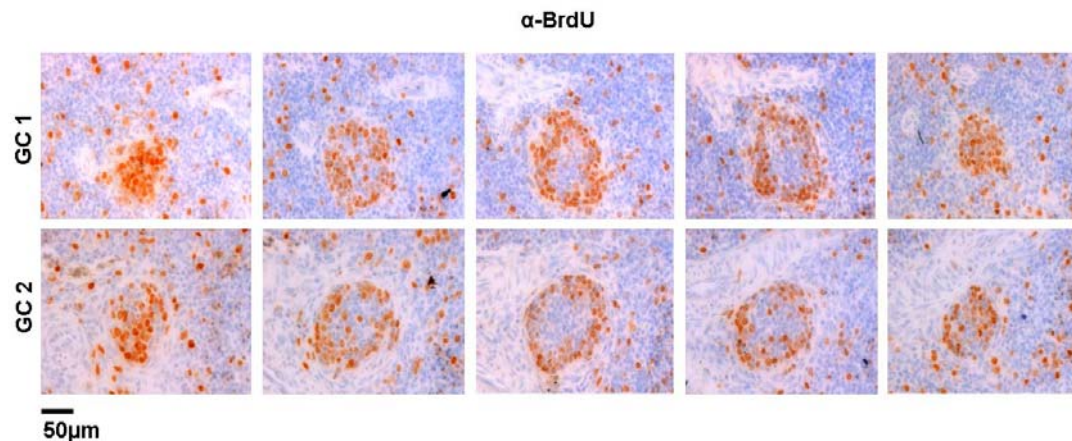
Milzgefrierschnitte von BrdU behandelten Hühnern (siehe 4.3.2.1) wurden mit einem Marker gegen BrdU inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (rot). B-Zellen wurden mit dem direktkonjugierten Marker  $\alpha$ -Bu1a+b detektiert (grün). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m.

Der nach dreistündiger BrdU-Inkorporationsphase in zweidimensionalen GC-Gewebeschnitten auftretende Ring proliferierender Zellen wirft die Frage auf, wie die untersuchte Struktur tatsächlich räumlich aussieht. Um die Verteilung der nach dreistündiger BrdU-Inkorporationsphase  $\text{BrdU}^+$ -GC-Zellen in dem tatsächlich kugelförmigen Hühner-GC zu untersuchen wurde inkorporiertes BrdU in Serienschnitten durch eine Hühnermilz eines Tieres nach dreistündiger BrdU-Inkorporationsphase, wie unter 4.4.3 erläutert, angefärbt. Aus den Präparaten wurden dann Fotoreihen mehrfach hintereinander angeschnittener GCs angefertigt.

Abb. 38 zeigt Serienschnitte durch zwei GCs. Die  $\text{BrdU}^+$ -Zellen drei Stunden

nach BrdU-Applikation befanden sich in den äusseren Bereichen des GCs unterhalb der Kapsel, während das GC-Zentrum sich frei von Zellen in der S-Phase darstellte.

Die Zone proliferierender Zellen die in Gewebeschnitten als ringförmige Struktur unter der GC-Kapsel drei Stunden nach BrdU-Gabe sichtbar wird umschloß das ganze GC-Zentrum wie eine Schale.



**Abb. 38** Serienschritte durch zwei GCs zeigen dass die stark proliferierenden B-Zellen das Zentrum der GCs schalenartig umschließen

Serienschritten durch eine Hühnermilz wurden mit einem Marker gegen BrdU inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit dem Vectorstain ABC-Kit ® und dem Vector DAB-Kit ® braun markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Dargestellt sind Fotoreihen zweier mehrfach hintereinander angeschnittener GCs. Vergrößerung 40x.

### 5.1.6.2 Zellbewegungen in GCs des Huhnes

Die intraperitoneale Injektion einer hohen BrdU-Dosis wie im vorausgegangenen Versuch durchgeführt führte zu einer lang anhaltenden Verfügbarkeit des Proliferationsmarkers im Organismus. Da sich die Verteilung BrdU<sup>+</sup>-Zellen im Hühner-GC drei und sieben Stunden nach hochdosierter BrdU-Applikation (siehe 4.3.2.1) deutlich unterschiedlich darstellte ergab sich die Frage, ob die nach sieben Stunden im Zentrum des GCs vorhandenen BrdU<sup>+</sup> Zellen langsamer proliferieren als jene in der Peripherie, oder ob dieses Bild durch Wanderung proliferierender Zellen innerhalb des GCs entsteht. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde immunisierten Hühnern sieben Tage nach Immunisierung 10mg/kg BrdU intravenös injiziert (siehe 4.3.2.2). Bei dieser Dosis konnte nach drei Stunden Inkorporationsphase noch ein dem in 5.1.6.1 beschriebenen Versuchsergebnis entsprechendes Bild der BrdU-Inkorporation in GC-B-Zellen

beobachtet werden (siehe Abb. 39 B). Die geringe Dosis wurde gewählt um die Halbwertszeit des BrdUs im Körper zu minimieren. Um sicherzugehen, dass jede weitere Einlagerung von BrdU nach einer dreistündigen BrdU-Inkorporationsphase verhindert wurde, wurde den Versuchstieren die im Vergleich zum applizierten BrdU 150fache Menge Thymidin in zweistündigem Abstand drei Mal injiziert (siehe 4.3.2.3). Das applizierte BrdU-Analog Thymidin hemmt den Einbau von BrdU in die Zell-DNA kompetitiv verhindert. Acht Stunden nach der initialen BrdU-Injektion und fünf Stunden nach der Hemmung der weiteren BrdU-Inkorporation wurden die Milzen der Tiere immunhistologisch untersucht. Dazu wurden BrdU<sup>+</sup>-Zellen in Milzgefrierschnitten wie unter 4.4.4 beschrieben angefärbt.

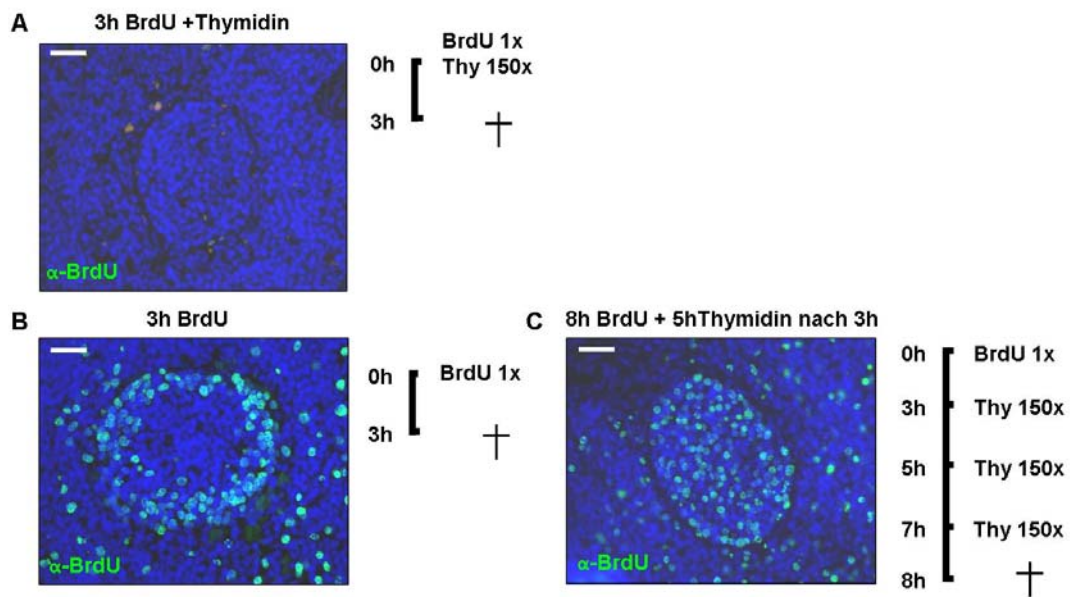
Abb. 39 zeigt, dass in Kontrolltieren denen BrdU und Thymidin in 150fachem Überschuss zeitgleich injiziert wurde nach drei Stunden keine Einlagerung von BrdU in GC-B-Zellen erfolgt war (Abb. 39 A). Hühner die nur BrdU intravenös erhalten hatten zeigten die nach dreistündiger BrdU-Inkorporationsphase typische Lokalisation BrdU<sup>+</sup>-Zellen in einem Ring am äußeren Rand des GCs unterhalb der Kapsel (Abb. 39 B).

GCs in der Milz von Hühnern, die ab dem Zeitpunkt drei Stunden nach initialer BrdU-Gabe im Zweistundenrhythmus Thymidin im 150fachen Überschuss erhielten, zeigten ein anderes Verteilungsmuster BrdU<sup>+</sup>-Zellen. Die BrdU<sup>+</sup>-Zellen waren über den ganzen GC-Anschnitt verteilt, wobei auffiel, dass die drei Stunden nach BrdU-Injektion mit BrdU<sup>+</sup>-Zellen angefüllte Zellschicht unterhalb der Kapsel nun nur noch zum Teil von solchen Zellen besiedelt war, während nun auch im GC-Zentrum BrdU<sup>+</sup>-Zellen vorhanden waren. Pro Versuchsgruppe wurden je zwei Hühner untersucht. Von der Milz dieser Tiere wurden je zehn Milzschnitte im Abstand von 300µm angefärbt und alle darin enthaltenen GCs beurteilt. Die beschriebene Verteilung der B-Zellen wurde in allen Schnitten beobachtet. In Abb. 39 sind Fotos eines repräsentativen GCs pro Versuchsgruppe dargestellt.

Die Zellen in S-Phase die innerhalb der ersten drei Stunden nach BrdU-Gabe unter der Kapsel des GCs lokalisiert waren wanderten somit zumindest zum Teil innerhalb der nächsten fünf Stunden in das FDC-reiche GC-Zentrum in die



postulierte helle Zone des Hühner-GCs.



**Abb. 39** BrdU-markierte GC-B-Zellen wandern von der Peripherie ins GC-Zentrum

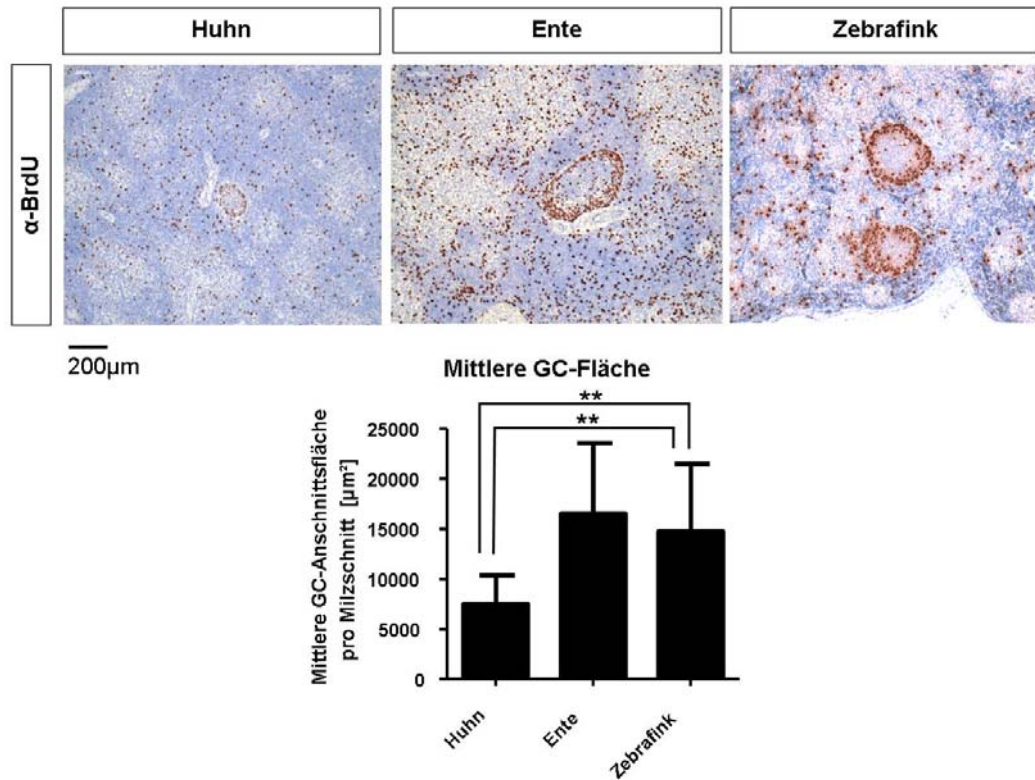
Milzgefrierschnitte wurden mit einem Marker gegen BrdU inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x, Balken = 50µm. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung eines GCs drei Stunden nach Applikation der Tiere die BrdU und Thymidin zeitgleich erhielten (A) und der Tiere die lediglich BrdU erhielten (B). Weiterhin gezeigt ist ein repräsentatives GC von mit BrdU und drei Stunden später dreimalig im Zweistundenrhythmus mit Thymidin behandelten Tieren (C). Die Milzen dieser Tiere wurden acht Stunden nach der initialen BrdU-Gabe und fünf Stunden nach dem Einsetzen des Thymidinblocks untersucht.

### 5.1.6.3 Zellproliferation in GCs weiterer Vogelarten

Um zu prüfen ob die unter 5.1.1 beschriebene morphologische Ähnlichkeit von GCs in der Milz von Hühnern, Enten und Zebrafinken auch für die Verteilung proliferierender Zellen im GC gilt, wurden immunisierte Hühner und Zebrafinken sowie unbehandelte Enten untersucht. Die Tiere wurden wie unter 4.3 beschrieben mit BrdU behandelt. Drei Stunden nach BrdU-Gabe wurden die Milzen der Tiere entnommen und immunhistologisch untersucht (siehe 4.4.3). Inkorporiertes BrdU wurde angefärbt.

Abb. 40 zeigt repräsentative Abbildungen von GCs aus der jeweiligen Tierart. Bei den Vertretern aller drei Vogelarten zeigt sich drei Stunden nach BrdU-Applikation ein Ring proliferierender Zellen unter der GC-Kapsel. In Abb. 40 ist weiterhin dargestellt, dass die mittlere Fläche der in den Tieren vorhandenen GC-Anschnitte bei den Hühnern etwa nur halb so groß ist wie bei Fink und Ente (siehe 4.4.6).

Demnach weisen neben Hühner-GCs auch Enten- und Zebrafinken-GCs eine Zonierung in eine innere helle Zone (im GC-Zentrum) und äussere dunkle Zone (GC-Peripherie unter der Kapsel) auf. Hühner-GCs sind jedoch deutlich kleiner als Enten- und Zebrafinken-GCs.



**Abb. 40 Vergleichbare Zellproliferationszonen bei stark abweichender Größe der GCs aus der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink**

Gefrierschnitte von Hühnermilzen und Entenmilzen sowie Paraffinschnitte von Zebrafinkenmilzen wurden mit einem Marker für BrdU inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit dem Vectorstain ABC-Kit<sup>®</sup> und dem Vector DAB-Kit<sup>®</sup> braun markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers's Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 10x. Die mittlere GC-Fläche aller GCs in je einem Milzschnitt von Ente, Huhn und Zebrafink ist dargestellt, n=9 (Ente), n= 17 (Zebrafink) und n=13 (Huhn) GC-Anschnitte im Milzschnitt wurden gemessen. Gezeigt sind mittlere GC-Fläche und Standardabweichung der Flächen in einem Schnitt gefundener GCs. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Student's t-test; \*\*p $\leq$ 0,01.

## **5.2 Charakterisierung der humoralen Immunantwort chBAFF-überexprimierender und chBAFF-defizienter Hühner nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen**

Die Untersuchung des Einflusses des Zytokins chBAFF auf antigenaktivierte Hühner-B-Zellen im Rahmen dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Anbildung antigenspezifischer GCs nach einer Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen. Dies geschah mit dem Hintergrund, dass für Hühner-B-Zellen keine Zellmarker für die Entwicklung einer reifen B-Zelle zur Gedächtniszelle oder Plasmazelle definiert sind. B-Zellen innerhalb von GCs, sowie antigenspezifische GC-B-Zellen sind jedoch immunhistologisch gut anzusprechen (siehe 5.1). Ergänzend wurde die Aktivität der gebildeten immunglobulinproduzierenden Plasmazellen indirekt über die Messung antigenspezifischer Antikörperspiegel im Blut bestimmt.

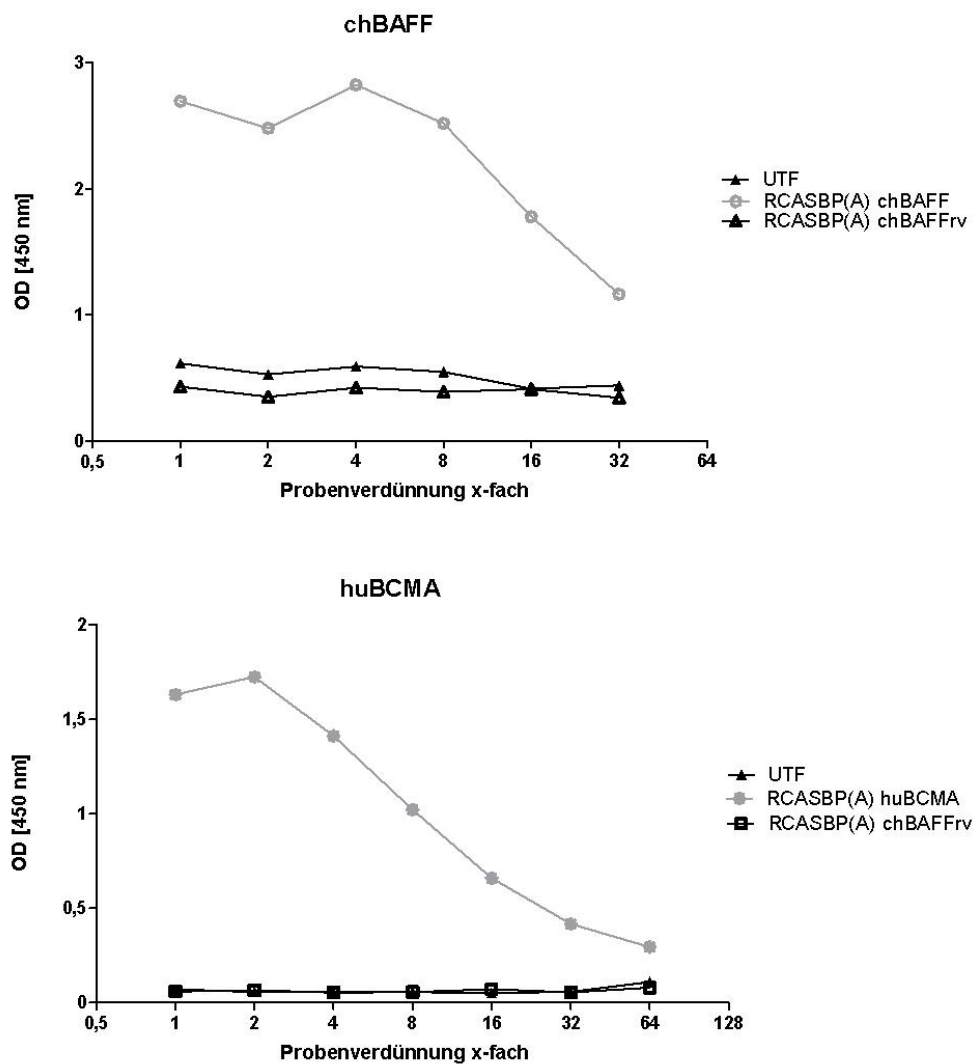
### **5.2.1 Generierung der chBAFF- und huBCMA-transduzierter Hühner**

Zur Untersuchung des Einflusses des Zytokins chBAFF auf die Entwicklung antigenaktivierter B-Zellen über GC-B-Zellen zu Effektorzellen wurden mit Hilfe des retroviralen Vektorsystems RCAS Hühner generiert, die chBAFF oder den BAFF-Rezeptor huBCMA überexprimierten.

Zum Einen wurde der Einfluß erhöhter chBAFF-Konzentrationen im Körper der Hühner auf die Anbildung antigenspezifischer GCs untersucht. Zum Anderen wurde die Entwicklung antigenspezifischer GC-B-Zellen in Hühnern untersucht, deren chBAFF-Spiegel durch Überexpression des Dekoy-Rezeptors huBCMA drastisch reduziert waren. Die Generierung dieser Hühner erfolgte wie unter 4.7 beschrieben. HuBCMA bindet an chBAFF aufgrund der hohen Homologie des Hühnerproteins zu dem BAFF-Protein des Menschen. Durch die Überexpression von huBCMA wird das zur Verfügung stehende chBAFF reduziert [130].

Als Kontrolle dienten Tiere, die mit dem Konstrukt RCASBP(A)-chBAFFrv transduziert waren (siehe 4.7). Bei RCASBP(A)-chBAFFrv kommt es aufgrund der reversen Insertion der chBAFF-Sequenz in den RCAS Vektor zu keiner Expression des chBAFF-Proteins. Die erfolgreiche Transfektion und

nachfolgende Infektion der zur Injektion in Hühnereier verwendeten Zellen mit den RCASBP(A) chBAFF- und RCASBP(A) huBCMA- Konstrukten wurde anhand von ELISA-Systemen zum Nachweis von chBAFF und huBCMA getestet (siehe 4.6.2.2 und 4.6.2.3). In Abb. 41 sind die Ergebnisse der ELISA der Zellkulturüberstände der in den zwei beschriebenen Versuchen zur Injektion verwendeten Zellen dargestellt. Die erfolgreiche Infektion der Zellen konnte im ELISA bestätigt werden.



**Abb. 41 Expressionskontrolle der transfizierten Zellkulturüberstände im ELISA**  
HEFs wurden mit RCASBP(A) chBAFF, RCASBP(A) chBAFFrv und RCASBP(A) huBCMA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf den Gehalt an chBAFF (oben) bzw. huBCMA (unten) getestet (siehe 4.6). Der Zellkulturüberstand untransfizierter Zellen (UTF) diente als Kontrolle.

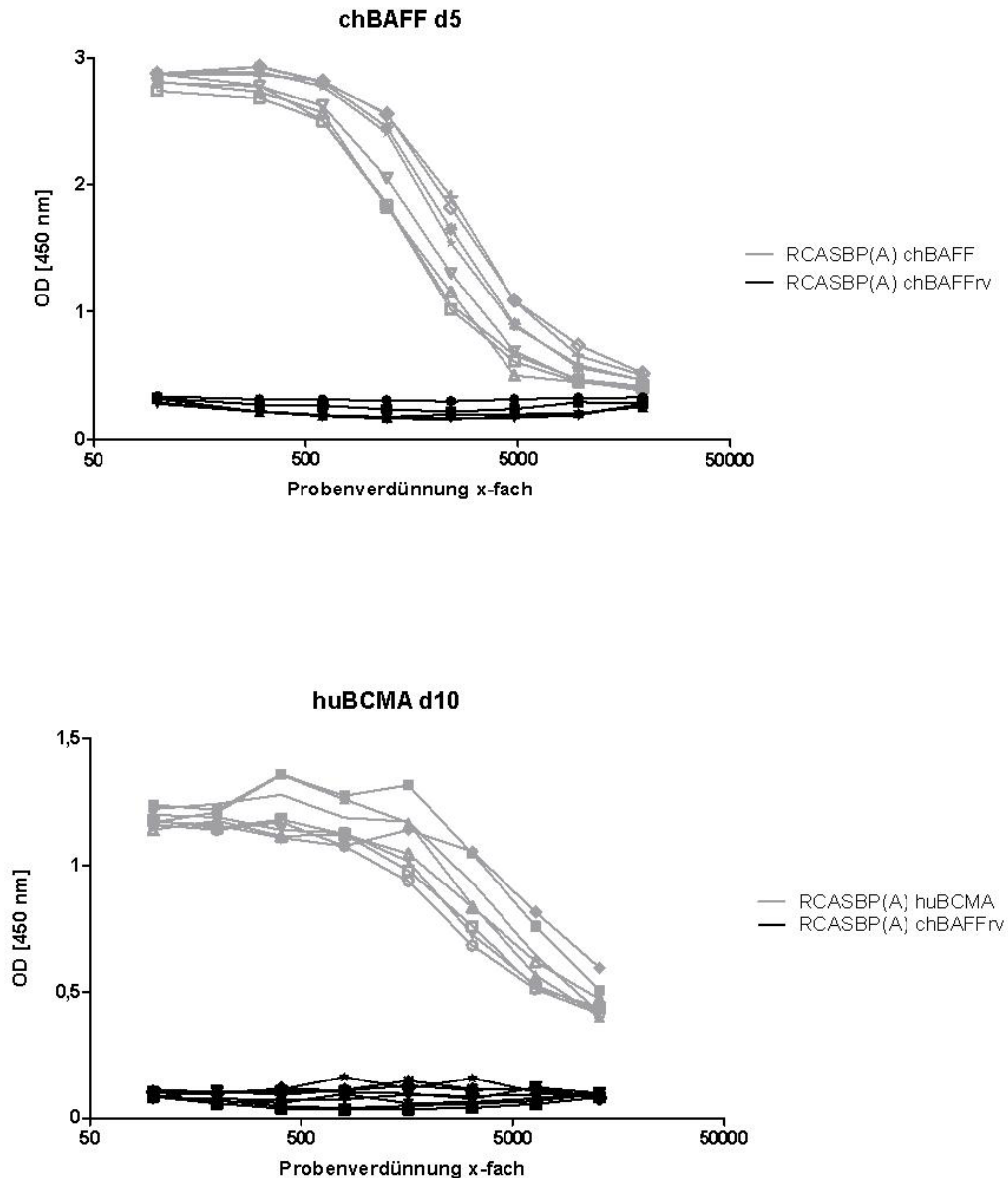
Transfizierte HEF wurden in embryonierte Eier injiziert (siehe 4.7.4). Die Hühnereier wurden nach der Transduktion mit den verschiedenen RCAS-Konstrukten konventionell bis zum Schlupf weiter bebrütet und die Tiere bis zum Versuchsalter von fünf Wochen aufgezogen.

## **5.2.2 Kontrolle der chBAFF- und huBCMA-Expressionsspiegel und des Phänotyps der für die Immunisierungsversuche verwendeten Hühner**

Die geschlüpften Küken wurden in den ersten beiden Lebenswochen hinsichtlich der Expression von chBAFF bzw. huBCMA untersucht. Da aus Arbeiten von Kothlow et al. bekannt ist [140], dass die Überexpression von chBAFF bzw. huBCMA im Huhn die Größe des Pools peripherer B-Zellen positiv bzw. negativ beeinflusst, wurden weiterhin die absoluten peripheren B-Zellzahlen im Blut bestimmt.

### **5.2.2.1 ChBAFF- und huBCMA-Spiegel im Blut**

In Abb. 42 sind die Ergebnisse der jeweiligen ELISA der für die Immunisierungsversuche verwendeten Hühner sowie der Kontrollgruppen dargestellt (siehe 4.6). Alle mit RCASBP(A) chBAFF bzw. RCASBP(A) huBCMA behandelten Küken zeigten eine deutliche Expression des jeweiligen Proteins im Blut, während die Ergebnisse der mit RCASBP(A) chBAFFrv behandelten Kontrollgruppen aus den beiden Versuchen jeweils negativ waren.



**Abb. 42 Analyse der Expression von chBAFF und huBCMA der zur Immunisierung verwendeten Tiere**

ChBAFF- und huBCMA-Gehalte in Plasmaproben der mit RCAS-Vektoren behandelten Tiere wurden mit den unter 4.6 beschriebenen ELISA-Systemen innerhalb der ersten beiden Wochen nach dem Schlupf bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse der Einzeltiere die für Immunisierungsversuche verwendet wurden.

### 5.2.2.2 Absolute B-Zellzahlen im Blut

Um zu überprüfen ob die nachgewiesene chBAFF- und huBCMA-Expression der untersuchten Hühnerküken mit einem entsprechend veränderten peripheren B-Zellpool einhergingen, wurde die absolute Zahl peripherer B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut

durchflusszytometrisch nach der Methode von Seeliger et al. bestimmt (siehe 4.5.1).

In Abb. 43 sind die Ergebnisse dieser Messungen der für die beiden Versuche generierten Hühner inklusive der jeweiligen Kontrollgruppen dargestellt.

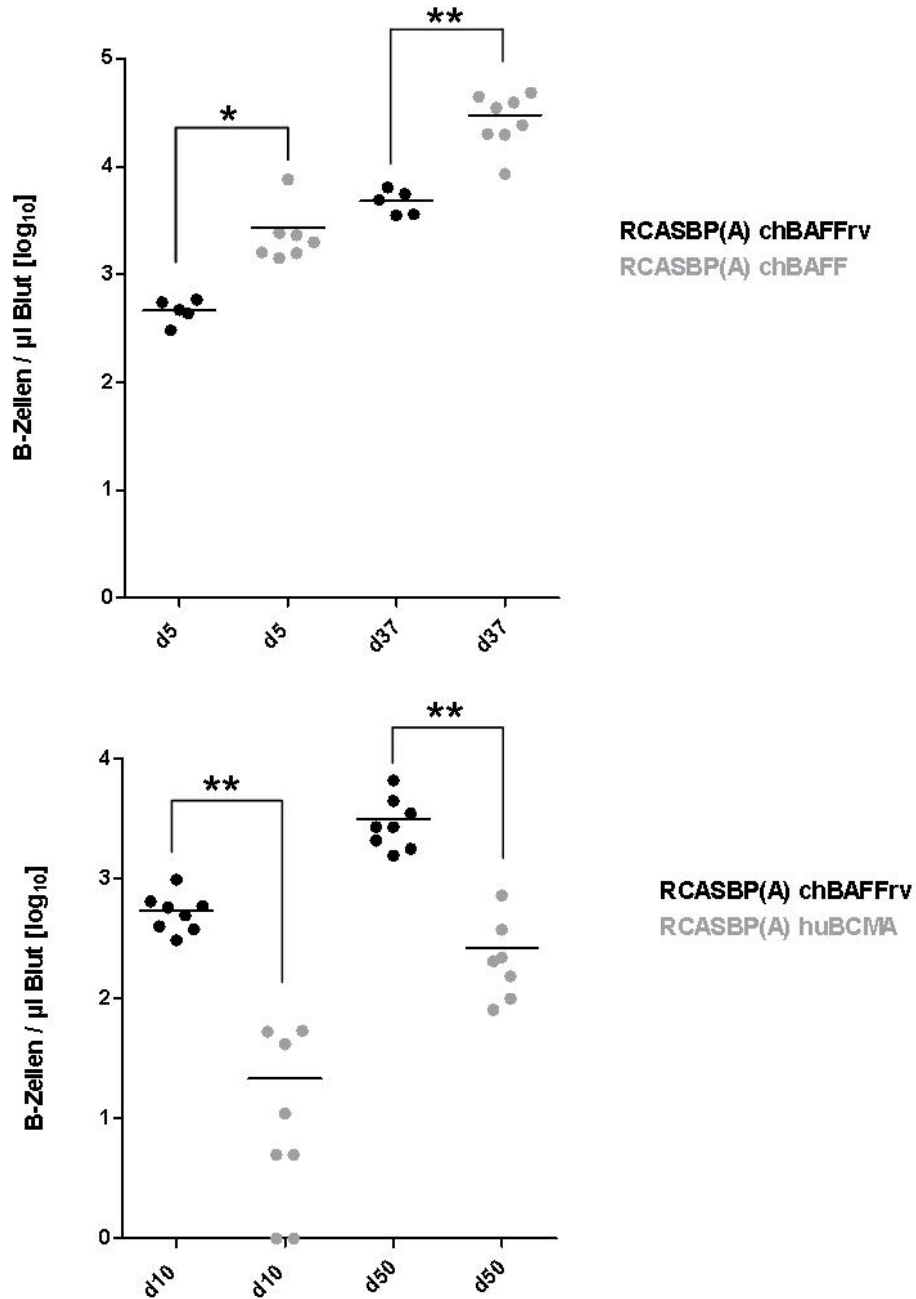
Bei Tieren der Kontrollgruppe (RCASBP(A) chBAFFrv) lag die B-Zellzahl am fünften Lebenstag bei durchschnittlich bei gut 450 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut (Abb. 43 oben). Diejenige der chBAFF überexprimierenden Tiere (RCASBP(A) chBAFF) betrug im Durchschnitt mehr als 2500 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut. Die Zahl im Blut vorhandener peripherer B-Zellen in den chBAFF-überexprimierenden Tieren war somit in der ersten Lebenswoche um das 5,8fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Am 37. Lebenstag wiesen die Tiere der Kontrollgruppe im Mittel etwa 4800 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut auf, während die periphere B-Zellzahl der chBAFF-überexprimierenden Hühner bei zirka 30000 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut lag. Dies entspricht einer 6,2 fachen Erhöhung der im Blut vorhandenen B-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe in der chBAFF-überexprimierenden Gruppe. Somit blieb in diesem Versuch das Verhältnis der im Blut vorhandenen B-Zellzahl zwischen chBAFF-überexprimierenden und Kontrolltieren von der ersten bis zur sechsten. Lebenswoche weitgehend konstant.

In Abb. 43 unten ist dargestellt, dass die B-Zellzahl der huBCMA überexprimierenden Tiere (RCASBP(A) huBCMA) am zehnten Lebenstag im Durchschnitt nur zirka 20 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut betrug. Diejenige der Kontrollgruppe hingegen (RCASBP(A) chBAFFrv) lag am zehnten Lebenstag bei durchschnittlich 550 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut. Die Zahl im Blut vorhandener B-Zellen in den huBCMA-überexprimierenden Tieren war somit in der zweiten Lebenswoche um das 25,8 fache gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt.

Am 50. Lebenstag wiesen die Tiere der Kontrollgruppe im Mittel gut 3000 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut auf, während die B-Zellzahl der huBCMA-überexprimierenden Hühner bei im Durchschnitt zirka 250 B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut lag. Dies entsprach noch einer 12 fachen Erniedrigung der im Blut vorhandenen B-Zellen in der achten Lebenswoche gegenüber der Kontrollgruppe. Somit sank in diesem

Versuch das Verhältnis der im Blut vorhandenen B-Zellzahl zwischen huBCMA-überexprimierenden und Kontrolltieren von der zweiten bis zur achten Lebenswoche auf etwa die Hälfte.



**Abb. 43** Veränderung der Größe des peripher im Blut vorhandenen B-Zellpools durch die Überexpression von chBAFF und huBCMA

Die absolute Zahl im Blut vorhandener B-Zellen wurde mit der von Seeliger et al. beschriebenen durchflusszytometrischen Methode (siehe 4.5.1) bestimmt. Abgebildet sind als Punkte die B-Zellzahlen/μl Blut der Einzeltiere, welche chBAFF (oben) bzw. huBCMA (unten) überexprimieren. Die Mittelwerte der Gruppen sind als Linien eingezeichnet. Die Untersuchungen wurden am fünften und 37. (oben) sowie am zehnten und 50. Lebenstag (unten) durchgeführt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test; \*p < 0,05 bzw. \*\*p < 0,01; n ≥ 5.

Somit waren über den untersuchten Zeitraum die Unterschiede in der B-Zellzahl

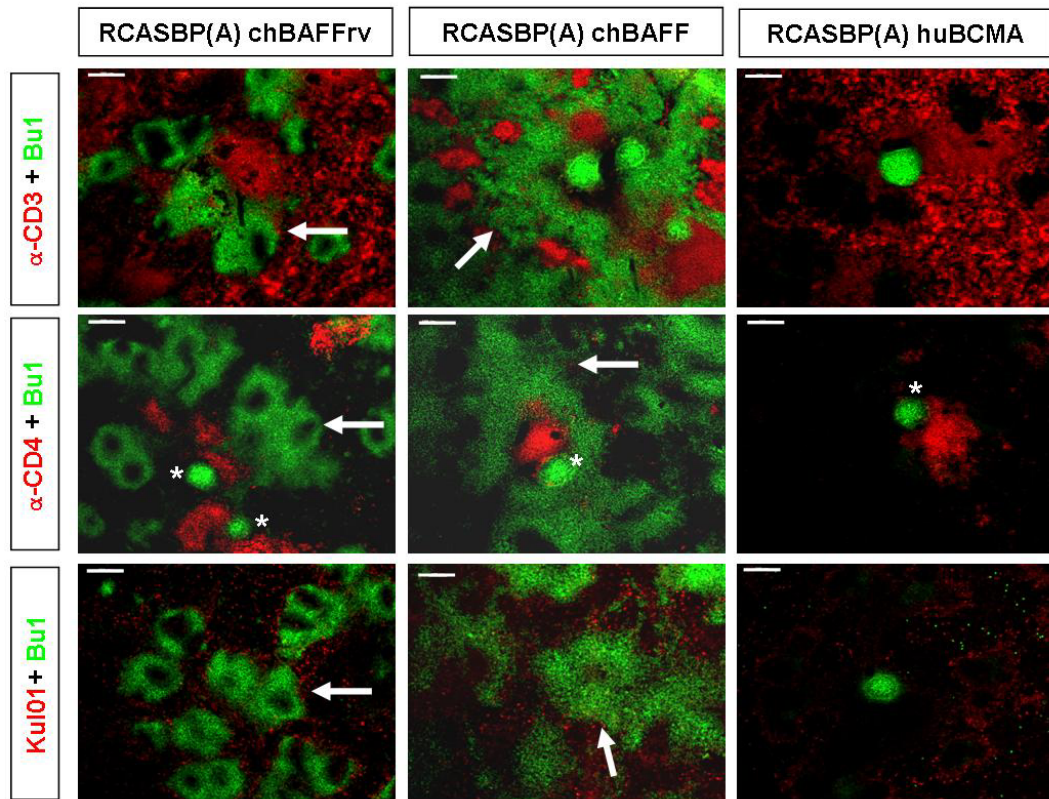


pro  $\mu\text{l}$  Blut zwischen chBAFF-überexprimierenden und Kontrolltieren sowie huBCMA-überexprimierenden und Kontrolltieren signifikant verändert waren. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsversuche wurden nur Tiere mit hohen Expressionsspiegeln für chBAFF und huBCMA im Blut verwendet, die zudem in den ersten beiden Lebenswochen einen entsprechend veränderten Pool peripherer B-Zellen aufwiesen.

### 5.2.3 Aufbau der B-Zellregionen in der Milz chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner

Die Überexpression von chBAFF bzw. huBCMA im Huhn führt dazu, dass der prozentuale Anteil von B-Zellen an der Gesamtzellzahl der Milz um ein Vielfaches ansteigt (chBAFF-Überexpression) bzw. hochgradig reduziert ist (huBCMA-Überexpression) [140]. Um die Lokalisation der in den jeweiligen Tieren vorhandenen B-Zellen in der Milz zu definieren wurden die B-Zellareale der Milzen immunhistologisch untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte der Milzen mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha\text{-Bu1a+b}$  (grün) und Markern gegen  $\text{CD3}^+$ -T-Zellen,  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen und  $\text{Kul01}^+$ -Myeloide Zellen/Makrophagen angefärbt (rot) (siehe 4.4.4).

Abb. 44 zeigt, dass die B-Zellareale (Pfeil) in chBAFF-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vergrößert sind. HuBCMA-überexprimierende Hühner weisen hingegen fast keine B-Zellen in jenen Regionen auf, die der periellipsoidalen Pulpa entsprechen. Jedoch wird deutlich, dass in allen Gruppen GCs (Stern) innerhalb der Milz zu finden sind und dass diese in allen Fällen innerhalb eines Bereiches mit vielen  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen gelegen sind, dem PALS. Die periellipsoidale weiße Pulpa der Hühnermilz wird in Kontrolltieren durch eine äussere Schicht  $\text{Kul01}^+$ - Makrophagen begrenzt. Diese Makrophagen sind auch in den Milzen chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner vorhanden.

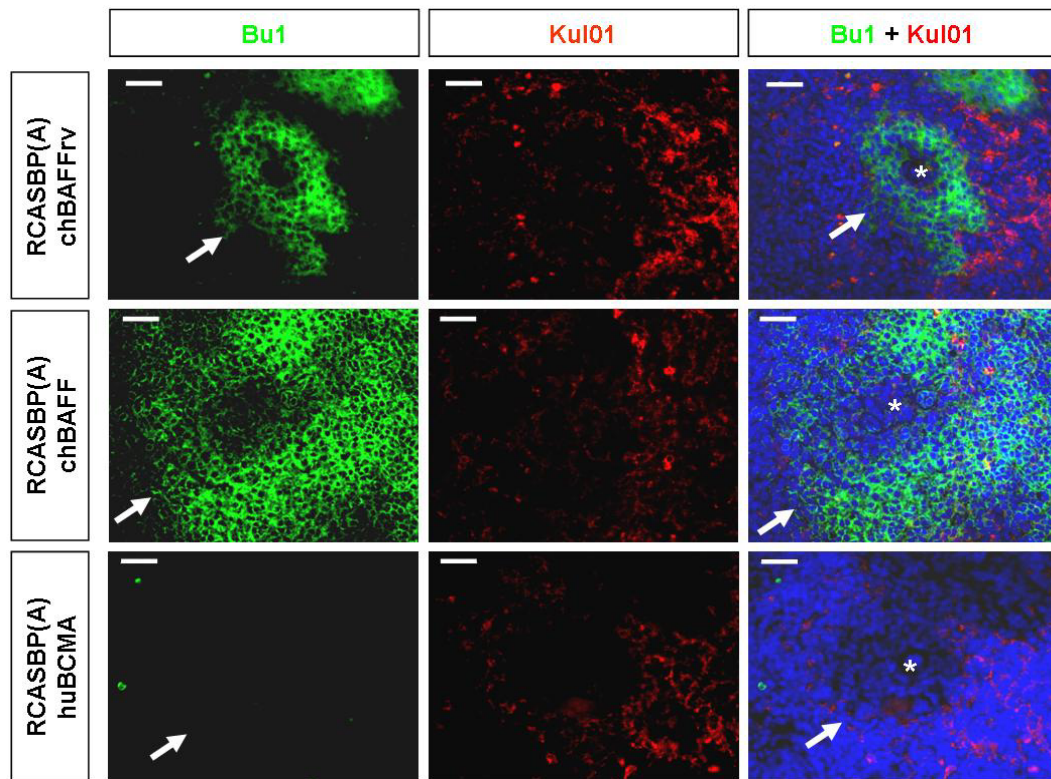


**Abb. 44** Veränderte Größe der B-Zellregionen in der Milz chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner

Gefrierschnitte von Milzen chBAFF-überexprimierender (RCASBP(A) chBAFF), und chBAFF-defizienter (RCASBP(A) huBCMA) und Kontrolltiere (RCASBP(A) chBAFFrv) wurden mit Markern für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (rot,  $\alpha$ -CD4), CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (rot,  $\alpha$ -CD3) und Kul01<sup>+</sup>-Myeloide Zellen und Makrophagen (rot, Kul01) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Im Anschluß wurde ein direktkonjugierter B-Zellmarker (grün,  $\alpha$ -Bu1a+b) auf den Schnitten inkubiert.

Vergrößerung 10x; Balken = 200 $\mu$ m; Pfeil = Periellipsoidale Weiße Pulpa; Stern = GC. Die Fotos stehen stellvertretend für zwei untersuchte Tiere je Gruppe.

Abb. 45 zeigt die periellipsoidale weiße Pulpa in einer stärkeren Vergrößerung. Es wird deutlich, dass die Kul01<sup>+</sup>-Myeloiden Zellen/Makrophagen, die die B-Zellareale (Pfeil), mit der zentralen Kapillare (Stern), umgeben auch in chBAFF-überexprimierenden und huBCMA-überexprimierenden Hühnern in gleicher Lokalisation vorhanden sind. In chBAFF-überexprimierenden Tieren scheinen die B-Zellen diese Abgrenzung jedoch zu durchbrechen und sich auch außerhalb davon anzusammeln. Dagegen erscheint die periellipsoidale weiße Pulpa der huBCMA-überexprimierenden Tiere annähernd frei von B-Zellen.



**Abb. 45 Vergleich der periellipsoidalen weißen Pulpa chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner**

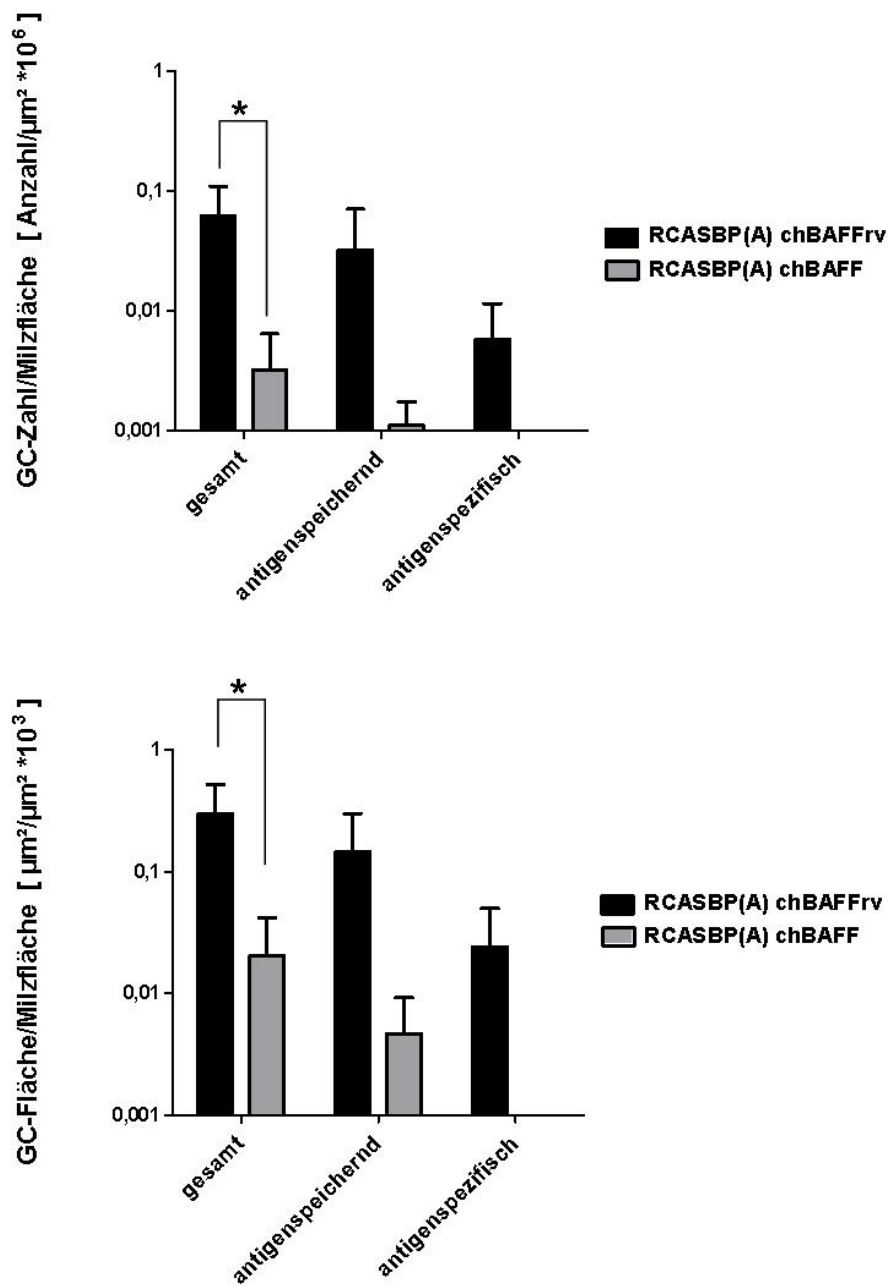
Gefrierschnitte einer Hühnermilz wurden mit einem Marker für Kul01<sup>+</sup>-Myeloide Zellen und Makrophagen (rot, Kul01) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Im Anschluß wurde ein direktkonjugierter B-Zellmarker (grün,  $\alpha$ -Bu1a+b) auf den Schnitten inkubiert. Vergrößerung 40x; Balken = 50 $\mu$ m; Pfeil = periellipsoidale weiße Pulpa; Stern = Kapillare im Zentrum des Ellipsoids. Die Fotos stehen stellvertretend für zwei untersuchte Tiere je Gruppe.

#### 5.2.4 Anbildung antigenspezifischer GCs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Um den Einfluss von chBAFF auf die Anbildung von GCs zu untersuchen, wurden die unter 5.2.2 beschriebenen chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühner sowie Kontrolltiere immunisiert (siehe 4.2.2.2.1). 14 Tage nach Immunisierung, einem Zeitpunkt an dem mit dem Auftreten antigenspezifischer GCs zu rechnen ist (siehe 5.1.4.2.2.2), wurden die Milzen der Tiere immunhistologisch untersucht. Die Zahl vorhandener GCs sowie die Gesamtfläche vorhandener GCs pro untersuchte Milzfläche wurde bestimmt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)].

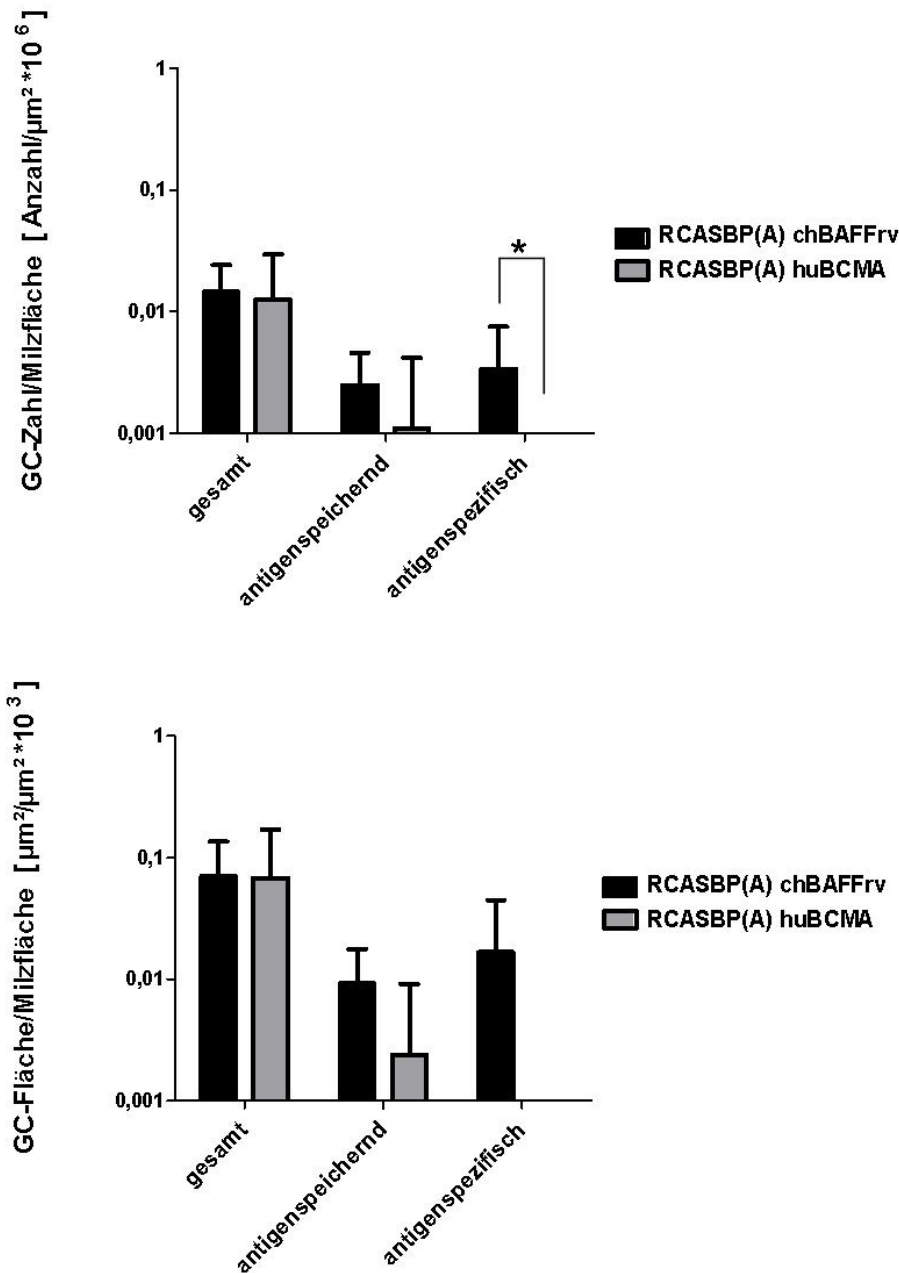
Abb. 46 zeigt die Quantifizierung von GCs 14 Tage nach Immunisierung in Tieren, die chBAFF überexprimierten. Die Anzahl und Fläche von GCs pro untersuchte Milzfläche wurde bestimmt. Es zeigte sich, dass die untersuchten Milzanschnitte mit RCASBP(A) chBAFF behandelte Hühner signifikant weniger Anschnitte von GCs aufwiesen als die in gleicher Weise untersuchten Kontrolltiere (gesamt). Auch die Zahl von GCs mit Antigenablagerungen im Zentrum des GCs (antigenspeichernd) war deutlich geringer als in den Kontrolltieren. Desgleichen war die Fläche der insgesamt gefundenen GC-Anschnitte und der antigenspeichernden GCs in chBAFF-überexprimierenden Tieren gegenüber der Kontrolle reduziert. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren traten in den untersuchten Milzanschnitten der chBAFF-überexprimierenden Hühner keine für das Antigen spezifischen GCs auf (antigenspezifisch).

In Abb. 47 ist die Quantifizierung von GCs 14 Tage nach Immunisierung in huBCMA-überexprimierenden Hühnern dargestellt. Die mit RCASBP(A) huBCMA behandelten Hühner wiesen im Vergleich mit den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von GCs auf. Die summierte Fläche der Gesamt-GCs in der untersuchten Milzfläche war ebenfalls nicht signifikant verschieden. Auch in der untersuchten Milzfläche der huBCMA-überexprimierenden Hühner trat kein Anschnitt eines für das Immunisierungsantigen spezifischen GCs auf, während dies in den Kontrolltieren, wie 14 Tage nach Immunisierung zu erwarten, der Fall war. Die Zahl und summierte Fläche gefundener antigenspeichernder GCs war in den huBCMA-überexprimierenden Tieren ebenfalls verringert.



**Abb. 46** Anbildung antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen antigen in chBAFF-überexprimierenden Tieren

Oben: In 5 Milzgefrierschnitten mit 300 $\mu\text{m}$  Abstand von immunisierten Hühnern wurden die Gesamt-GC-Zahl, die Zahl für das Immunisierungsantigen spezifischer GCs und die Zahl antigenspeichernder GCs pro untersuchte Milzfläche 14 Tage nach Immunisierung bestimmt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Unten: In 5 Milzgefrierschnitten mit 300 $\mu\text{m}$  Abstand von immunisierten Hühnern wurden die Gesamt-GC-Fläche, die Fläche für das Immunisierungsantigen spezifischer GCs und die Fläche antigenspeichernder GCs pro untersuchte Milzfläche 14 Tage nach Immunisierung bestimmt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung;  $n \geq 5$  Tiere pro Gruppe; Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test;  $*p < 0,05$ .



**Abb. 47** Anbildung antigenspezifischer GCs nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen in huBCMA-überexprimierenden Tieren

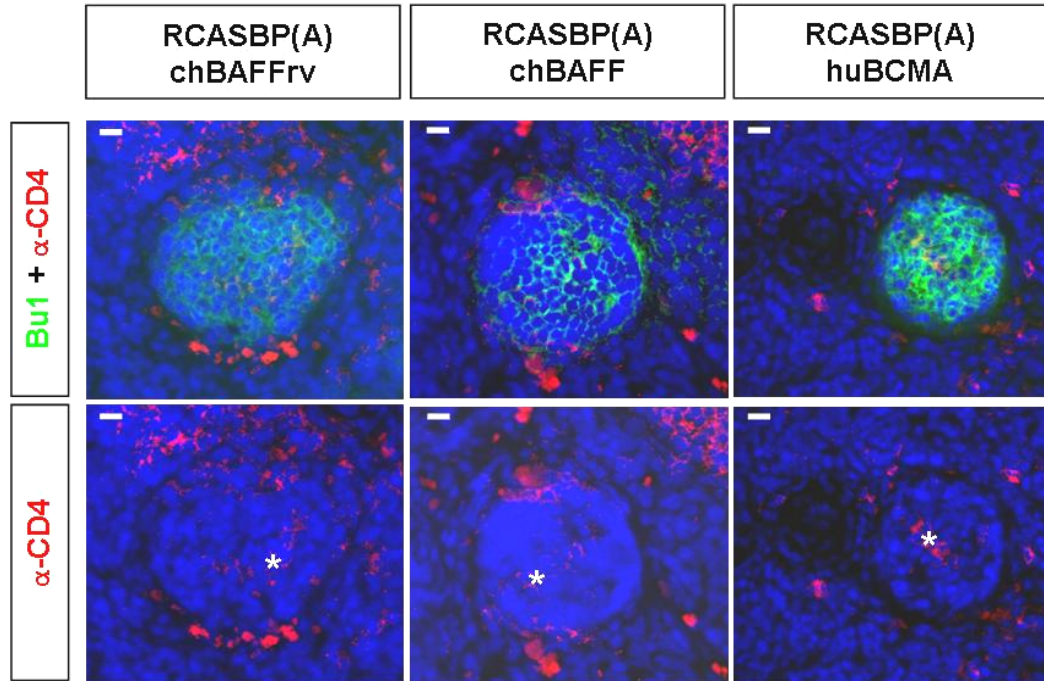
Oben: In 5 Milzgefrierschnitten mit 300μm Abstand von immunisierten Hühnern wurden die Gesamt-GC-Zahl, die Zahl für das Immunisationsantigen spezifischer GCs und die Zahl antigenspeichernder GCs pro untersuchte Milzfläche 14 Tage nach Immunisierung festgestellt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Unten: In 5 Milzgefrierschnitten mit 300μm Abstand von immunisierten Hühnern wurden die Gesamt-GC-Fläche, die Fläche für das Immunisationsantigen spezifischer GCs und die Fläche antigenspeichernder GCs pro untersuchte Milzfläche 14 Tage nach Immunisierung festgestellt [siehe 4.4.5 (Färbung) und 4.4.6 (Auswertung)]. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung; n≥5; Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test; \*p≤0,05.

Tiere die chBAFF durch Überexpression mit dem RCAS-Vektorsystem im Überschuß im Körper zur Verfügung hatten zeigten folglich mit dieser Untersuchungsmethode signifikant weniger GCs in Milzanschnitten. Auch die Zahl jener GCs, die das Immunisierungsantigen im Zentrum speicherten, war deutlich verringert. Antigen-spezifische GCs wurden mit dieser Untersuchungsmethode 14 Tage nach Immunisierung nicht nachgewiesen. Tiere die durch die Überexpression des chBAFF bindenden Dekoy-Rezeptors huBCMA funktionell verringertes chBAFF-Spiegel im Körper aufwiesen zeigten keine signifikant unterschiedlichen Gesamt-GC-Zahlen und Gesamt-GC-Flächen in den untersuchten Milzarealen. Antigen-spezifische GCs konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Gesamt-Zahl und -Fläche antigenspeichernder GCs war geringgradig reduziert gegenüber der Kontrollgruppe.

### **5.2.5 Morphologie von GCs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern**

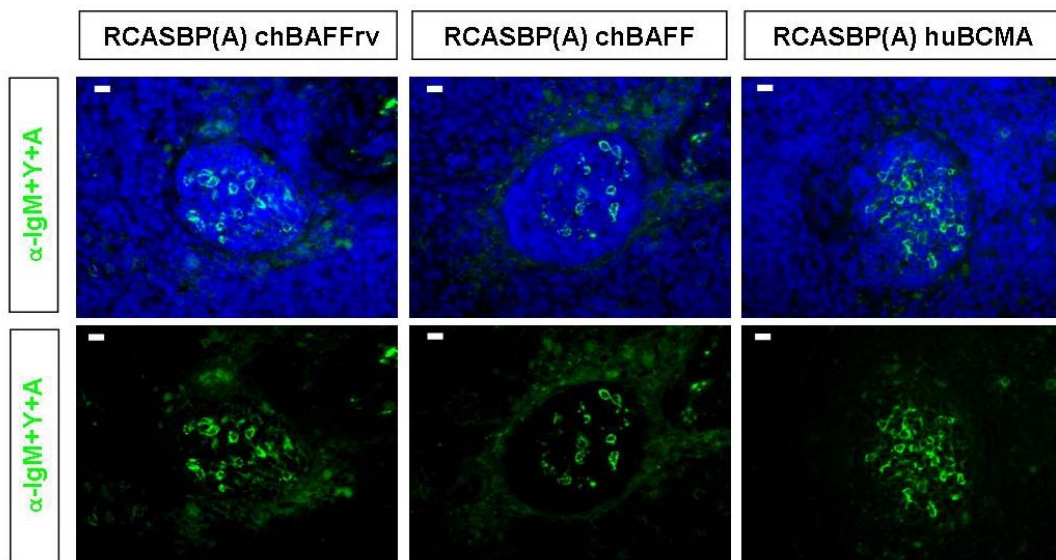
Um die zelluläre Zusammensetzung der in der Milz chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner gefundenen GCs zu analysieren, wurden diese immunhistologisch untersucht. Milzgefrierschnitte wurden dazu wie unter 4.4.4 beschrieben mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b angefärbt (grün). CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden ebenfalls markiert (rot). Abb. 48 zeigt, dass sich im Zentrum von Milz-GCs aus Kontrollen, chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Tieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen finden.

Weitere Gefrierschnitte wurden mit einem Antikörpermix gegen Hühner-IgM, -IgY und -IgA angefärbt (siehe 4.4.4). Abb. 49 zeigt, dass in alle drei untersuchten Tiergruppen im Zentrum der vorhandenen GCs Immunglobuline detektiert werden konnten.



**Abb. 48 Lokalisation CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen im Zentrum von Milz-GCs chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Tiere**

Milzgefrierschnitte wurden mit einem Marker gegen CD4 ( $\alpha$ -CD4, rot) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorchromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. B-Zellen wurden mit dem direktkonjugierten Marker  $\alpha$ -Bu1a+b detektiert (grün). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m; Stern = CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im GC. Die Fotos stehen stellvertretend für zwei untersuchte Tiere je Gruppe.

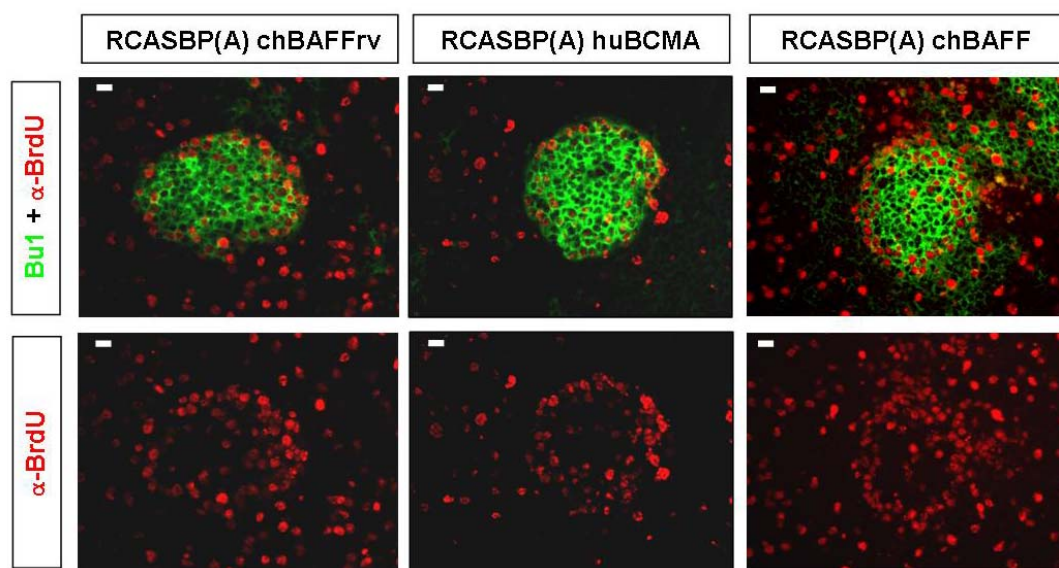


**Abb. 49 Immunglobuline in GCs chBAFF- und huBCMA-überexprimierender Hühner**

Milzgefrierschnitte wurden mit einem Markermix gegen Hühner-IgM, -IgY und -IgA ( $\alpha$ -IgM+Y+A, grün) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit einem fluorchromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m. Die Fotos stehen stellvertretend für zwei untersuchte Tiere je Gruppe.



Um die Verteilung der Zellproliferation in GCs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern zu untersuchen wurden Tiere für drei Stunden mit BrdU behandelt (siehe 4.3.2.2). Gefrierschnitte der Milz dieser Tiere wurden mit dem Hühner-B-Zellmarker  $\alpha$ -Bu1a+b angefärbt (grün). Innerhalb der dreistündigen *in vivo*-Inkorporationszeit in GC-B-Zellen eingelagertes BrdU wurde mit einem  $\alpha$ -BrdU-Antikörper detektiert (rot). Abb. 50 zeigt, dass drei Stunden nach BrdU-Gabe in allen Tiergruppen ein deutlicher Ring proliferierender Zellen in der GC-Peripherie zu finden war.



**Abb. 50 BrdU-Inkorporation in GC-B-Zellen 3h nach Injektion**

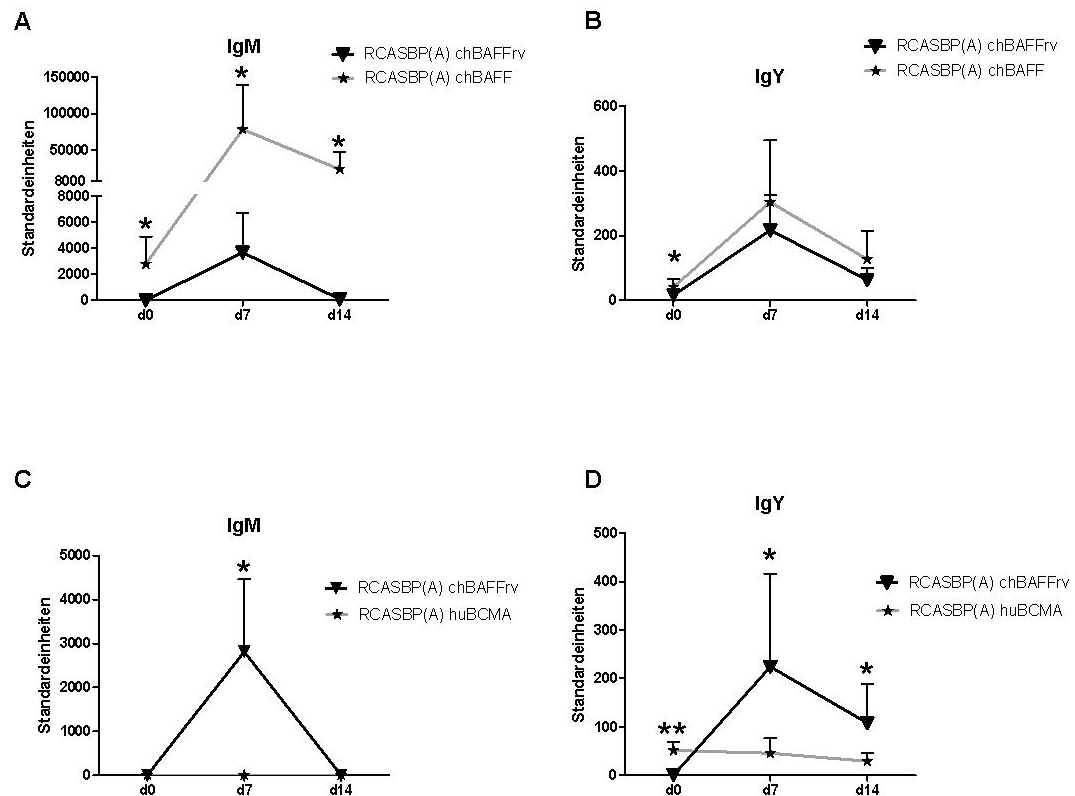
Milzgefrierschnitte von Hühnern die für drei Stunden mit BrdU behandelt worden waren wurden mit einem Marker gegen BrdU inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert (rot). B-Zellen wurden mit dem direktkonjugierten Marker  $\alpha$ -Bu1a+b detektiert (grün). Vergrößerung 40x, Balken = 20 $\mu$ m. Die Fotos stehen stellvertretend für drei untersuchte Tiere je Gruppe.

### 5.2.6 Produktion antigenspezifischen IgMs und IgYs in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen

Um sich der Frage zu nähern, welchen Einfluß das Zytokin chBAFF auf die Entstehung von Plasmazellen nach einer Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen hat, wurden die gebildeten antigenspezifischen IgM- und IgY-Antikörperspiegel sieben und 14 Tage nach Immunisierung gemessen. Es wurden dazu Plasmaproben von wie unter 4.2.2.2.1 erläutert immunisierten chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Hühnern sowie Kontrolltieren mit

ELISA-Systemen untersucht (siehe 4.6.2.1).

Abb. 51 zeigt, dass chBAFF-überexprimierende Tiere (RCASBP(A) chBAFF) gegenüber mit RCASBP(A) chBAFFrv behandelten Kontrolltieren (RCASBP(A) chBAFFrv) signifikant erhöhte spezifische IgM-Spiegel sieben und 14 Tage nach Immunisierung aufwiesen. Auch die Ergebnisse des Präimmunserums vor Immunisierung liegen mit einem Mittelwert von über 2000 Standardeinheiten signifikant über denen der Kontrolltiere. Die antigenspezifischen IgY-Spiegel der chBAFF-überexprimierenden Gruppe und der Kontrollgruppe sieben und vierzehn Tage nach Immunisierung waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich das Präimmunserum zeigte signifikante Unterschiede zur Kontrolle. HuBCMA-überexprimierende Hühner (RCASBP(A) huBCMA) zeigten hingegen keine innerhalb der Detektionsgrenze des verwendeten ELISA liegende antigenspezifische IgM-Produktion. So sind sieben Tage nach Immunisierung die IgM-Spiegel der huBCMA-überexprimierenden Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (RCASBP(A) chBAFFrv) reduziert. HuBCMA-überexprimierende Hühner zeigten auch keinen Anstieg der Produktion antigenspezifischen IgYs. Entsprechend sind auch die antigenspezifischen IgY-Spiegel der huBCMA-überexprimierenden Gruppe sieben und 14 Tage nach Immunisierung signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. Der Basiswert den die Präimmunseren der huBCMA-überexprimierenden Tiere im antigenspezifischen IgY-ELISA zeigten, und der über den gesamten Untersuchungszeitraum nachvollziehbar blieb, war jedoch verglichen mit dem Präimmunserum der Kontrolltiere signifikant erhöht.



**Abb. 51** Verlauf der antigenspezifischen IgM und IgY-Plasmaspiegel nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen in chBAFF- und huBCMA-überexprimierenden Tieren

Antigenspezifisches IgM und IgY in Plasmaproben wurde in ELISAs gemessen (siehe 4.6). Aufgetragen sind Mittelwert und Standardabweichung. A +C: Verlauf des antigenspezifischen IgM-Spiegels; B+D: Verlauf von antigenspezifischem IgY-Spiegeln. Die obere Reihe zeigt die Anbildung antigenspezifischer Immunglobuline in chBAFF-überexprimierenden Tieren und Kontrollen, die untere Reihe die antigenspezifischen Antikörperspiegel huBCMA-überexprimierender Tiere und Kontrollen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Students t-test; \* $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 5$ .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die chBAFF-Überexpression zu einer verringerten Gesamtzahl sowie einer verringerten Zahl antigenspeichernder und antigenspezifischer GCs in der Milz führt. Die Produktion antigenspezifischer IgM-Antikörper ist signifikant gesteigert, während die Spiegel antigenspezifischer IgY-Antikörper nicht von denjenigen der Kontrolltiere abweichen.

Die huBCMA-Überexpression führt nicht zu einer Veränderung der Gesamtzahl an GCs in der Milz, während auch hier die Zahl antigenspeichernder und antigenspezifischer GCs reduziert ist. Die Produktion antigenspezifischer Antikörper bleibt unter dem Detektionsminimum des verwendeten Messsystems.

In beiden Fällen veränderte sich die Gesamtfläche gemessener GCs entsprechend

der Zahl gefundener GCs pro Milzfläche, sodass auch hier neben dem histologischen Eindruck kein Hinweis darauf besteht, dass die GC-Anschnitte unter chBAFF- oder huBCMA-Überexpression abweichende Größe von denen der Kontrolltiere aufweisen. Der Aufbau der GCs dieser Tiere mit Immunglobulinablagerungen und CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen im Zentrum sowie einer Zone proliferierender Zellen in der GC-Peripherie weicht nicht erkennbar von demjenigen der Kontrolltiere ab.

## 6 Diskussion

GCs sind Strukturen in sekundärlymphatischen Organen, in denen im Laufe einer humoralen Immunantwort als Reaktion auf eine Infektion hochaffine B-Zellen heranreifen. Am Ende der GC-Reaktion steht die Bildung von langlebigen klassengewechselten Plasmazellen, deren sezernierte Antikörper dazu beitragen den Erreger effektiv zu bekämpfen. Zusätzlich entstehen B-Gedächtnis-Zellen, die als Teil des immunologischen Gedächtnisses dem Körper bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger einen schnellen und wirkungsvollen Schutz bieten. Die Bildung und Rückbildung von GCs ist damit eine zentrale Reaktion der humoralen Immunantwort.

Die erfolgreiche Affinitätsreifung der proliferierenden GC-B-Zellen ist an die Interaktion mit unterstützenden und regulatorischen Zellpopulationen im GC geknüpft. Beim Prozess der Affinitätsreifung können B-Zellen mit einem höher affinen aber auch solche mit einem niedriger affinen B-Zellrezeptor entstehen (siehe Literaturteil 2.1.4). FDCs präsentieren den GC-B-Zellen unprozessierte Antigen-Antikörper-Komplexe. Können die B-Zellen diese mit Hilfe ihres „verbesserten“ B-Zellrezeptors binden und internalisieren und nachfolgend an ihrer Zelloberfläche präsentieren, so ermöglicht dies die Interaktion mit antigenspezifischen follikulären T-Helferzellen. B-Zellen, deren Immunglobulingene durch Genkonversion und somatische Hypermutation Affinität eingebüßt haben, gehen zugrunde, da die T-Zellhilfe ausbleibt. FDCs und T-Zellen produzieren Zytokine und Zelloberflächenmoleküle deren Rolle für die Entwicklung muriner GC-B-Zellen detailliert untersucht wurde. Für das Huhn ist jedoch bisher nichts über die Regulation der Entwicklung von GC-B-Zellen bekannt. In dieser Arbeit wurden zunächst die Grundlagen des GC-Aufbaus und die Kinetik der GC-Anbildung charakterisiert. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde mit chBAFF zum ersten Mal die Funktion eines Zytokins in der Reifung der humoralen Immunantwort des Huhnes untersucht.

### 6.1 Aufbau von GCs beim Vogel

Die GCs des Huhnes weisen eine von der des Säugers stark abweichende Struktur auf. Da bis dato jedoch nur wenig detaillierte Informationen über den genauen Aufbau der Hühner-GCs vorlagen, wurde in dieser Arbeit zunächst die physiologische GC-Morphologie im Huhn und vergleichend dazu diejenige in zwei weiteren Vogelspezies untersucht.

Während sich GCs im Säuger innerhalb des primären B-Zellfollikels sekundärlymphatischer Organe entwickeln, sind GCs in der Hühnermilz ausserhalb der B-Zellareale in der CD4<sup>+</sup>-T-helferzellreichen PALS-Region lokalisiert [154-155]. Dies konnte in dieser Arbeit für das Huhn nachvollzogen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch GCs in der Milz der Ente in einer Region reich an CD4<sup>+</sup>-Zellen in direkter Nähe zu Milzgefäßen lokalisiert sind.

Ein Charakteristikum der GCs beim Huhn ist die schon von Yasuda et al. [93] beschriebene bindegewebige Kapsel, die man bei Säuger GCs nicht findet. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weisen aber nicht nur die GCs des Huhnes eine Kapsel auf, vielmehr findet sich diese auch bei den GC-Follikeln in der Milz von Ente und Zebrafink. Die Kapsel trat in vergleichbarer Ausprägung bei Ente und Huhn auf, die GCs des Zebrafinken zeigten hingegen eine sehr dünne kapselartige Umrandung. Innerhalb der Kapsel lassen sich ohne spezifische immunhistologische Untersuchungen keine abgegrenzten Kompartimente identifizieren. Eine Teilung in die für murine und humane GCs charakteristischen hellen und dunklen Zonen ist nicht erkennbar. Allerdings konnte durch die Verwendung eines Zellproliferationsmarkers (BrdU) gezeigt werden, dass sich unmittelbar unter der Kapsel ein schmaler Ring von schnell teilenden Lymphozyten befindet, während im Zentrum des GCs nur langsam oder nicht teilende Lymphozyten lokalisiert sind. Ein identisches Bild fand sich auch bei den GCs der Ente und des Zebrafinken. (siehe Abb. 40). Die Verteilung der proliferierenden Zellen im GC drei Stunden nach BrdU-Gabe entsprach demnach auch in den Milz-GCs zweier weiterer Vogelarten der von Yasuda et al. schon

früher für das Hühner-GC beschriebenen Zonierung [87].

Das Zentrum der untersuchten Hühner-GCs ist besetzt mit antigen- und antikörperbindenden Zellen, die mit dem Hühner-FDC-Marker 74.3 angesprochen werden können. Zusätzlich fanden sich zentral im GC CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, die in weiterführenden Analysen als CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen identifiziert werden konnten. Auch für GCs aus der Entenmilz konnte gezeigt werden, dass antikörperpositive Zellen und CD4<sup>+</sup>-Zellen zentral im GC-Follikel vorhanden waren. Diese Ergebnisse unterstützen das von Yasuda et al. [87] zunächst nur für das Huhn diskutierte Konzept einer Zonierung der GCs in einen äußeren Ring proliferierender Zellen (Ringzone) als Äquivalent zur dunklen Zone des Säuger-GCs sowie das Zentrum des Hühner-GCs als Äquivalent für die helle Zone im Säuger-GC. Diese Zonierung tritt nach den hier vorgelegten Untersuchungen nicht nur bei den *Galloanserae* (Vertreter Huhn und Ente), sondern auch bei den *Neoaves* (Vertreter Zebrafink) auf. Es wäre interessant zu klären, ob das Bild für alle Vogelarten verallgemeinert werden kann, wozu ergänzende Studien bei einem Vertreter der *Palaeognathae* notwendig wären.

Interessanterweise variierte die durchschnittliche GC-Anschnittfläche und somit die GC-Größe zwischen den drei untersuchten Vogelspezies trotz des in seiner Zellverteilung identischen Aufbaus der GCs, sodass die GCs in der Milz von Ente und Zebrafink in etwa doppelt so groß waren, wie jene in der Hühnermilz.

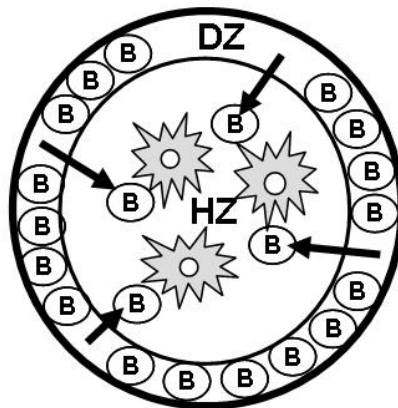
Der Einteilung des GCs in helle und dunkle Zone kommt beim Säuger eine wichtige funktionelle Bedeutung zu. Während die dunkle Zone durch das Vorhandensein von stark proliferierenden GC-B-Zellen geprägt ist, befinden sich in der hellen Zone neben Antigen-Antikörper-Komplexen-speichernden FDCs auch folliculäre T-Helferzellen. GC-B-Zellen, die in der dunklen Zone proliferiert und dabei zeitgleich den B-Zellrezeptor durch somatische Hypermutationsprozesse verändert haben, wandern anschließend in die helle Zone ein. Hier interagieren sie mit den FDCs und den folliculären T-Helferzellen. Diese Interaktion führt schließlich zur Selektion solcher B-Zellen, die die Bindungsstärke ihres B-Zellrezeptors zuvor erfolgreich verbessert haben [59, 156-157].

Wenn die GC-Peripherie (Ringzone) des Vogel-GCs, wie zuvor diskutiert, tatsächlich der dunklen Zone des Säuger-GCs und das aviäre GC-Zentrum der

hellen Zone beim Säuger entsprechen sollte, wäre zu erwarten, dass die stark proliferierenden Zellen aus der GC-Ringzone nachfolgend in das GC-Zentrum wandern, um hier dem angesprochenen Selektionsprozess unterworfen zu werden. Diese Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines BrdU-Pulse-Chase-Experiments untersucht (siehe Abb. 39). In diesem Versuch zeigte sich, dass eine 3-stündige BrdU-Behandlung ausschließlich die Zellen im subkapsulären Ring markierte. Der anschließende Block der BrdU-Inkorporation durch proliferierende Zellen durch Gabe von Thymidin im 150-fachen Überschuß erlaubte es, diese neu geteilten Zellen über die nächsten Stunden zu verfolgen. Dabei zeigte sich, dass die Zellen nicht am GC-Rand lokalisiert blieben. Acht Stunden nach BrdU-Gabe bzw. 5 Stunden nach Hemmung der weiteren Inkorporation fanden sich BrdU-positive Zellen gleichmäßig über das GC verteilt; welche aufgrund des Versuchsaufbaus nur aus der Ringzone stammen konnten. Diese Daten belegen erstmals experimentell die Wanderung von proliferierenden Zellen aus der Ringzone in das GC-Zentrum. Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Annahme ist die erfolgreiche Hemmung der BrdU-Aufnahme durch den Überschuß an Thymidin. Die hierzu durchgeführten Kontrollversuche bestätigen die Richtigkeit der Annahme. Der Aufbau und die Zellmigration im aviären GC sind schematisch in Abb. 52 dargestellt.

Für weiterführende Untersuchungen zur Zelldynamik im aviären GC wäre eine Ausdehnung des Beobachtungszeitraumes von Interesse. Zu prüfen wäre, welcher Anteil der Zellen der dunklen Zone in die helle Zone wandert. Um weitere Parallelen zur Funktion der Säuger-GCs zu ziehen, wäre es von Interesse die Zahl apoptotischer Zellen unter diesen kürzlich geteilten und in die helle Zone eingewanderten Zellen zu bestimmen. In Säuger-GCs kommt es zu einer Anhäufung apoptotischer Zellen am Übergang von dunkler zu heller Zone, welche mit der negativen Selektion für wenig affine kürzlich geteilter B-Zellklone erklärt wird [158]. Für den Vogel liegen solche Studien über kürzlich geteilte B-Zellen noch nicht vor. Ein Hinweis darauf, dass es auch im Hühner-GC zu vermehrter Apoptose am Übergang zwischen heller und dunkler Zone kommt liefern die Ergebnisse von Yasuda et al. [91], die apoptotische Zellen vermehrt in der GC-Peripherie darstellen konnten.





**Abb. 52** Schema eines Vogel-GCs modifiziert nach Yasuda et al. [87]

HZ = Helle Zone mit sternförmig gezeichneten FDCs; DZ = Dunkle Zone; B = GC-B-Zellen. Die Pfeile deuten die Wanderung von GC-B-Zellen von der dunklen in die helle Zone an.

## 6.2 Entstehung von GCs

Da die vorliegende Arbeit zum Ziel hatte den Einfluss des Zytokins chBAFF auf die GC-Reaktion zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Kinetik der Anbildung antigenspezifischer GCs detailliert untersucht. Basierend auf dieser Kinetik sollte ein Untersuchungszeitpunkt gewählt werden, an dem sicher mit ausgereiften antigenspezifischen GCs zu rechnen war. Bisher vorliegende Arbeiten zur An- und Rückbildung von GCs in der Hühnermilz nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen führten nicht den Nachweis, ob die gefundenen GCs tatsächlich auf die durchgeführte Immunisierung zurückgingen [91-93]. Da die Hühner in der für diese Arbeit genutzten konventionellen Tierhaltung durchaus auch ohne Immunisierung GCs in der Milz aufwiesen, wurde das Immunisierungsschema mit dem T-zellabhängigen Antigen Kaninchen- $\alpha$ -Peroxidase-Peroxidase-Immunkomplexe (RPAP) nach Jeurissen et al. benutzt [83]. Diese Autoren konnten zeigen, dass vier Tage nach Immunisierung GCs mit vereinzelt antigenspezifischen Zellen in der Milz immunisierter Hühner auftraten [83].

In der vorliegenden Arbeit konnte das Immunisierungsantigen drei Tage nach Immunisierung im Zentrum von GCs der Milz detektiert werden. Solche antigenspeichernden GCs wurden bis zu vier Wochen nach der Immunisierung

gefunden, allerdings nahm die Speicherung von Antigen auf FDCs im Verlauf der Immunantwort signifikant ab. Das Antigen trat zunächst im Kontext mit IgM auf netzartig im GC-Zentrum angeordneten FDCs auf. Im späteren Verlauf der Immunreaktion kolokalisierte Antigen auf FDCs in GCs vorwiegend mit IgY (siehe 5.1.4.1.2.2), was dem zu diesem Zeitpunkt im Blut gemessenen antigenspezifischen IgY-Spiegel entspricht.

Jeurissen et al. [83] haben beschrieben, dass drei Tage nach Immunisierung Antigen auch auf FDCs außerhalb der GCs detektiert werden kann. Auch in dieser Arbeit konnte zu diesem Zeitpunkt Antigen, zusätzlich zu dem im GC lokalisierten, auch auf netzartig angeordneten FDCs in der Nähe größerer Milzgefäße nachgewiesen werden. Die Regionen, in denen antigenspeichernde FDCs in GCs und freie netzartige und antigenspeichernde FDCs auftraten, entsprachen dem von White et al. [154] beschriebenen Entstehungsort von GCs an arteriellen Aufzweigungen in der Hühnermilz (siehe 5.1.3).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Untersuchungszeitraum gegenüber dem von Jeurissen et al. untersuchten Zeitraum deutlich verlängert. Sieben Tage nach Immunisierung konnten ebenfalls netzartig angeordnete antigenspeichernde FDCs in der Nähe größerer Milzgefäße gefunden werden. Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt die antigenspeichernden FDCs von antigenspezifischen Lymphozyten umgeben (siehe Abb. 34). Die Ansammlungen zentraler antigenspeichernder FDCs umgeben von antigenspezifischen Zellen hatten eine runde Form und entsprachen histologisch exakt der zellulären Zusammensetzung eines antigenspezifischen GCs. Allerdings grenzten sich diese GC-artigen zellulären Ansammlungen nicht durch eine für Hühner-GCs typische Kapsel vom umgebenden Milzgewebe ab. Sieben Tage nach Immunisierung konnten jedoch auch antigenspezifische GCs mit einer Kapsel in den gleichen Milzregionen nachgewiesen werden. Diese GCs zeichneten sich dadurch aus, dass in ihrem Zentrum Antigen detektiert werden konnte und die Mehrzahl der in dem GC-Anschnitt liegenden peripheren GC-B-Zellen das Immunisierungsantigen nach Inkubation spezifisch binden konnten (siehe Abb. 31 und Abb. 32). Die größte Zahl antigenspezifischer GCs fand sich sieben und 14 Tage nach Immunisierung. White et al. beobachteten in ihren Immunisierungsversuchen mit einem anderen,

ebenfalls T-zellabhängigen Immunisierungsantigen [154], erst 14 Tage nach Immunisierung Ansammlungen antigenspezifischer Zellen innerhalb von GCs. Sie konnten keine GCs beschreiben, in der die Mehrzahl der GC-B-Zellen das Antigen bindet, hingegen fanden sie innerhalb des GCs „Spots“ antigenspezifischer GC-B-Zellen.

Diese Unterschiede im Verlauf der Bildung bzw. im Nachweis antigenspezifischer GCs könnten in der Detektionsmethode begründet sein. Die Identifizierung antigenspezifischer Zellen anhand ihrer Fähigkeit auf Gewebeschnitten inkubiertes Antigen spezifisch zu binden ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf solche Zellen begrenzt, die das Antigen mit einer hohen Affinität binden. Somit stellt sich sowohl bezüglich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, als auch bezüglich derjenigen von White et al. die Frage, inwieweit in den immunhistologischen Färbungen tatsächlich alle antigenspezifische Zellen angesprochen werden konnten. Bei Studien in der Maus wird dieses Problem dadurch umgangen, dass mit nitrophenylierten Antigenen eine Hapten-Gruppe zur Immunisierung genutzt werden kann, die von solchen B-Zellen spezifisch gebunden wird, die die  $\lambda$ -leichte Kette des Immunglobulinmoleküls rearrangiert haben. Da die Mehrzahl der B-Zellen der Maus jedoch die  $\kappa$ -leichte Kette rearrangieren, kann man antigenspezifische Zellen mit einem  $\alpha$ - $\lambda$ -leichte Kette-Antikörper ansprechen und so das Problem des Nachweises über die direkte Antigenbindung umgehen [46]. Da das Huhn nur einen Genlocus für die leichte Kette besitzt, ist dieser methodische Ansatz nicht möglich.

In den Immunisierungsversuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch GCs beobachtet, die lediglich zentral im GC einzelne antigenspezifische Zellen aufwiesen (siehe Abb. 30C). Diese GCs, die auch von Jeurissen et al. drei Tage nach Immunisierung beobachtet wurden, werfen die Frage auf, ob es sich bei den wenigen antigenspezifischen Zellen um sekundär in ein etabliertes GC eingewanderte Zellen handelt. Alternativ bestünde die Möglichkeit, dass die Mehrzahl der Zellen solcher GCs, die das Antigen nicht binden konnten, die nötige hohe Affinität ihres B-Zellrezeptors zu jenem frühen Zeitpunkt noch nicht entwickelt hatte. GCs in denen sich B-Zellen entwickeln, die für zwei verschiedene Antigene spezifisch sind, sind aus der Ratte bekannt [39]. Die

Einwanderung von nicht spezifischen B-Zellen in etablierte GCs wurde in der Maus in 2-Photon-*in vivo*-Imaging Experimenten beobachtet [159]. Beide Erklärungsansätze sind daher auch für den Vogel denkbar.

Anhand der bisher beschriebenen Ergebnisse und der wenigen publizierten Daten lässt sich ein erstes Modell für die GC-Bildung beim Huhn erstellen. Die verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass GCs in der Hühnermilz durch Einwanderung antigenspezifischer B-Zellen in ein Netz antigenspeichernder FDCs innerhalb der PALS-Region entstehen. Nach Aktivierung vermehren sich die B-Zellen und werden schließlich von einer Kapsel umgeben. Die zur Kapselbildung führenden Mechanismen sind allerdings noch unklar. Gleichzeitig erscheint ein Wechsel der Spezifität eines bestehenden GCs durch einwandernde B-Zellen, die für das „neue“ Antigen, spezifisch sind, möglich. Fraglich ist in diesem Fall die Rolle der folliculären T-Helferzellen, von denen man in der Maus annimmt, dass sie nach einer Immunisierung antigenspezifisch angebildet werden [160].

### 6.3 Immunglobulinexpression durch GC-B-Zellen

Bedingung für den erfolgreichen immunhistologischen Nachweis antigenspezifischer B-Zellen durch Inkubation des Antigens auf dem Gewebeschnitt, ist die Expression des antigenspezifischen B-Zellrezeptors. Die Frage der Expression von Immunglobulinen auf GC B-Zellen der Hühnermilz wurde bis dato erstaunlich kontrovers diskutiert. Während Mast und Goddeeris beobachteten, dass GC-Zellen negativ oder lediglich schwach positiv für Immunglobuline sind [161], beschreiben Jeurissen et al. IgM- aber nicht IgY-positive GC-Zellen [148]. Yasuda et al. konnten GCs beschreiben die lediglich im Zentrum Ig-positive Zellen aufwiesen [93].

In der vorliegenden Arbeit konnten nun in zwei unabhängigen Immunisierungsversuchen mit zwei unterschiedlichen T-zellabhängigen Antigenen (DNP-KLH und RPAP) GCs beschrieben werden, in denen lediglich zentral im GC gelegene Zellen Färbung mit Markern gegen Immunglobuline zeigten (siehe Abb. 16). Diese Zellen zeigten in vielen Fällen Ablagerungen des Immunisierungsantigens und konnten mit dem FDC-Marker 74.3 angesprochen

werden. Bei den in solchen GCs im Zentrum detektierten Immunglobulinen handelt es sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um als Immunkomplexe auf FDCs gespeicherte Antikörper. Auf Zellen in der GC-Peripherie waren jedoch nur in einem Teil dieser GCs Immunglobuline anfärbbar. In anderen GCs konnten mit den durchgeführten Färbungen keine Immunglobuline detektiert werden. Da diese beiden Typen von GCs im selben Milzschnitt zu finden waren, ist nicht davon auszugehen, dass es sich um ein technisches Problem handelt. Auch eine simultane Färbung gegen alle drei Immunglobulinklassen des Huhnes ergab das gleiche Bild von GCs mit immunglobulinnegativen Zellen in der GC-Peripherie (siehe Abb. 16). Da der Großteil eines GCs mit B-Zellen angefüllt ist, handelt es sich bei diesen Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um B-Zellen, auf denen in der durchgeführten Färbung keine Immunglobulinexpression nachweisbar war.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit jedoch auch beobachtet, dass antigenspezifische GCs, in denen die Mehrzahl der GC-Zellen innerhalb eines GC-Anschnittes das Antigen binden kann, IgM-Färbung auch auf peripheren GC-B-Zellen zeigten. (siehe Abb. 33). Somit wurden einerseits GCs mit in der Mehrzahl immunglobulinnegativen als auch solche mit in der Mehrzahl immunglobulinpositiven Zellen in der GC-Peripherie beobachtet. Da aufgrund ihrer Lokalisation im GC nicht davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen Zellen um immunkomplexspeichernde FDCs handelt, ist anzunehmen, dass es GCs mit unterschiedlich starker Immunglobulinexpression der darin enthaltenen GC-B-Zellen gibt. Arakawa et al. konnten beobachten, dass in der frühen Phase der GC-Antwort im Huhn vorwiegend der Prozess der Genkonversion zur sekundären Diversifizierung der B-Zellrezeptorgene herangezogen wird [92]. Im späteren Verlauf der GC-Entwicklung konnten dagegen nur sehr wenige Genkonversions-Ereignisse unter den B-Zellklonen beschrieben werden, während die Rate auftretender Basenmodifikationen durch somatische Hypermutation zu beiden Zeitpunkten annähernd gleich hoch lag. Die zu Beginn der GC-Antwort durch Genkonversion eingeführten starken Veränderungen in den Immunglobulingenen könnten zum Verlust eines ablesbaren Immunglobulingenes durch Verschiebungen des Leserahmens führen. Solche Zellen dürften aller Wahrscheinlichkeit nach durch Apoptose sterben, so dass zu späteren Zeitpunkten das GC von B-Zellen mit funktionsfähigen Immunglobulinen besetzt ist. Um

diese Hypothese zu untersuchen sollten zunächst die Expressionslevel von Immunglobulinen in immunglobulinnegativen GC-B-Zellen mit solchen von immunglobulinpositiven GC-B-Zellen z.B. auch auf mRNA-Ebene verglichen werden. Immunglobulingensequenzen von B-Zellklonen aus gesichert immunglobulinnegativen GC-B-Zellen könnten mit molekularbiologischen Methoden auf ihre Expressionsfähigkeit untersucht werden.

Eine weitere Hypothese wäre, dass Hühner-GC-B-Zellen ähnlich den GC-Zellen der dunklen Zone in GCs der Ratte während der Proliferation im GC weniger Immunglobuline exprimieren [39]. Denkbar wäre deshalb auch, dass die unterschiedliche Immunglobulinfärbung die Entwicklung der GC-B-Zellen im Verlauf der GC-Reaktion von aktivierten B-Zellen zu Plasmablasten, die in ihrem Zytoplasma Immunglobuline akkumulieren, bis hin zur Plasmazelle, die als Effektorzelle das GC verlassen wird, widerspiegelt.

#### **6.4 Die Funktion des Zytokins chBAFF in der GC-Reaktion des Huhnes**

Nach Erhebung der geschilderten phänotypischen Daten über Hühner-GCs wurde auf Basis des erworbenen Wissens die Anbildung germinaler Zentren in chBAFF-überexprimierenden bzw. chBAFF-defizienten Hühnern untersucht. Da bisher noch keine funktionellen Untersuchungen zur Rolle von Zytokinen in der Differenzierung von Hühner-GC-B-Zellen vorliegen, wird im Folgenden versucht, Parallelen und Unterschiede zu den aus der Maus bekannten Funktionen von BAFF herauszuarbeiten.

##### **6.4.1 Einfluss einer chBAFF-Überexpression auf periphere B-Zellen**

Wie in früheren Arbeiten gezeigt, hat chBAFF einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung des peripheren B-Zellpools im Huhn [140-141]. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnte gezeigt werden, dass eine chBAFF-Überexpression zu einer stark erhöhten Zahl von B-Zellen im Blut und in der Milz führt. Die Überexpression des chBAFF-Dekey-Rezeptors huBCMA führt dagegen über die Bindung an sezerniertes chBAFF zu chBAFF-defizienten Tieren und in Folge zu einer stark reduzierten Zahl peripherer B-Zellen (siehe 5.2.2.2). Dieser Effekt zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, wie durch die

durchflußzytometrischen Analysen belegt werden konnte. Zudem waren die Effekte in den histologischen Proben der Milz sehr deutlich erkennbar. Während chBAFF-überexprimierende Hühner stark vergrößerte B-Zellareale in der Milz aufwiesen, waren die homologen Areale chBAFF-defizienter Tiere fast B-zellfrei (siehe 5.2.3). Die chBAFF-Überexpression führte zu einer starken Vergrößerung der als periellipsoidale weiße Pulpa bezeichneten Areale der Hühnermilz, die aufgrund ihres guten Zugangs zu Blutantigenen über das Ellipsoid als Äquivalente zur Marginalzone der Maus diskutiert werden [83]. BAFF-transgene Mäuse zeigen ebenfalls stark erhöhte B-Zellzahlen in der Milz und dies insbesondere im Marginalzonenkompartiment [116].

Die B-Zellen solcher Tiere weisen generalisiert einen aktivierten Phänotyp auf. Die Milzen BAFF-transgener Mäuse zeigen im Vergleich mit Kontrolltieren auch überdurchschnittlich viele GCs [116]. Interessanterweise fand sich bei den in dieser Arbeit untersuchten chBAFF-überexprimierenden Hühner, trotz deutlich erhöhter peripherer B-Zellzahlen, keine verstärkte B-Zellaktivierung im Sinne der vermehrten Anbildung von GCs in der Milz. Vielmehr wiesen sie, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant weniger GCs in der Milz auf (siehe Abb. 46). Die Produktion antigenspezifischen IgMs in der frühen Phase der humoralen Immunantwort war jedoch signifikant erhöht. Diese hohen Antikörperspiegel übertrugen sich jedoch im weiteren Verlauf der Immunantwort nicht auf die Antikörperproduktion durch klassengewechselte Plasmazellen. So konnten in Kontrolltieren und chBAFF-überexprimierenden Tieren keinerlei Unterschiede in der Produktion von antigenspezifischem IgY detektiert werden (siehe 5.2.6). Erstaunlicherweise konnten zum untersuchten Zeitpunkt nach der Immunisierung keine antigenspezifischen GCs in den Milzen chBAFF-überexprimierender Hühner beobachtet werden, während in den Kontrolltieren spezifische GCs wie erwartet präsent waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die chBAFF-Überexpression sich positiv regulatorisch auf die früh in der Immunantwort gebildeten IgM-bildenden Plasmazellen auswirkt, während der Klassenwechsel antigenaktivierter B-Zellen durch chBAFF im Überschuss nicht beeinflusst wird. Kothlow et al. haben gezeigt, dass die Gesamt-IgY und IgA-Plasmaspiegel chBAFF-überexprimierender Hühner ebenso wie die Gesamt-IgM-Plasmaspiegel signifikant erhöht sind [140]. Dies spricht deutlich gegen die Theorie, dass es

durch erhöhte chBAFF-Spiegel zu Problemen bei der Durchführung des Klassenwechsels kommt.

In den Milzen chBAFF-überexprimierender Hühner wurden keine antigenspezifischen GCs beobachtet, die als Ort der Affinitätsreifung und des Klassenwechsels gelten. Es stellt sich somit die Frage, ob der niedrige IgY-ELISA-Spiegel chBAFF-überexprimierender Tiere tatsächlich eine geringe Menge produzierten hochaffinen antigenspezifischen IgYs widerspiegelt.

Sollte in den Tieren die Mechanismen der Affinitätsreifung innerhalb von GCs außer Kraft gesetzt sein, so könnten sie dennoch durch Klassenwechsel ausserhalb germinaler Zentren eine größere Menge niedrigaffinen antigenspezifischen IgYs produzieren. Der verwendete ELISA kann zwischen beiden Messgrößen nicht unterscheiden. Um diesen Fragen weiter nachzugehen, müssten in weiterführenden Arbeiten zum einen die Affinitätsreifung entstehender klassengewechselter Antikörper in chBAFF-überexprimierenden Hühnern serologisch untersucht werden. Zum anderen sollten durchflußzytometrische Analysen der früh in der Immunantwort in der Milz außerhalb von GCs gebildeten antigenspezifischen Zellen erfolgen. Deren Immunglobulinklassen sollten dabei Berücksichtigung finden. Jeurissen et al. konnte zeigen, dass jene antigenspezifischen Zellen, die ab zwei Tage nach Immunisierung in der roten Milzpulpa zu finden sind, zunächst IgM-positiv sind, dann jedoch ein Klassenwechsel erfolgt, sodass diese Zellen zu späteren Zeitpunkten IgY-positiv sind [83]. Diese Zellen werden als Plasmazellen bzw. Plasmablasten angesprochen [83, 161]. Sie verschwinden bis 14 Tage nach Immunisierung aus der roten Milzpulpa (siehe Abb. 29), im gleichen zeitlichen Rahmen, in dem auch die Immunglobulinproduktion der Primärantwort sistiert (siehe Abb. 36). Die hohe Produktion antigenspezifischen IgMs könnte somit aus einer größeren Zahl antigenspezifischer Plasmazellen bzw. Plasmablasten in der roten Milzpulpa chBAFF-überexprimierender Tiere resultieren. Eine weitere Möglichkeit wäre ein längeres Überleben solcher Zellen durch chBAFF, dessen Homolog BAFF im Säuger einen Überlebensfaktor für Plasmablasten darstellt. Um dies aufzuklären sollten antigenspezifische Plasmablasten bzw. Plasmazellen in der Milz zu frühen Zeitpunkten nach Immunisierung detailliert untersucht werden.



Mehrere Arbeiten haben beschrieben, dass bei BAFF überexprimierenden Mäusen eine hohe Zahl autoreaktiver B-Zellen auftritt und die Tiere Zeichen von Autoimmunerkrankungen zeigen, wie hohe Spiegel zirkulierender Rheuma-Faktoren, Immunkomplexe und  $\alpha$ -dsDNA-Autoantikörper sowie Immunglobulinablagerungen in der Niere [116, 125]

Es wurden in dieser Arbeit keine detaillierten Untersuchungen zum Gehalt an Rheuma-Faktoren, Immunkomplexen oder  $\alpha$ -dsDNA-Antikörpern im Blut chBAFF-überexprimierender Hühner durchgeführt. Die vor Immunisierung der Tiere gewonnenen Präimmunsereen zeigten jedoch im ELISA zur Messung antigenspezifischen IgMs signifikant höhere Titer als diejenigen der Kontrolltiere. ChBAFF-überexprimierende Hühner wiesen somit einen gesteigerten Spiegel an das Immunisierungsantigen bindender Immunglobuline vor Immunisierung auf. BAFF-transgene Mäuse zeigen erhöhte Spiegel an Rheuma-Faktoren bzw. Autoantikörpern gegen die Fc-Domäne von IgG. Solche Autoantikörper können mit dem Fc-Teil des IgG-Moleküls anderer Spezies kreuzreagieren [116, 162]. Da die Immunisierung der chBAFF-überexprimierenden Hühner mit Immunkomplexen aus Kaninchen-IgG und Peroxidase erfolgte ist es durchaus möglich, dass der signifikant erhöhte ELISA-Wert für IgM und der zwar nicht stark jedoch signifikant erhöhte Wert für IgY darauf hindeuten, dass die Hühner erhöhte Grundspiegel Fc-spezifischer Antikörper vergleichbar den Rheuma-Faktoren aufweisen.

#### **6.4.2 Einfluss einer chBAFF-Neutralisation auf periphere B-Zellen**

ChBAFF-defiziente Hühner, die den Rezeptor huBCMA überexprimieren, zeigen eine starke Reduktion der peripheren B-Zellzahlen [140]. Diese durchflußzytometrisch gezeigte Reduktion zeigt sich immunhistologisch dahingehend, dass die periellipsoidale Pulpa solcher Tiere nahezu leer erscheint und nur sehr wenige B-Zellen in dieser B-Zellregion der Hühnermilz vorhanden sind (siehe Abb. 45). Entsprechend der geringeren Zahl vorhandener aktivierbarer B-Zellen fällt auch die antigenspezifische IgM- und IgY-Antikörperantwort im Blut solcher Tiere signifikant geringer aus, als die von Kontrolltieren. Die Spiegel beider Immunglobuline liegen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA (siehe Abb. 51).

Trotz der deutlich reduzierten antigenspezifischen Antikörperproduktion chBAFF-defizienter Hühner ist die Gesamtzahl in der Milz vorhandener GCs jedoch nicht reduziert, sondern entspricht der der Kontrolltiere. Antigenspezifische GCs, die zum Untersuchungszeitraum erwartungsgemäß in Kontrolltieren vorhanden waren, waren in den Milzen chBAFF-defizienter Hühnern jedoch nicht detektierbar. Antigenspeichernde GCs waren hingegen vorhanden. Deren Zahl war verglichen mit der Kontrollgruppe jedoch deutlich reduziert (siehe Abb. 47). Aufgrund der deutlich reduzierten antigenspezifischen Antikörperspiegel in chBAFF-defizienten Tieren ist sicherlich anzunehmen, dass die Ablagerung von Immunisierungsantigen auf FDCs im GC, die als Immunkomplex gebunden an spezifische Antikörper erfolgt, erschwert ist. Die Mechanismen des Transportes von Antigen aus der periellipsoidalen weißen Pulpa zu FDCs der PALS-Region, in der Hühner-GCs entstehen, sind noch nicht untersucht und die Rolle der B-Zellen in diesem Zusammenhang ist noch nicht geklärt. BAFF-defiziente Mäuse zeigen Probleme in der Umbildung des primären FDC-Netzwerkes des B-Zellfollikels zu dem sekundären FDC-Netzwerk des GCs [122]. Da auch in diesen Tieren die B-Zellzahlen deutlich reduziert sind, wird eine zu geringe Produktion des von B-Zellen für die FDCs bereitgestellten Lymphotoxin $\alpha$ 1 $\beta$ 2 für das gestörte FDC-Netzwerk verantwortlich gemacht. Zwischen B-Zelle und FDCs kommt es zu einer Interaktion über Lymphotoxin auf der B-Zelle und den dazugehörigen Rezeptor auf FDCs. Die GCs in BAFF-defizienten Mäusen bilden sich zunächst normal heran, allerdings wird die GC-Reaktion deutlich früher terminiert [122], sodass zu mit dem in dieser Arbeit gewählten Untersuchungszeitpunkt vergleichbaren Zeitpunkten nach Immunisierung keine GCs mehr vorhanden sind. Die in chBAFF-defizienten Hühnern vorhandenen unspezifischen GCs zeigten einen normalen Aufbau mit zentralen FDCs und einer Ringzone, allerdings sind zum erwarteten Zeitpunkt keine antigenspezifischen GCs vorhanden. In Anbetracht der verkürzten Dauer der GC-Reaktion in BAFF-defizienten Mäusen sollte die Anbildung germinaler Zentren in chBAFF-defizienten Hühnern auch zu früheren Zeitpunkten nach Immunisierung untersucht werden. Sicherlich ist auch im Huhn eine Interaktion von FDCs und B-Zellen wahrscheinlich. Lymphotoxin $\alpha$ 1 $\beta$ 2, welches eine wichtige Funktion in der Entstehung der B-Zellzonen in sekundärlymphatischen

Organen des Säugers hat [41], ist im Huhn bisher nicht nachgewiesen worden. Denkbar wäre die Existenz anderer Regulatoren in dem Zusammenspiel zwischen FDCs und B-Zellen im Huhn, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass eine chBAFF-Überexpression die Anbildung germinaler Zentren reduzierte, während sie sich früh in der humoralen Immunantwort positiv auf die Produktion von IgM auswirkte. Die Produktion klassengewechselten IgYs erschien nicht beeinflusst. Eine chBAFF-Neutralisation hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Anbildung germinaler Zentren, wohingegen sowohl die Produktion antigenspezifischen IgMs als auch IgYs deutlich reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar war. In beiden Fällen scheint der zeitliche Verlauf der Anbildung germinaler Zentren nach Immunisierung verändert, da zum erwarteten Zeitpunkt keine antigenspezifischen GCs beobachtet werden konnten. Da im Huhn in Gegensatz zum Säuger die GCs nicht innerhalb der B-Zellregion, sondern isoliert davon umgeben von PALS entstehen, wäre es denkbar, dass die stark vergrößerten B-Zellareale in der Milz chBAFF-überexprimierender Hühner das lokale Zusammentreffen an der Immunantwort beteiligter Zellen dahingehend stören, dass eine Etablierung von GCs, in denen sich die beteiligten Zellen zusammenfinden, nicht funktionieren kann. Die Tatsache, dass die Gesamt-GC-Zahl in chBAFF-defizienten Hühnern unverändert ist, deutet zusammen damit, dass eine antigenspezifische Antikörperantwort praktisch nicht zu beobachten ist, darauf hin, dass die stark in ihrer Zahl reduzierten B-Zellen in diesen Tieren unter Umständen ähnlich den Verhältnissen in der Maus zwar GCs an bilden können, aber nicht dazu fähig sind erfolgreich eine antigenspezifische GC-Reaktion zu durchlaufen.

## 6.5 Ausblick

Diese Arbeit hat einen Grundstein für die weitere Untersuchung der Regulation der GC-Reaktion in Hühnern gelegt. Kenntnisse über die Morphologie und die Kinetik der GC-Reaktion des Huhnes wurden erweitert, und eine Methode aufgezeigt, mit deren Hilfe im Huhn *in vivo* die Regulation der sekundären Differenzierung antigenaktivierter B-Zellen in Hühner-GCs untersucht werden kann. Dies wurde exemplarisch für das Zytokin chBAFF durchgeführt. ChBAFF

zeigte in dieser Studie einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung der B-Zellareale der Milz und auch auf die Entwicklung von Plasmablasten bzw. Plasmazellen. Der Einfluss von chBAFF auf die GC-Reaktion muß jedoch sehr differenziert betrachtet werden und ist auf Basis dieser Studien noch nicht wirklich erklärbar. In der Maus sind viele weitere regulatorische Faktoren, die auf die GC-B-Zellentwicklung Einfluß nehmen schon detailliert untersucht. Interleukin 21 (Il-21)-bildende folliculäre T-Helferzellen interagieren über Zelloberflächenmoleküle mit der GC-B-Zelle [163], und sind kritisch für die Selektionsprozesse im GC [164]. Das schon im Zusammenhang mit FDCs angesprochene Lymphotoxin-System spielt z.B. eine kritische Rolle nicht so sehr für die Bildung, sondern eher für den Erhalt von GCs, da diese in Mäusen die für Lymphotoxin oder seinen Rezeptor defizient sind, früher rückgebildet werden [165].

Um die Rolle von chBAFF im Zusammenspiel verschiedener Zellen verstehen zu können, ist die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung weiterer regulatorischer Moleküle von zentraler Bedeutung.

## 7 Zusammenfassung

Die Reifung und Differenzierung antigenaktivierter B-Zellen findet bei Vögeln und bei Säugern in vergleichbaren Kompartimenten sekundärlymphatischer Organe, den germinalen Zentren (GC), statt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die an der GC-Bildung beteiligten Zellarten weitgehend gleich sind, dass sich aber die Strukturen der GCs zwischen den genannten Klassen deutlich unterscheiden. Das Säuger-GC weist zwei Pole auf, die dunkle Zone mit stark proliferierenden B-Zellen in Nachbarschaft zur T-Zellzone und davon abgewandt die helle Zone, in der die Selektion hoch affiner B-Zellen erfolgt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Struktur und Entwicklung der Vogel-GCs detailliert zu beschreiben und die Rolle des Zytokins „B cell activating factor of the TNF family in chicken“ (chBAFF) in der GC-Reaktion beim Huhn zu untersuchen.

Die Analyse der Struktur der GCs von Vertretern aus drei Ordnungen (Hühnervogel, Gänsevogel und Sperlingsvogel) zeigte einen vergleichbaren Aufbau. Die GCs der Ente und des Huhns wiesen in ihrem Zentrum Follikulär Dendritische Zellen (FDC) auf, die in enger räumlicher Nähe zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen lagen. Im Übrigen waren die GCs mit B-Lymphozyten angefüllt und wurden bei allen drei Tierarten (Huhn, Ente, Zebrafink) vom Milzgewebe durch eine bindegewebige Kapsel getrennt. Eine Gliederung in eine helle und eine dunkle Zone war bei keiner der untersuchten Spezies erkennbar. Durch Markierung mit Bromdeoxyuridin (BrdU) konnte ein Ring stark proliferierender Zellen unmittelbar unter der Kapsel identifiziert werden. Ein BrdU-Pulse-Chase-Experiment zeigte, dass diese Zellen innerhalb weniger Stunden die Ringzone verlassen und in das GC-Zentrum wandern. Aufgrund dieser Daten kann ein Modell postuliert werden, nach dem die Ringzone des Vogel-GCs der dunklen Zone des Säuger-GCs entspricht, während das aviäre GC-Zentrum ein Äquivalent der hellen Zone beim Säuger ist.

Die Kinetik der GC-Bildung wurde nach Immunisierung von Hühnern mit T-zellabhängigen Antigenen untersucht. Das Maximum der Anbildung antigenspezifischer GCs war 7-14 Tage nach der Immunisierung erkennbar,

innerhalb der nächsten 14 Tage nahm die Zahl der antigenspezifischen GCs deutlich ab. In diesen Experimenten konnten zwei Typen von GCs identifiziert werden. Einerseits wurden solche GCs beobachtet, deren B-Zellen nicht mit Antikörpern gegen Immunglobuline reagierten, daneben fanden sich im gleichen Organ aber auch GCs mit in der Mehrzahl IgM-, oder IgA-positiven B-Zellen.

ChBAFF wurde auch beim Huhn als wichtiges Zytokin der B-Zellentwicklung identifiziert. Um den Einfluss von chBAFF auf die GC-Reaktion zu untersuchen, wurden Tiere generiert, die entweder chBAFF überexprimierten oder endogenes chBAFF neutralisierten. Im Gegensatz zu Beobachtungen bei der Maus, führt die chBAFF-Überexpression im Huhn zu einer deutlichen Reduktion der GC-Zahl. Die Gesamtzahl der B-Zellen im Blut und in der perielipsoidalen weißen Pulpa ist dagegen stark erhöht, ebenso wie die Gesamtimmunglobulinkonzentration und die Konzentration antigenspezifischer IgM-Antikörper. Die Konzentration antigenspezifischer IgY-Antikörper war dagegen nicht beeinflusst.

ChBAFF-defiziente Hühner zeigen keine Unterschiede in der Gesamtzahl der in der Milz vorhandenen GCs. Allerdings konnten nach Immunisierung keine antigenspezifischen GCs beobachtet werden. Die Bildung antigenspezifischer Antikörper nach einer Immunisierung blieb bei diesen Tieren aus. Darüber hinaus war die Zahl antigenspeichernder GCs deutlich reduziert. Die perielipsoidale weiße Milzpulpa war nahezu komplett B-zellfrei.

Diese Daten weisen daraufhin, dass chBAFF auch beim Huhn in der Bildung der physiologischen Milzstruktur eine zentrale Rolle einnimmt und darüber an der Ausbildung der GC-Reaktion beteiligt ist.

## 8 Summary

### **Characterization of the chicken germinal center reaction and its modulation by the cytokine chBAFF**

Affinity maturation and differentiation of antigen-activated B-cells in birds and mammals is confined to germinal centres (GC) in secondary lymphoid organs. Earlier studies have revealed that the cellular composition of GCs in the indicated classes is very similar, while the structure of the GC-follicle differs considerably. The mammalian GC is polarized into a dark zone of highly proliferating B-cells adjacent to the T-cell zone and a light zone where selection of high affinity B-cells occurs.

The aim of this study was to analyse the structure and development of GCs in birds and to investigate the impact of the cytokine „B cell activating factor of the TNF family in chickens“ (chBAFF) on the GC reaction in chickens.

Analysis of the GC-structure from splenic GCs from three orders of birds (*Galliformes*, *Anseriformes*, *Passeriformes*) revealed a highly similar composition of GC-follicles. In the centre of duck and chicken GCs Follicular Dendritic Cells were present in close association with CD4<sup>+</sup>-T-cells. The entire GC-follicle was filled with B-cells which in all three investigated species (chicken, duck, zebrafinch) were separated from the surrounding splenic tissue by a capsule of connective tissue. Dark and light zones could not be distinguished in GCs of any of the birds. *In vivo* treatment of birds with bromdeoxyuridine (BrdU) revealed a ring of heavily proliferating cells directly under the capsule of the GC (ring zone). BrdU-pulse-chase-experiments revealed that cells which had recently proliferated migrated from the ring zone to the GC centre. Based on these data we propose a model in which the ring zone is an equivalent of the mammalian dark zone while the avian GC centre is homologous to the mammalian light zone.

To examine the kinetics of GC-development birds were immunized with T-dependent antigens. The highest number of antigen specific GCs was observed seven and 14 days after immunization. Thereafter, antigen specific GC numbers decreased. In these experiments two kinds of GCs were observed. Consistently,

GCs with B-cells which could not be stained with anti-immunoglobulin antibodies were found. In the same organs other GCs could be detected with immunoglobulin positive B-cells which, in the majority, expressed IgM or IgA.

Recently the cytokine chBAFF was identified as an important regulator of B-cell development in the chicken. To further investigate the impact of chBAFF on the GC-reaction, birds were generated which either overexpressed chBAFF or neutralized endogenous chBAFF.

Contrarily to what has been shown in mice, overexpression of chBAFF in chicken lead to a clear reduction of splenic germinal centres while total numbers of B-cells in blood and in the perielipsoidal white pulp of the spleen were strongly increased. Total amounts of immunoglobulines were increased and the same was true for antigen specific IgM-titers early in the immune response, while antigen specific IgY-titers were unaffected.

ChBAFF-deficient chickens did not show any change in total numbers of splenic GCs, but were neither able to mount an antigen specific IgM nor an IgY-antibody-response. Antigen specific GCs were absent and the number of antigen retaining GCs was also decreased. The splenic architecture of chBAFF-deficient birds was disrupted with a complete loss of the perielipsoidal white pulp.

Collectively, these data indicate that chBAFF has an important function in the development of the physiological splenic architecture in chicken and furthermore is involved in chicken GC reaction.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C., ed. *Janeway's Immunobiology Kapitel 9*. Seventh Edition ed., ed. K.T. Murphy, Paul; Walter, Peter Vol. Seventh Edition. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group. 1-887.
2. Janeway, C., ed. *Janeway's Immunobiology Chapter 7*. Seventh Edition ed., ed. K.T. Murphy, Paul; Walter, Peter Vol. Seventh Edition. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group. 1-887.
3. Paul, W.E., ed. *Fundamental Immunology, 6th edition, Chapter 4*. Raven Press: New York. 1-1644.
4. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
5. Early, P., et al., *An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH*. Cell, 1980. **19**(4): p. 981-92.
6. Weigert, M., et al., *The joining of V and J gene segments creates antibody diversity*. Nature, 1980. **283**(5746): p. 497-9.
7. Janeway, C., ed. *Janeway's Immunobiology Chapter 4*. Seventh Edition ed., ed. K.T. Murphy, Paul; Walter, Peter Vol. Seventh Edition. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group. 1-887.
8. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 491-502.
9. Janeway, C., ed. *Janeway's Immunobiology Chapter 3*. Seventh Edition ed., ed. K.T. Murphy, Paul; Walter, Peter Vol. Seventh Edition. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group. 1-887.
10. Komori, T., et al., *Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes*. Science, 1993. **261**(5125): p. 1171-5.
11. Pereira, J.P., L.M. Kelly, and J.G. Cyster, *Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses*. Int Immunol, 2010. **22**(6): p. 413-9.
12. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *Visualizing the molecular and cellular events underlying the initiation of B-cell activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **334**: p. 153-77.
13. Chen, X., et al., *Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone*. Int Immunol, 1997. **9**(1): p. 27-41.
14. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.

15. Dammers, P.M., et al., *Immunoglobulin VH gene analysis in rat: most marginal zone B cells express germline encoded VH genes and are ligand selected*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. **252**: p. 107-17.
16. Herzenberg, L.A. and J.W. Tung, *B cell lineages: documented at last!* *Nat Immunol*, 2006. **7**(3): p. 225-6.
17. Janeway, C., ed. *Janeway's Immunobiology Chapter 9*. Seventh Edition ed., ed. K.T. Murphy, Paul; Walter, Peter Vol. Seventh Edition. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group. 1-887.
18. Greenberg, A.S., et al., *A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks*. *Nature*, 1995. **374**(6518): p. 168-73.
19. Clem, L.W. and G.A. Leslie, *Production of 19S IgM antibodies with restricted heterogeneity from sharks*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(1): p. 139-41.
20. Zimmerman, L.M., L.A. Vogel, and R.M. Bowden, *Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective*. *J Exp Biol*, 2010. **213**(5): p. 661-71.
21. Nahm, M.H., F.G. Kroese, and J.W. Hoffmann, *The evolution of immune memory and germinal centers*. *Immunol Today*, 1992. **13**(11): p. 438-41.
22. Kwong, J.C., et al., *The effect of universal influenza immunization on mortality and health care use*. *PLoS Med*, 2008. **5**(10): p. e211.
23. Ehrlich, W., *Studies of the Lymphatic Tissue : Iii. Experimental Studies of the Relation of the Lymphatic Tissue to the Number of Lymphocytes in the Blood in Subcutaneous Infection with Staphylococci*. *J Exp Med*, 1929. **49**(3): p. 347-60.
24. Ehrlich, W., *Studies of the Lymphatic Tissue : Iv. Experimental Studies of the Effect of the Intravenous Injection of Killed Staphylococci on the Behavior of Lymphatic Tissue, Thymus, and the Vascular Connective Tissue*. *J Exp Med*, 1929. **49**(3): p. 361-86.
25. Glick, B., *The bursa of Fabricius of chickens in antibody production*, State University, Columbus: Columbus, Ohio. p. pp.1-102.
26. Cooper, M.D., et al., *The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken*. *J Exp Med*, 1966. **123**(1): p. 75-102.
27. Cooper, M.D., et al., *Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1969. **35**(3): p. 242-52.

28. Tew, J.G., M.H. Kosco, and A.K. Szakal, *The alternative antigen pathway*. Immunol Today, 1989. **10**(7): p. 229-32.
29. Roozendaal, R., et al., *Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 264-76.
30. Molina, H., et al., *Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3357-61.
31. Phan, T.G., et al., *Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 786-93.
32. Cinamon, G., et al., *Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 54-62.
33. Lane, P., et al., *Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2573-8.
34. Valle, A., et al., *Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4*. Eur J Immunol, 1989. **19**(8): p. 1463-7.
35. Wang, Z., et al., *Induction of bcl-x by CD40 engagement rescues sIg-induced apoptosis in murine B cells*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3722-5.
36. Tony, H.P. and D.C. Parker, *Major histocompatibility complex-restricted, polyclonal B cell responses resulting from helper T cell recognition of antiimmunoglobulin presented by small B lymphocytes*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 223-41.
37. Pereira, J.P., et al., *EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1122-6.
38. Hollowood, K. and J. Macartney, *Cell kinetics of the germinal center reaction--a stathmokinetic study*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 261-6.
39. Liu, Y.J., et al., *Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 2951-62.
40. Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1165-75.
41. Luther, S.A., et al., *BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis*. Immunity, 2000. **12**(5): p. 471-81.

42. Astorri, E., et al., *Evolution of ectopic lymphoid neogenesis and in situ autoantibody production in autoimmune nonobese diabetic mice: cellular and molecular characterization of tertiary lymphoid structures in pancreatic islets*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3359-68.
43. de Vinuesa, C.G., et al., *Germinal centers without T cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 485-94.
44. Vinuesa, C.G., et al., *T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 72-89.
45. Miller, M.J., et al., *Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1869-73.
46. Jacob, J. and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers*. J Exp Med, 1992. **176**(3): p. 679-87.
47. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
48. Gunn, M.D., et al., *A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 799-803.
49. Cyster, J.G., et al., *Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 181-93.
50. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-9.
51. Gatto, D., et al., *Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 259-69.
52. Cozine, C.L., K.L. Wolniak, and T.J. Waldschmidt, *The primary germinal center response in mice*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 298-302.
53. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
54. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
55. Liu, Y.J., et al., *Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres*. Nature, 1989. **342**(6252): p. 929-31.
56. Han, S., et al., *Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40*

- ligand and B7-2 in established germinal centers.* J Immunol, 1995. **155**(2): p. 556-67.
57. Suzuki, K., et al., *Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells.* J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1485-93.
58. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme.* Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
59. Jacob, J., et al., *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells.* J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1293-307.
60. Ziegner, M., G. Steinhauser, and C. Berek, *Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants.* Eur J Immunol, 1994. **24**(10): p. 2393-400.
61. Jacob, J., et al., *Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres.* Nature, 1991. **354**(6352): p. 389-92.
62. Han, S., et al., *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance.* J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1635-44.
63. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
64. Karakawa, W.W., et al., *Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated Staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes.* Infect Immun, 1988. **56**(5): p. 1090-5.
65. Shimizu, A., et al., *Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain.* Cell, 1982. **28**(3): p. 499-506.
66. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation.* Immunity, 1996. **4**(3): p. 241-50.
67. Kosco, M.H., et al., *Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing.* Immunology, 1989. **68**(3): p. 312-8.
68. Coico, R.F., B.S. Bhogal, and G.J. Thorbecke, *Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin.* J Immunol, 1983. **131**(5): p. 2254-7.
69. Grant, J.A., B. Sanders, and L. Hood, *Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with*

- mammalian lambda chains*. Biochemistry, 1971. **10**(16): p. 3123-32.
70. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
71. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-83.
72. Reynaud, C.A., V. Anquez, and J.C. Weill, *The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2661-70.
73. Weill, J.C. and C.A. Reynaud, *Early B-cell development in chickens, sheep and rabbits*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(2): p. 177-80.
74. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.
75. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
76. Davison, F.K., Bernd; Schat, Karel A., ed. *Avian Immunology Chapter 2*. First Edition ed. 2008, Elsevier Ltd. 1-481.
77. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in swine*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 199-221.
78. Jenne, C.N., L.J. Kennedy, and J.D. Reynolds, *Antibody repertoire development in the sheep*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 165-74.
79. Mage, R.G., D. Lanning, and K.L. Knight, *B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 137-53.
80. Biggs, P.M., *The association of lymphoid tissue with the lymph vessels in the domestic chicken (Gallus domesticus)*. Acta Anat (Basel), 1957. **29**(1-2): p. 36-47.
81. Olah, I. and B. Glick, *Avian lymph node: light and electron microscopic study*. Anat Rec, 1983. **205**(3): p. 287-99.
82. Steiniger, B., E.M. Timphus, and P.J. Barth, *The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(6): p. 641-8.
83. Jeurissen, S.H., *The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response*. Immunology, 1993. **80**(1): p. 29-33.

84. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
85. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
86. White, R.G., et al., *Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre*. Immunology, 1975. **28**(1): p. 1-21.
87. Yasuda, M., et al., *A comparative study of germinal center: fowls and mammals*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1998. **21**(3): p. 179-89.
88. Romppanen, T., *A morphometrical method for analyzing germinal centers in the chicken spleen*. Acta Pathol Microbiol Scand C, 1981. **89**(4): p. 263-8.
89. Imamura, K., et al., *Characteristic cellular composition of germinal centers*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2009. **32**(5): p. 419-28.
90. Vainio, O., M.K. Viljanen, and A. Toivanen, *Early ontogeny of germinal center formation in the chicken*. Dev Comp Immunol, 1978. **2**(3): p. 493-504.
91. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: II. Accumulation of apoptotic cells within the germinal center*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(2): p. 215-21.
92. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4232-41.
93. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 159-66.
94. Roehlich, K., *Beitrag zur Cytologie der Keimzentren der Lymphknoten Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 1930. **20**: p. 287-297.
95. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
96. Dillon, S.R., et al., *An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 235-46.
97. Liu, Y., et al., *Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 49-56.
98. Kimberley, F.C., et al., *The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking*. FASEB J, 2009. **23**(5): p. 1584-95.

99. Roschke, V., et al., *BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4314-21.
100. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling*. Semin Immunol, 2006. **18**(5): p. 263-75.
101. Huard, B., et al., *APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2887-95.
102. Woodland, R.T., et al., *Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival*. Blood, 2008. **111**(2): p. 750-60.
103. Patke, A., et al., *BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta- and Akt-dependent mechanism*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2551-62.
104. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
105. Mackay, F. and P. Schneider, *TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 263-76.
106. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
107. Scapini, P., F. Bazzoni, and M.A. Cassatella, *Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils*. Immunol Lett, 2008. **116**(1): p. 1-6.
108. Boule, M.W., et al., *Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1631-40.
109. Chu, V.T., et al., *In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5947-57.
110. Kern, C., et al., *Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway*. Blood, 2004. **103**(2): p. 679-88.
111. Abe, M., et al., *BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1313-5.
112. Alsaleh, G., et al., *BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated*



- by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. Arthritis Rheum*, 2007. **56**(10): p. 3202-14.
113. Allman, D., B. Srivastava, and R.C. Lindsley, *Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. Immunol Rev*, 2004. **197**: p. 147-60.
114. Gross, J.A., et al., *TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. Immunity*, 2001. **15**(2): p. 289-302.
115. Scholz, J.L., et al., *BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(40): p. 15517-22.
116. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp Med*, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
117. Castigli, E., et al., *Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(11): p. 3903-8.
118. Yan, M., et al., *Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. Nat Immunol*, 2001. **2**(7): p. 638-43.
119. Varfolomeev, E., et al., *APRIL-deficient mice have normal immune system development. Mol Cell Biol*, 2004. **24**(3): p. 997-1006.
120. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. Science*, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
121. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J Exp Med*, 2004. **199**(1): p. 91-8.
122. Rahman, Z.S., et al., *Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. J Exp Med*, 2003. **198**(8): p. 1157-69.
123. Vora, K.A., et al., *Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. J Immunol*, 2003. **171**(2): p. 547-51.
124. Groom, J.R., et al., *BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1959-71.
125. Thien, M., et al., *Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. Immunity*, 2004. **20**(6): p. 785-98.
126. Fletcher, C.A., et al., *Development of nephritis but not sialadenitis in*

- autoimmune-prone BAFF transgenic mice lacking marginal zone B cells.* Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2504-14.
127. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival.* Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
128. Staeheli, P., et al., *Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 993-1010.
129. Reddy, S.K., et al., *The BAFF-Interacting receptors of chickens.* Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1076-87.
130. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken.* Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
131. Pike, K.A., E. Baig, and M.J. Ratcliffe, *The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Igalpha and Igbeta in B-cell development.* Immunol Rev, 2004. **197**: p. 10-25.
132. Pike, K.A., et al., *The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to support efficient early B cell development.* J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2210-8.
133. Sayegh, C.E., et al., *Development of B cells expressing surface immunoglobulin molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the avian embryo bursa of fabricius.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10806-11.
134. Aliahmad, P., K.A. Pike, and M.J. Ratcliffe, *Cell surface immunoglobulin regulated checkpoints in chicken B cell development.* Vet Immunol Immunopathol, 2005. **108**(1-2): p. 3-9.
135. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition.* J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
136. Bockman, D.E. and M.D. Cooper, *Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study.* Am J Anat, 1973. **136**(4): p. 455-77.
137. Sorvari, T., et al., *Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius.* Nature, 1975. **253**(5488): p. 217-9.
138. Schaffner, T., et al., *The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content.* Cell Immunol, 1974. **13**(2): p. 304-12.
139. Darce, J.R., et al., *Regulated expression of BAFF-binding receptors during*

- human B cell differentiation*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7276-86.
140. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1619-28.
141. Schenk-Weibhauser, K., *Etablierung der RCAS-Gentransfertechnologie zur Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Haushuhn*, in *Institute for Animal Physiology*. 2009, LMU Munich: Munich. p. 1-185.
142. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1994. **24**(2): p. 458-63.
143. Veromaa, T., et al., *Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens*. Hybridoma, 1988. **7**(1): p. 41-8.
144. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 375-80.
145. Luhtala, M., et al., *Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species*. Hybridoma, 1993. **12**(6): p. 633-46.
146. Luhtala, M., et al., *Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes*. Scand J Immunol, 1995. **42**(1): p. 171-4.
147. Erhard, M.H., et al., *Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies*. Poult Sci, 1992. **71**(2): p. 302-10.
148. Jeurissen, S.H., et al., *Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of fabricius, and spleen of the chicken*. Vet Immunol Immunopathol, 1988. **19**(3-4): p. 225-38.
149. Mast, J., et al., *Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **61**(2-4): p. 343-57.
150. Baker, S.A., K.A. Baker, and T. Hagg, *Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(2): p. 575-9.
151. Kothlow, S., et al., *Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies*. Dev Comp Immunol, 2005. **29**(8): p. 733-48.
152. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **55**(1-3): p. 225-34.

153. Seeliger, C., *Entwicklung eines durchflusszytometrischen Verfahrens zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Thrombozytenzahl sowie zur Leukozytendifferenzierung beim Huhn*, in *Institute for Animal Physiology*. 2009, LMU Munich: Munich. p. 202.
154. White, R.G., V.I. French, and J.M. Stark, *A study of the localisation of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centres*. *J Med Microbiol*, 1970. **3**(1): p. 65-83.
155. Jeurissen, S.H. and E.M. Janse, *Germinal centers develop at predilicted sites in the chicken spleen*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **355**: p. 237-41.
156. Allen, C.D., et al., *Imaging of germinal center selection events during affinity maturation*. *Science*, 2007. **315**(5811): p. 528-31.
157. Jacob, J., C. Miller, and G. Kelsoe, *In situ studies of the antigen-driven somatic hypermutation of immunoglobulin genes*. *Immunol Cell Biol*, 1992. **70** ( Pt 2): p. 145-52.
158. Hardie, D.L., et al., *Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(5): p. 997-1004.
159. Phan, T.G., E.E. Gray, and J.G. Cyster, *The microanatomy of B cell activation*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(3): p. 258-65.
160. Linterman, M.A. and C.G. Vinuesa, *Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function*. *Semin Immunopathol*, 2010. **32**(2): p. 183-96.
161. Mast, J. and B.M. Goddeeris, *CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken*. *Cell Tissue Res*, 1998. **291**(1): p. 107-15.
162. Jefferis, R., *Rheumatoid factors, B cells and immunoglobulin genes*. *Br Med Bull*, 1995. **51**(2): p. 312-31.
163. Spolski, R. and W.J. Leonard, *IL-21 and T follicular helper cells*. *Int Immunol*, 2010. **22**(1): p. 7-12.
164. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 324-35.
165. Koni, P.A. and R.A. Flavell, *Lymph node germinal centers form in the absence of follicular dendritic cell networks*. *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 855-64.

## 10 Anhang

### A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- 1 Biontex, München
- 2 Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande
- 3 Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
- 4 Medite, Burgdorf
- 5 Applichem, Darmstadt
- 6 CLN, Freising
- 7 Hartenstein, Würzburg
- 8 Polysciences, Eppelheim
- 9 Neolab, Heidelberg
- 10 Linaris, Wertheim-Bettingen
- 11 Dianova, Hamburg
- 12 Jackson Immuno Research Europe, Newmarket, UK
- 13 Invitrogen, Karlsruhe
- 14 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham/USA
- 15 Thermo Fisher, Schwerte
- 16 Biochrom, Berlin
- 17 Henry Schein Medical, Hamburg
- 18 Carl Roth, Karlsruhe
- 19 Air Liquide, Düsseldorf

**B Geräte in alphabetischer Reihenfolge**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe	HLC, AF204	Heaep Labor Consult, Bovenden
Brüter	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Brutschrank	MCO-5AC	Sanyo, München
Durchflusszytometer	FACS Canto Software: FACSDiva	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryotom	HM500 OM	Microm/Thermo Scientific, Walldorf
Mikroskop	Leica LMD6000 Kamera:DFC400	Leica, Bensheim
Mikroskop	Leica DMR Kamera: DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikroskop	Axiovision Kamera: AxioCAM MRc5	Zeiss, Jena
Mikroskop	Axiovert 25 HBO-50/AC	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Plattenwaschgerät	ELISA-Washer Atlantis 2	Asys, Dornstadt
Rotationsmikrotom	HM360	Microm, Walldorf
Schleifwerkzeug	Dremel MultiPro	Dremel, Leinfelden-Echterdingen
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS12	Heraeus Instruments, München
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Dr. Sonja Härtle und Professor Dr. Bernd Kaspers bedanken für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Beide waren stets als Ansprechpartner zu technischen oder organisatorischen Fragen greifbar und unterstützen mich auch, wenn mehrere Hände zur Durchführung größerer Tierversuche benötigt wurden. Aber vor allem trugen sie durch ausgiebige, konstruktive Diskussionen zum Fortschritt dieser Arbeit bei und vermittelten mir so große Freude und Motivation am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ich bedanke mich bei meinem Papa Reinhard Hainke, der mich bei meinem Studium und so auf dem Weg zu dieser Doktorarbeit unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger bedanke ich mich herzlich für den am Institut für Tierphysiologie zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein Dank gilt auch der DFG, die im Rahmen des GRK1029 „Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin“ ein Stipendium für meine Doktorarbeit zur Verfügung stellte. Bei allen Initiatoren und aktiven Lehrenden sowie Mitdoktoranden des GRK 1029 bedanke ich mich für die Bereicherung durch den fachlichen Austausch und die Lehre im Rahmen dieses Programmes.

Bei Dr. Andreas Blutke vom Institut für Tierpathologie, Tierärztliche Fakultät München bedanke ich mich für die Einweisung in die Morphometrie von Geweben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Sinowatz und Silvia Mitterer vom Lehrstuhl für Anatomie, Embryologie und Histologie, Tierärztliche Fakultät München bedanke ich mich für die Nutzung der Einrichtungen für Paraffin- und Kryohistologie.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie und besonders jenen der AG Kaspers für die nette Arbeitsatmosphäre und jegliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka. Bei Fritz Meggendorfer bedanke ich mich für die entspannte Zusammenarbeit bei vielen Probennahmen.

Marina Kohn und Beatrice Schärer danke ich für die Unterstützung bei

Durchflusszytometrie und ELISA und die zuverlässige Versorgung mit Endorphinen.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Schwester Bettina Hainke und bei Wolfgang Schusser, die diese Arbeit korrekturgelesen haben.

Ich bedanke mich bei allen meinen Mitdoktoranden der AG Kaspers, besonders bedanke ich mich bei Carsten Krohmann, Katharina Schenk-Weibhauser, Ute Breithaupt, Julia Korte, Stephan Schmieder und Benjamin Schusser für die gemeinsame Zeit und unsere gemeinsame Aktion Vetdocs München e.V.

Zuletzt bedanke ich mich bei Dr. Benjamin Schusser, der mir immer zugehört hat, immer hinter mir stand und immer für mich da war.