

# **Generierung und Charakterisierung neuer Marker für Hühner B-Zellen**

**Eva-Maria Rottach**

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

Angefertigt unter der Leitung  
von Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

# **Generierung und Charakterisierung neuer Marker für Hühner B-Zellen**

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

von  
Eva-Maria Rottach  
aus Schönbrunn

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner  
Prof. Dr. H. Kaltner  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Tag der Promotion: 21.Juli 2012

*Ich bin ein Teil von Euch - ihr seid ein Teil von mir.*

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Die B-Zellentwicklung beim Säuger</b>	<b>3</b>
2.1.1 Der B-Zellrezeptor und die Immunglobuline	3
2.1.2 Generierung des primären Antikörper-Repertoires	6
2.1.3 B-Zellsubtypen	10
2.1.4 B-Zellentwicklung in der Peripherie	11
<b>2.2 Die B-Zellentwicklung beim Huhn</b>	<b>19</b>
2.2.1 Struktur der Bursa Fabricii	19
2.2.2 Prä-bursale Phase	20
2.2.3 Bursale Phase	22
2.2.4 Post-bursale Phase	23
<b>2.3 B-Zellmarker bei Mensch und Maus</b>	<b>24</b>
2.3.1 CD19 (B4)	26
2.3.2 CD21/CD35	26
2.3.3 CD27	27
2.3.4 IgM und IgD	27
2.3.5 CD23	28
2.3.6 CD38	29
2.3.7 CD40	29
2.3.8 CD138 (Syndecan-1)	30
<b>2.4 Möglichkeiten verschiedene B-Zell-Subpopulationen beim Huhn zu unterscheiden</b>	<b>31</b>
2.4.1 Bu-1 (chB6)	31
2.4.2 Sialyl-LewisX/ LewisX	32
2.4.3 CD40	33
2.4.4 FITC-Labeling	33
2.4.5 Ov-Antigen (chL12)	34

---

2.4.6	CD80 (B7.1)	34
2.4.7	CD57	35
2.4.8	Anti Ig-Antikörper	35
<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiere und Tierhaltung</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Gewinnung von primären Hühnerleukozyten</b>	<b>38</b>
4.2.1	Material	38
4.2.2	Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL)	39
4.2.3	Gewinnung von Leukozyten aus Organen	39
4.2.4	Gewinnung von Leukozyten aus embryonalen Organen	40
<b>4.3</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>41</b>
4.3.1	Medien und Zusätze	41
4.3.2	Verwendete Zelllinien	42
4.3.3	Stimulierung von Milzzellen mit CD40-Ligand	42
4.3.4	Einfrieren von Zellen	43
4.3.5	Auftauen von Zellen	43
<b>4.4</b>	<b>Gewinnung von monoklonalen Antikörpern</b>	<b>43</b>
4.4.1	Immunisierung von Mäusen	43
4.4.2	Fusion von Sp2/0-Zellen mit Maus-Milzzellen	44
4.4.3	Testen der Fusion	45
4.4.4	Reklonierung	45
<b>4.5</b>	<b>Klonierung von chCD138 mittels des GFP Fusion TOPO<sup>®</sup>TA Expression Kits</b>	<b>46</b>
4.5.1	Primer	46
4.5.2	Polymerase Kettenreaktion	46
4.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	47
4.5.4	Aufreinigung von DNA	49
4.5.5	Anfügen von A`-Überhängen	49
4.5.6	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA	50
4.5.7	Transformation von Bakterien	51
4.5.8	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien	52
4.5.9	Erfolgskontrolle der Ligation	52
<b>4.6</b>	<b>Rekombinante Expression von chCD138 (K116) in eukaryotischen Zellen</b>	<b>53</b>
4.6.1	Transiente Transfektion von HEK 293-T-Zellen	53
4.6.2	Stabile Transfektion von HEK 293 Zellen	54

---

<b>4.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</b>	<b>56</b>
4.7.1 Material	56
4.7.2 Durchführung	57
<b>4.8 Durchflusszytometrie</b>	<b>58</b>
4.8.1 Material	58
4.8.2 Einfachfärbung indirekt	61
4.8.3 Einfachfärbung direkt	62
4.8.4 Mehrfachfärbung indirekt	62
4.8.5 Mehrfachfärbungen direkt	62
4.8.6 Messung der Proben und Auswertung	63
<b>4.9 Histologie</b>	<b>63</b>
4.9.1 Material	63
4.9.2 Entnahme von Organen und Vorbereitung für die Histologie	64
4.9.3 Herstellung von Gewebeschnitten	64
4.9.4 Vorbereitung der Schnitte für die Färbungen	65
4.9.5 Immunhistologische Färbungen	65
4.9.6 Fotodokumentation der histologischen Färbungen	66
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Charakterisierung bereits vorhandener Antikörper</b>	<b>67</b>
5.1.1 Antikörper 3H7, 8D12, 28-4 und 4A5	67
5.1.2 Antikörper gegen Sialyl-LewisX und LewisX	73
<b>5.2 Monoklonale Antikörper gegen Hühner-Bursazellen</b>	<b>76</b>
5.2.1 Screening auf Bursazellen	76
5.2.2 Färbung auf Milzzellen und PBL	78
5.2.3 Test auf Immunglobulin-Reaktivität	81
5.2.4 Test auf CD45 transfizierten Zellen	81
5.2.5 Gruppierung der Klone	82
5.2.6 Reklonierung und Isotypbestimmung	84
5.2.7 Charakterisierung auf embryonalen Organen	85
5.2.8 Doppelfärbungen auf Bursa	87
5.2.9 Immunhistologie	89
<b>5.3 Antikörper gegen chCD138</b>	<b>94</b>
5.3.1 Erstellung des Immunisierungskonstrukts	94
5.3.2 Eukaryotische Expression von chCD138 in HEK 293-Zellen	94
5.3.3 Screening auf stabil transfizierten 293chCD138GFP-Zellen	95
5.3.4 Isotypbestimmung	95

---

5.3.5	Test auf verschiedenen Organen	95
5.3.6	Doppelfärbungen auf peripheren Blutleukozyten	98
5.3.7	Immunhistologie auf Milzschnitten	100
5.3.8	Immunhistologie auf Schnitten von Caecaltonsillen	101
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>103</b>
<b>6.1</b>	<b>Charakterisierung bereits vorhandener Marker</b>	<b>103</b>
6.1.1	3H7 und 8D12	103
6.1.2	28-4	104
6.1.3	4A5	105
6.1.4	CD15/CD15s	106
<b>6.2</b>	<b>Antikörper gegen Hühner Bursa-Zellen</b>	<b>108</b>
6.2.1	2C10	108
6.2.2	5F3	109
6.2.3	6E7	110
6.2.4	10C12	111
6.2.5	14C4	112
6.2.6	20C4	113
<b>6.3</b>	<b>Antikörper gegen chCD138</b>	<b>115</b>
<b>6.4</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	<i>B cell activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BAFFR	BAFF-Rezeptor
Bcl2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	B-Zellrezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
BLIMP-1	<i>B-lymphocyte induced maturation protein 1</i>
BP-1	<i>binding protein 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C3d	Komplement-Fragment 3d
CCR7	<i>cc-chemokine receptor 7</i>
CCL19	<i>cc-chemokine receptor 19</i>
CCL21	<i>cc-chemokine ligand 21</i>
CD19	<i>cluster of differentiation 19</i>
CD21	<i>cluster of differentiation 21</i>
CD23	<i>cluster of differentiation 23</i>
CD27	<i>cluster of differentiation 27</i>
CD35	<i>cluster of differentiation 35</i>
CD38	<i>cluster of differentiation 38</i>
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i>
CD40L	CD40-Ligand
CD57	<i>cluster of differentiation 57</i>
CD80	<i>cluster of differentiation 80</i>
CD81	<i>cluster of differentiation 81</i>
CD138	<i>cluster of differentiation 138</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
chCD138	<i>chicken CD138</i>
CHIR	<i>chicken Ig like receptor</i>
CR	<i>complement receptor</i>
C-Region	konstante Region des Immunglobulinmoleküls
CXCL	<i>cxc-chemokine ligand</i>
CXCR4	<i>cxc-chemokine receptor 4</i>
CXCR5	<i>cxc-chemokine receptor 5</i>
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle
D <sub>H</sub>	Diversitäts-Segment der schweren Kette
D <sub>L</sub>	Diversitäts-Segment der leichten Kette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBF	früher B-Zell Faktor ( <i>early b cell factor</i> )
EBI2	<i>Epstein-Barr virus induced molecule 2</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Embryonaltag
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuosorbent Assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FBS	fetales bovines Serum
Fc	konstanter Teil des Immunglobulinmoleküls ( <i>fragment crystalizable</i> )
FDC	follikulär dendritische Zelle ( <i>follicular dendritic cell</i> )
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
G	Gauge
G	Erdschwerebeschleunigung
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe ( <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
GC	germinales Zentrum

GFP	<i>green fluoescent protein</i>
HAT-Medium	Hypoxanthin- Aminopterin-Thymidin Medium
HT-Medium	Hypoxanthin- Thymidin Medium
Ig	Immunglobulin
Ig <sub>H</sub>	schwere Kette des Immunglobulinmoleküls
Ig <sub>L</sub>	leichte Kette des Immunglobulinmoleküls
Ig $\alpha$	Signalprotein $\alpha$ der Immunglobulinsuperfamilie
Ig $\beta$	Signalprotein $\beta$ der Immunglobulinsuperfamilie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
LB-Agar	Luria-Broth-Base Agar
LFA	<i>lymphocyte function antigen</i>
L-Kette	leichte Kette des Immunglobulin-Moleküls
LSL	<i>Lohmann's selected leghorn</i>
M11	Hühnerlinie mit B <sup>2/2</sup> -Haplotyp
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MCH	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
Min	Minuten
muIg	Maus Ig (murines Ig)
MZ	Marginalzone
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PALS	periarterielle lymphatische Scheide
Pax-5	<i>paired box protein 5</i>
PE	Phycoerythrin
PELS	perieiploide lymphatische Scheide
PBL	periphere Blut-Leukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
PI	Propidium-Iodid
POD	Meerrettich-Peroxidase
RAG	<i>recombination activating genes</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SSC	Maß für die Granularität der Zellen (side scatter channel)
sIgM	oberflächliches IgM-Molekül ( <i>surface IgM</i> )
SOC-Medium	Salz-optimiertes Medium mit Glukose ( <i>salt-optimized+carbon</i> )
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TD	Thymus-abhängig ( <i>thymus dependent</i> )
Th-Zelle	T-Helferzelle
TID	<i>Thymus-unabhängig (thymus independent)</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V-Region	variable Region des Immunglobulin-Moleküls
V <sub>H</sub>	variables Segment der schweren Kette
V <sub>L</sub>	variables Segment der leichten Kette
ZKÜ	Zellkulturüberstand
7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Modell eines Immunglobulins.....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 2 Überblick über die B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus.....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3 Schematische Darstellung der Generierung des Immunglobulinrezeptors .....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 4 Schematische Darstellung eines gerinalen Zentrums .....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 5 Darstellung eines Bursafollikels.....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 6 Vergleichende Darstellung der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus .....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 7 Beispielhafte Darstellung einer Doppelfärbung gegen AV20. ....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 8 Test der Antikörper auf verschiedenen Organen.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 9 Test der Antikörper auf Bursazellen .....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 10 Test der Antikörper auf stimulierten Milzzellen .....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 11 Test der Antikörper CD15 und CD15s auf Bursazellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 12 Färbung verschiedener Organe mit den Antikörpern CD15 und CD15s.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 13 Frequenz der B-Zellen die von den 23 ausgewählten Klonen erkannt wurden. ....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 14 Test der generierten Antikörper auf peripheren Blutleukozyten (PBL).....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 15 Test der generierten Antikörper auf Milzzellen .....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 16 Test der Antikörper im ELISA .....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 17 Test auf chCD45-transfizierten 293T-Zellen.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 18 Test der Antikörper auf Bursazellen nach Reklonierung.....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 19 Test der generierten Antikörper auf embryonaler Bursa und Milz.....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 20 Doppelfärbungen der Antikörper gegen CD45, CD40 und L-Kette.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 21 Test der generierten Antikörper in immunhistologischen Färbungen auf Bursaschnitten.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 22 Test der generierten Antikörper in immunhistologischen Färbungen auf Milzschnitten.....</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 23 Test der stabil transfizierten 293-HEK-Zellen .....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 24 Test der Klone auf 293chCD138GFP-Zellen. ....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 25 Test der anti-chCD138 Antikörper auf peripheren Blutleukozyten. ....</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 26 Test der anti-chCD138 Antikörper auf Milzzellen.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 27 Test der anti-chCD138 Antikörper auf Zellen aus Caecaltonsillen.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 28 Test der anti-chCD138 Antikörper auf Zellen aus Knochenmark. ....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 29 Doppelfärbungen der anti-chCD138-Antikörper auf peripheren Blutleukozyten .....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 30 Immunhistologische Färbung der generierten Antikörper auf Milz-Schnitten.....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 31 Immunhistologische Färbungen auf Schnitten von Caecaltonsillen.....</i>	<i>102</i>

**Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Übersicht über die B-Zellmarker bei Mensch und Maus .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 2: verwendete Zelllinien .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3: Im ELISA eingesetzte Antikörper .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 4: Primär-Antikörper für die Durchflusszytometrie .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 5: Direkt-konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 6: Sekundär-Antikörper für die Durchflusszytometrie .....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 7: Zu testende Antikörper .....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht über die Färbemuster der Klone auf den verschiedenen Organen .....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 9: Isotyp der generierten Antikörper .....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 10: Übersicht über das Färbemuster der Antikörper auf Gefrierschnitten von adulter Bursa und Milz. ....</i>	<i>93</i>

# 1 Einleitung

Weltweit gibt es bereits über 16 Milliarden Hühner. Da das Huhn als lebensmittellieferndes Tier von großer Bedeutung ist, und diese Bedeutung durch die Zunahme der Weltbevölkerung in den nächsten Jahren noch steigen wird, nimmt die Anzahl der Hühner, die zu diesem Zwecke gehalten wird, stetig zu. In der Wirtschaftsgeflügelhaltung ist eine effektive Infektionskontrolle durch den Einsatz von Vakzinen entscheidend, da der Einsatz von Medikamenten bei lebensmittelliefernden Tieren limitiert ist. Sowohl die Entwicklung geeigneter Impfstoffe, als auch die Züchtung resistenter Hühnerlinien ist davon abhängig, dass die Abläufe im aviären Immunsystem von Grund auf verstanden werden.

Das Immunsystem des Huhnes weist jedoch einige Unterschiede zu dem des Säugers auf. So konnte bereits in den späten 50er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Bruce Glick und Timothy Chang gezeigt werden, dass die der Klasse Aves eigene Bursa Fabricii- eine dorsale Ausstülpung der Kloake als primär-lymphatisches Organ eine entscheidende Rolle in der frühen Entwicklung der B-Zellen spielt [1]. Im Gegensatz zum Säuger, wo die Reifung der B-Zellen im Knochenmark stattfindet, durchlaufen die aviären B-Zellen eine Reifungsphase in der Bursa Fabricii. Präbursale Stammzellen wandern zwischen dem achten und fünfzehnten Embryonaltag aus dem Knochenmark, der Milz und dem Dottersack in die Bursa Fabricii ein. Nachdem hier die Diversifizierung des B-Zellrezeptors zur Erkennung von Antigenen stattgefunden hat und die B-Zellen mit einem funktionellen B-Zellrezeptor selektiert wurden, beginnen die maturen, jedoch naiven B-Zellen um den Zeitpunkt des Schlupfes herum aus der Bursa Fabricii auszuwandern. Die molekularen Ereignisse der B-Zellrezeptor-Diversifizierung sind auch beim Vogel sehr genau untersucht, was die weitere Entwicklung der B-Zellen nach Verlassen der Bursa Fabricii anbelangt, sind dagegen noch viele Fragen offen. Ein Grund hierfür ist die fehlende Möglichkeit verschiedene Populationen von B-Zellen beim Huhn anzusprechen. Im Säuger ist für die verschiedenen Entwicklungsstadien der B-Zellen eine Vielzahl von Oberflächenmarkern bekannt, aus der Kombination von diesen lassen sich einzelne Subpopulationen von B-Zellen, wie zum Beispiel Gedächtnis-B-Zellen, germinale Zentrums-B-Zellen oder Plasmazellen sehr genau ansprechen. Für das Huhn gibt es zwar Antikörper, die B-Zellen erkennen, jedoch ist es mit diesen nicht möglich, verschiedene B-Zellsubpopulationen anzusprechen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher bereits

vorhandene Marker auf ihre Reaktivität mit Hühner-B-Zellen getestet werden und es sollten neue Marker für Hühner B-Zellen generiert werden, mit denen verschiedene Subpopulationen von B-Zellen angesprochen werden können.

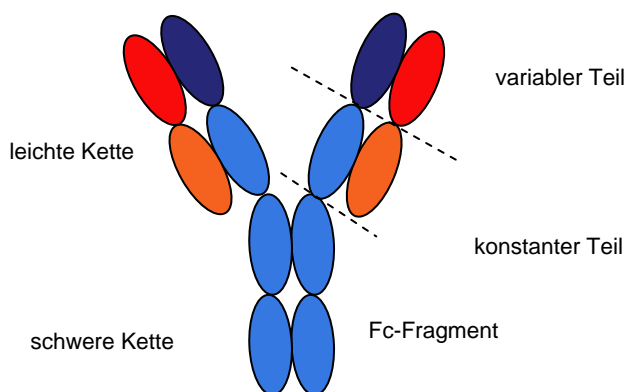
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die B-Zellentwicklung beim Säuger

B-Zellen sind ein essentieller Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, Antikörpermoleküle als Effektormoleküle zu produzieren. Dabei erhalten sie zum Teil Hilfe von spezialisierten T-Zellen. Die von den B-Zellen gebildeten Antikörper können Pathogene oder deren Produkte erkennen. Wenn ein solches körperfremdes Antigen durch Bindung eines Antikörpers markiert (opsonisiert) wird, werden weitere Effektormechanismen der Immunantwort aktiviert. Diese bewirken eine Eliminierung des eingedrungenen Antigens.

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

Jede reife B-Zelle trägt auf ihrer Zelloberfläche membranständige Antikörpermoleküle (Immunglobuline) als B-Zellrezeptoren. Mit diesen Rezeptoren kann die B-Zelle spezifisch eine bestimmte Struktur (Epitop) eines Antigens erkennen. Ein Immunglobulin-Molekül besteht aus vier Untereinheiten, zwei schweren und zwei leichten Ketten [2]. Jede Kette setzt sich aus einem variablen Teil (V-Region), der der Antigenerkennung dient und einem konstanten Teil (C-Region), der die Effektorfunktionen vermittelt, zusammen [3]. Beim membrangebundenen B-Zellrezeptor ist dieser Teil in die Zellmembran eingebaut. Der distale Teil der C-Region wird auch als Fc-Teil bezeichnet. Durch seinen Fc-Teil kann ein Antikörper, wenn er in löslicher Form vorkommt an Fc-Rezeptoren auf anderen Zellen des Immunsystems binden [4].



**Abbildung 1: Modell eines Immunglobulins**

Die schwere Kette ist in blau dargestellt, die leichte Kette in rot. Der dunkle Teil zeigt jeweils den variablen Teil, der helle Bereich stellt den konstanten Teil des Immunglobulins dar.

Erkennt eine reife, naive B-Zelle mittels ihres B-Zellrezeptors ihr spezifisches Antigen, so wird sie aktiviert [5]. Die Erkennung und Bindung eines Antigens durch den B-Zellrezeptor alleine reicht aber nicht aus, um eine naive B-Zelle zu aktivieren [6]. Die Signale, die dafür zusätzlich nötig sind, stammen entweder von T-Helferzellen oder manchmal auch direkt von mikrobiellen Bestandteilen [7]. Für Antikörperreaktionen auf Proteinantigene sind antigenspezifische T-Zellen nötig. Tiere und Menschen denen die T-Zellen fehlen können keine Antikörperreaktion gegen diese Antigene auslösen. Deshalb werden diese als thymusabhängige (*thymus-dependent*) oder TD-Antigene bezeichnet. Damit eine B-Zelle Hilfe von einer T-Zelle erhalten kann, muss sie das Antigen auf ihrer Oberfläche in einer Form präsentieren, die eine T-Zelle erkennen kann. Dies geschieht dadurch, dass ein Antigen, das über den B-Zellrezeptor gebunden wurde, in die Zelle aufgenommen, dort prozessiert und schließlich auf MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird. T-Helferzellen, die den Peptid-MHC-Komplex erkennen, übermitteln der B-Zelle dann Aktivierungssignale [8]. Viele Bestandteile von Mikroorganismen -wie bakterielle Polysaccharide- können die Bildung von Antikörpern auch ohne T-Helferzellen auslösen. Diese werden als thymusunabhängige (*thymus-independent*) oder TI-Antigene bezeichnet. Damit durch derartige Antigene eine Antikörperantwort hervorgerufen werden kann, ist ein zweites Signal nötig. Dieses kann zustande kommen, wenn die B-Zellrezeptoren durch sich wiederholende Epitope auf dem Bakterium quervernetzt werden [9].

Nach der Aktivierung der B-Zelle kommt es zunächst zu einer initialen Proliferation und im Folgenden differenziert sich die Zelle zur B-Gedächtniszelle oder zur Plasmazelle. Eine Plasmazelle trägt das Immunglobulin-Molekül nun nicht mehr als Rezeptor auf ihrer Oberfläche, sondern sie beginnt Antikörper zu sezernieren. Die B-Gedächtniszellen tragen weiterhin ihren antigenspezifischen B-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Bei erneutem Antigenkontakt können diese Zellen schneller antigenspezifische Plasmazellen hervorbringen als bei der Erstantwort [10]. Die von den Plasmazellen produzierten Antikörper haben verschiedene Funktionen. Zum einen können sie eingedrungene Pathogene neutralisieren indem sie an sie binden. So können zum Beispiel durch Bindung an Adhäsionsmoleküle des Erregers weitere Zellinfektionen verhindert werden [11]. Zum anderen ist es möglich, dass Immunzellen, die den Fc-Teil des an das Pathogen gebundenen Antikörpers erkennen dieses aufnehmen und abtöten (Opsonisierung). Außerdem können Antikörper das Komplementsystem aktivieren. Komplementproteine



können dann die Opsonisierung des Pathogens verstärken, oder einige Bakterien direkt abtöten [12].

Antikörper werden anhand der konstanten Region ihrer schweren Kette in verschiedene Subklassen eingeteilt, beim Menschen gibt es neun Subklassen [13], bei der Maus kennt man acht verschiedene Isotypen [14]. Die fünf Hauptisotypen der Immunglobuline beim Säuger sind IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Sie können alle als membrangebundene Antigenrezeptoren oder als sezernierte Antikörper vorkommen. IgG-Antikörper werden beim Mensch in die vier Untergruppen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 eingeteilt. Von den IgA-Antikörpern gibt es beim Mensch zwei Unterklassen (IgA1 und IgA2). Sequenzunterschiede zwischen den schweren Ketten führen dazu, dass sich die verschiedenen Isotypen in verschiedenen Merkmalen charakteristisch voneinander unterscheiden. Dies betrifft die Zahl und Lokalisierung der Disulfidbrücken zwischen den Ketten, die Zahl der angehängten Oligosaccharidgruppen der konstanten Domänen und die Länge der Gelenkregion. Die schweren Ketten von IgM und IgE enthalten anstelle der Gelenkregion der  $\gamma$ -,  $\delta$ -, und  $\alpha$ - Kette eine zusätzliche konstante Domäne. Verschiedene Isotypen und Subklassen unterscheiden sich ferner in ihren Effektorfunktionen [4].

Die konstanten Regionen von Antikörpern haben im wesentlichen drei Effektorfunktionen. Zum einen werden die Fc-Bereiche verschiedener Isotypen von spezialisierten Fc-Rezeptoren erkannt, die von Immuneffektorzellen exprimiert werden. Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten binden Fc-Bereiche von IgG1- und IgG3-Antikörpern und erleichtern so die Phagozytose von Pathogenen an die diese Antikörper gebunden haben [15]. Zum anderen können die Fc-Anteile von Antigen-Antikörper-Komplexen an Komplementproteine binden und so die Komplementkaskade auslösen. Diese kann Phagozyten anlocken und aktivieren, die Phagozytose erleichtern und manche Krankheitserreger auch direkt abtöten [12]. Als dritte Funktion ist der Fc-Teil dazu nötig, Antikörper in Kompartimente zu befördern, in die sie nur mit Hilfe von aktiven Transportprozessen gelangen können. Dies betrifft Tränen, Milch und schleimige Absonderungen (IgA) sowie den fetalen Blutkreislauf bei Übertragung von der Mutter (IgG). Der Fc-Teil aktiviert hierbei jeweils einen spezifischen Rezeptor, der den aktiven Transport durch Zellen in andere Bereiche des Körpers steuert [16].

Im Laufe des Lebens muss sich der Organismus mit einer Vielzahl von Erregern auseinandersetzen. Damit das Immunsystem der großen Zahl an Pathogenen begegnen

kann, entsteht während der B-Zellentwicklung ein großes B-Zellrepertoire. Die Spezifität einer B-Zelle ergibt sich aus dem einzigartigen B-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Während der Generierung des primären Antikörperrepertoires entstehen B-Zellen, deren B-Zellrezeptor sich in der Antigenbindungsstelle jeweils mehr oder weniger stark von den anderen B-Zellen unterscheidet. So kann jede B-Zelle ein bestimmtes Antigen besonders gut mit ihrem Rezeptor erkennen, und ist somit spezifisch für dieses Antigen. Damit vom Organismus eine möglichst große Zahl an Fremdanthigenen erkannt werden kann, ist es das Ziel der B-Zellentwicklung, eine möglichst große Vielfalt an Antigenrezeptoren zu generieren [17].

### 2.1.2 Generierung des primären Antikörper-Repertoires

Die B-Zellentwicklung beginnt bei Mensch und Maus im Knochenmark, wo lebenslang B-Zellen nachgebildet werden [18]. Diese frühe Entwicklungsphase ist unabhängig von exogenen Antigenen [19]. Ausgangspunkt für die Entwicklung ist die hämatopoetische Stammzelle, aus der sowohl die Zellen der myeloiden, als auch der lymphoiden Reihe hervorgehen [20].

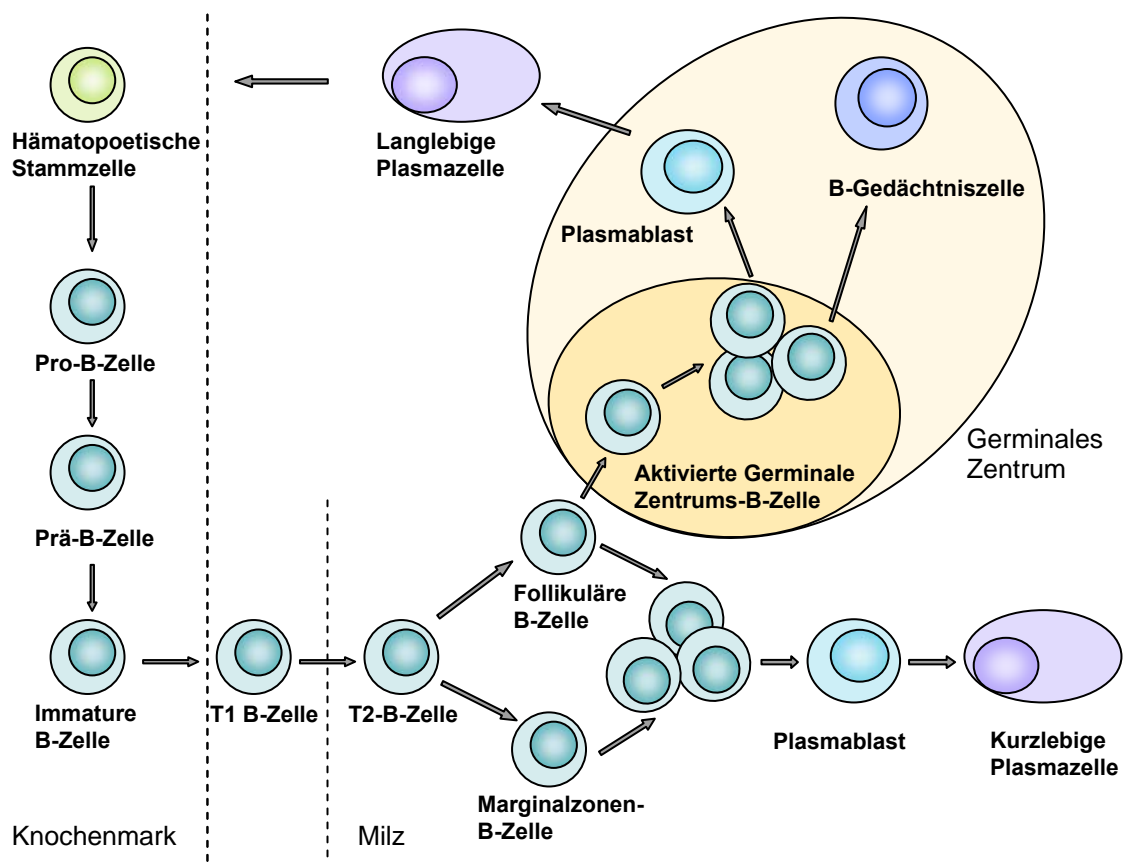


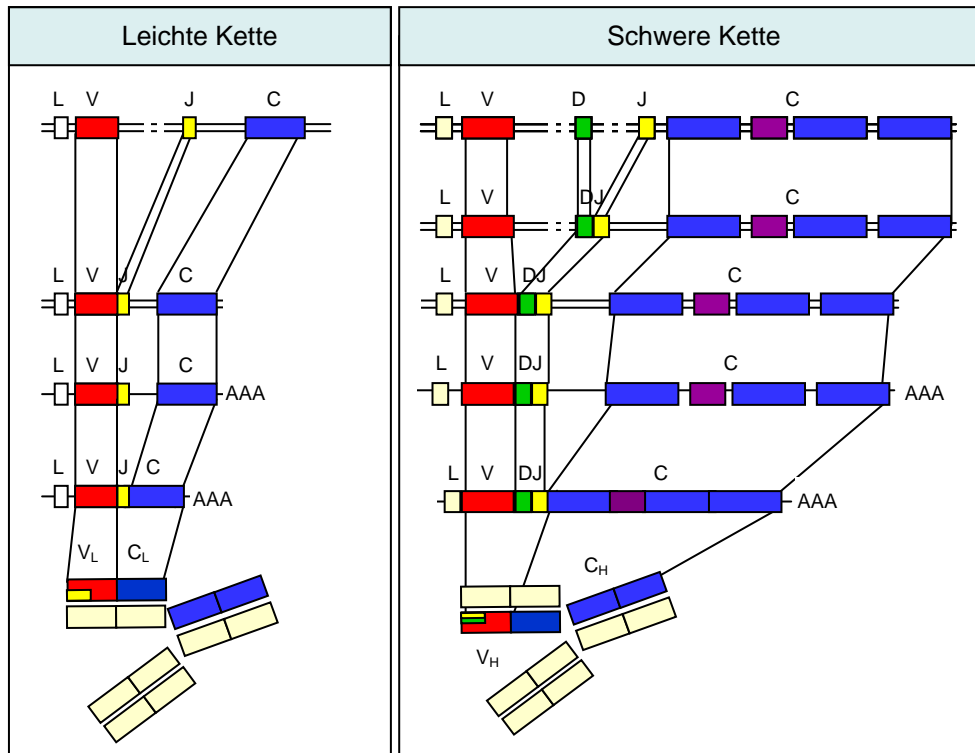
Abbildung 2: Überblick über die B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung im Knochenmark spielen die Stromazellen. Diese bilden zum einen über Zelladhäsionsmoleküle spezifische Kontaktstellen mit den sich entwickelnden Lymphozyten [21] und zum anderen produzieren sie Cytokine und Chemokine, die für die B-Zellentwicklung essentiell sind [22]. Über mehrere Zwischenstufen, die in ihrem Entwicklungspotential immer stärker eingeschränkt sind, entsteht aus der hämatopoetischen Vorläuferzelle die frühe pro-B-Zelle. Durch Induktion des B-Zellspezifischen Wachstumsfaktors E2A [23] und des frühen B-Zellfaktors (EBF) [24] wird diese in ihrer Entwicklung auf die B-Zelllinie festgelegt. Der frühe B-Zellfaktor bewirkt die Expression des Transkriptionsfaktors Pax-5, der wiederum die Expression von B-Zellspezifischen Proteinen, wie zum Beispiel des B-Zell- Ig $\alpha$  bewirkt [25].

In diesem Entwicklungsstadium beginnt das Rearrangement des Ig-Lokus. Beim Mensch und bei der Maus enthalten sowohl der Ig<sub>H</sub>- als auch die beiden Ig<sub>L</sub>-Loci ( $\lambda$ -leichte Kette und  $\kappa$ -leichte Kette) viele verschiedene funktionale V-, D- und J-Segmente. Damit die Zelle eine schwere bzw. leichte Ig-Kette exprimieren kann, ist es notwendig, dass die V-, D- und J-Segmente rearrangiert werden, sodass sie zu einem vollständigen Immunglobulingen kombiniert werden.

In Keimbahnkonfiguration enthält der Locus für die  $\lambda$  leichte Kette beim Menschen ca. 30 funktionale V $\lambda$  Gensegmente, gefolgt von vier J $\lambda$ - und C $\lambda$ - Segmenten, die abwechselnd angeordnet sind. Am Locus für die  $\kappa$  leichte Kette folgt auf ein Cluster von ca. 40 Segmenten für die V $\kappa$ -Gene ein Bereich mit fünf J $\kappa$ -Segmenten. Am Locus für die  $\kappa$  leichte Kette gibt es nur ein C $\kappa$ -Gensegment. Der Locus für die schwere Kette besteht ebenfalls aus ca. 40 V-Gensegmenten, im Unterschied zu den Genloci der leichten Ketten folgen hier aber 25 D<sub>H</sub>-Segmente auf die V<sub>H</sub>-Segmente. Weiterhin gibt es sechs J<sub>H</sub>-Gensegmente und ein Cluster verschiedener C-Segmente [26].

Für den Prozess des Genrearrangements werden RAG-1 und RAG-2 (recombination-activating genes), die nur zu bestimmten Zeitpunkten in der B-Zellentwicklung exprimiert werden, benötigt [27]. Diese Moleküle sind in der Lage, Doppelstrangbrüche an spezifischen Erkennungssequenzen in der Nähe der V-, D- und J-Elemente einzufügen [28]. Auf diesen Schritt folgt die Reparatur der Doppelstrangbrüche, bei der die V-, D- oder J-Segmente miteinander verknüpft werden, wobei die dazwischenliegende DNA herausgeschnitten wird. Dafür verantwortlich sind Enzyme, die nicht spezifisch für das Rearrangement des Ig-Lokus sind, sondern auch für Reparaturen der DNA bei Beschädigung zum Beispiel durch ionisierende Strahlung verantwortlich sind [29].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Generierung des Immunglobulinrezeptors**  
 Modifiziert nach Janeway's Immunobiology [26].

Das Rearrangement der Immunglobulinloci wird bei Mensch und Maus nacheinander durchgeführt. Zunächst erfolgt das Rearrangement am Locus der schweren Kette [30]. Dabei wird als erstes ein D-Segment mit einem  $J_H$ -Segment verknüpft. Das  $DJ_H$ -Rearrangement kennzeichnet den Übergang von der frühen zur späten pro-B-Zelle. In diesem Stadium findet dann das weitere IgH-Rearrangement statt, wobei ein  $V_H$ -Segment mit dem rearrangierten  $DJ_H$ -Segment verknüpft wird. Wenn diese Genumlagerung erfolgreich war, kann die Zelle eine vollständige  $\mu$ -Kette exprimieren. Da das Rearrangement des IgL-Lokus noch nicht stattgefunden hat, kann zu diesem Zeitpunkt aber noch keine Ig-L-Kette exprimiert werden. Stattdessen werden  $V_{preB}$  und  $\lambda 5$  exprimiert. Diese werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der Ig-L-Kette als sogenannte Ersatzketten (surrogate light chains) bezeichnet. Die schwere  $\mu$ -Kette kann nun mit  $V_{preB}$  und  $\lambda 5$  assoziieren, und zusammen mit dem  $Ig\alpha$ -/ $Ig\beta$ - ( $CD79\alpha$ / $CD79\beta$ ) Heterodimer den prä-B-Zellrezeptor bilden [31]. Sowohl  $Ig\alpha$  als auch  $Ig\beta$  besitzen in ihrem cytoplasmatischen Anteil jeweils ein sogenanntes ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motif), welches entscheidend ist für die Signalweiterleitung bei einer Aktivierung des B-Zellrezeptors [32].

Zellen, die einen prä-B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren werden als prä-B-Zellen bezeichnet. Die Zellen, die kein erfolgreiches Rearrangement des IgH-Lokus

durchlaufen, und daher keinen prä-B-Zellezeptor generieren können, gehen in Apoptose [33]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Ersatzkette als Vorlage für die leichte Kette dient, und somit durch diesen Schritt prä-B-Zellen eliminiert werden, die eine schwere Kette tragen, die wahrscheinlich nicht in der Lage wäre, richtig mit der leichten Kette zu assoziieren und einen funktionalen B-Zellrezeptor auszubilden [34]. Die Expression des prä-B-Zellrezeptors dient damit als Signal, dass das Rearrangement des IgH-Lokus erfolgreich war, daher stoppt an dieser Stelle die Genumlagerung am Locus der schweren Kette [35], und es wird eine massive Proliferation der prä-B-Zellen induziert [36].

Im Weiteren wird dann der Locus der leichten Ig-Kette rearrangiert. Dabei wird ein  $V_L$ -Segment mit einem  $J_L$ -Segment verknüpft. Die Zellen, bei denen das Ig-L-Rearrangement erfolgreich war, können dann auf ihrer Oberfläche einen B-Zellrezeptor exprimieren. Dieser besteht aus einer  $\mu$ - und einer  $\lambda$ - oder  $\kappa$ - Kette die assoziiert sind mit dem  $Ig\alpha/\beta$ -Komplex.

Diese Zellen werden als unreife B-Zellen bezeichnet, und emigrieren im Folgenden aus dem Knochenmark in die Peripherie. Wenn die B-Zellen nicht in der Lage sind, einen funktionalen B-Zellrezeptor zu exprimieren, werden sie noch im Knochenmark eliminiert. In der Maus werden täglich 10-20 Millionen unreife B-Zellen gebildet [37], von diesen erreichen nur ca. 10% die Peripherie und 70% der emigrierten Zellen scheinen nach wenigen Tagen zu sterben [38]. Das heißt nur ca. 3% der unreifen B-Zellen, die im Knochenmark gebildet wurden, werden zu reifen, langlebigen B-Zellen, die in der Maus für Monate [39], und beim Mensch vielleicht sogar für Jahrzehnte überleben können [40].

Da während der frühen Phase der B-Zellentwicklung wie angeführt eine Vielzahl verschiedener Antigenrezeptoren generiert werden, ist es entscheidend sicherzustellen, dass nur die naiven B-Zellen das Knochenmark verlassen, die nicht mit Autoantigenen reagieren. Wenn autoreaktive B-Zellen auf ein Antigen treffen, durch das sie aktiviert werden, ohne dass sie T-Zellhilfe erhalten, gibt es vier Möglichkeiten, was weiter mit der B-Zelle passieren kann. Zum einen kann es sein, dass die autoreaktive B-Zelle nach dem Antigenkontakt in Apoptose geht. Dies wird als klonale Deletion bezeichnet [41]. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass erneut ein Rearrangement des Immunglobulinlokus stattfindet. Dies wird als Rezeptor Editing bezeichnet, und kann dazu führen, dass die B-Zelle ihre Autoreaktivität verliert [42]. Wenn durch das Autoantigen nur eine schwache Quervernetzung der B-Zellrezeptoren stattfindet, wie zum Beispiel bei kleinen löslichen

Proteinen, dann werden die B-Zellen anergisch [43]. Im Zustand der Anergie können autoreaktive B-Zellen nicht durch das Autoantigen aktiviert werden, sie haben eine kurze Lebensdauer und ihre Fähigkeit mit immunkompetenten B-Zellen zu konkurrieren ist gering. Das vierte mögliche Schicksal einer autoreaktiven B-Zelle nach Antigenkontakt ist die immunologische Ignoranz. Eine immunologisch ignorante Zelle hat eine Affinität für das Antigen, erkennt es aber nicht, entweder weil das Autoantigen in unzugänglichen Stellen vorkommt, oder die Antigenkonzentration zu gering ist. Diese Zellen können unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden, zum Beispiel wenn das Autoantigen in ungewöhnlich hohen Dosen vorhanden ist [26].

### 2.1.3 B-Zellsubtypen

Nachdem die naiven, unreifen B-Zellen das Knochenmark verlassen haben wandern sie zunächst zur Milz. Dort durchlaufen sie die Übergangsstadien T1 und T2 [44] (siehe Abbildung 2). Zu einem kleinen Teil wandern die transitionalen (T2) B-Zellen in die Marginalzone der Milz und bleiben dort als naive, nicht rezirkulierende Marginalzonen-B-Zellen [45]. Die meisten der T2-B-Zellen reifen aber zu naiven, langlebigen folliculären B-Zellen die in die Follikel der Milz, zu den Lymphknoten und ins Knochenmark wandern. Dort treffen sie entweder auf ein Antigen, für das sie spezifisch sind und durchlaufen dann weitere Reifungsschritte, oder sie gehen zugrunde [46].

Die einzelnen Subpopulationen können aufgrund verschiedener Merkmale voneinander unterschieden werden. So gehören folliculäre B-Zellen zu den rezirkulierenden B-Zellen. Sie wandern über den Blutweg zwischen den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Tonsillen) umher. Auf der Suche nach Antigen durchwandern sie die primären B-Zellfollikel in diesen Organen, dabei halten sie sich etwa einen Tag in den B-Zellfollikeln auf, bevor sie ihre Wanderung fortsetzen [47]. Diese B-Zellpopulation weist eine große Variabilität der Antigenbindungsstelle des B-Zellrezeptors auf, daher sind die folliculären B-Zellen in der Lage, eine große Vielfalt an Antigenen zu erkennen. Folliculäre B-Zellen werden durch thymusabhängige Antigene (siehe 2.1.1) aktiviert [48].

Marginalzonen-B-Zellen befinden sich als weitgehend sessile Zellen in der Marginalzone der Milz. Durch ihre Lokalisation in der Nähe der Makrophagen die hier lokalisiert sind und Antigene aus dem Blut aufnehmen, kommen die Marginalzonen-B-Zellen vor allem mit Antigenen aus dem Blut in Kontakt [49]. Sie können sowohl durch T-zellabhängige als auch durch T-zellunabhängige Antigene aktiviert werden [50], wobei vor allem ihre

Reaktion auf T-zellunabhängige Antigene von Bedeutung ist [51]. Im Gegensatz zu den folliculären B-Zellen besitzen sie nur eingeschränkte Antigenespezifitäten, bei denen der Schwerpunkt auf häufigen Umweltantigenen und körpereigenen Antigenen liegt. Diese B-Zellen sind vermutlich darauf spezialisiert, gegen Antigene dieses Typs eine schnelle Immunantwort zu entwickeln. Von den folliculären B-Zellen unterscheiden sich die Marginalzonen-B-Zellen auch durch die Zusammensetzung ihrer Oberflächenmarker. So exprimieren sie nur geringe Mengen an CD23, während sie die zwei Rezeptoren CR1 (CD35) und CR2 (CD21) für das Komplementfragment C3 in großer Menge exprimieren [26].

Eine weitere Untergruppe der B-Zellen sind die B1-B-Zellen, die beim Mensch und der Maus etwa 5% aller B-Zellen ausmachen. Die Bezeichnung B1-B-Zellen entstand, weil sich diese Zellen von den „konventionellen“ B-Zellen, die als B2-B-Zellen bezeichnet werden, unterscheiden. Diese Zellen exprimieren CD5 auf ihrer Zelloberfläche, sie haben viel Oberflächen-IgM (sIgM) und nur wenig Oberflächen-IgD (sIgD). Auch ihre Rezeptorvielfalt ist eingeschränkt. Sie kommen vor allem in der Peritoneal- und Pleuralflüssigkeit vor, und können zu den mesenterialen Lymphknoten und der intestinalen Lamina propria wandern [50]. B1-B-Zellen tragen nur wenig zur adaptativen Immunantwort auf die meisten Proteinantigene bei, dagegen sind sie stark an einigen Antikörperantworten gegen Kohlenhydratantigene beteiligt. Außerdem stammt ein großer Teil des im Blut von nicht immunisierten Mäusen zirkulierenden IgM von den B1-Zellen. Diese sogenannten natürlichen Antikörper zeigen starke Kreuzreaktionen, aber ihre Affinität zu mikrobiellen und körpereigenen Antigenen ist gering. B1-B-Zellen in der Mukosa können zur T-zellunabhängigen IgA-Antwort beitragen [50]. Durch ihr begrenztes Rezeptor-Repertoire spielen sowohl die Marginalzonen-B-Zellen, als auch die B1-B-Zellen eine Rolle in der frühen, nichtadaptiven Phase einer Immunantwort [26].

#### **2.1.4 B-Zellentwicklung in der Peripherie**

Nachdem die B-Zellen aus dem Knochenmark ausgewandert sind, findet die weitere Entwicklung der B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen statt. Hier kommt es nach somatischer Hypermutation und Klassenwechsel letztendlich zur Bildung von hochaffinen, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen [52].

Wenn die B-Zellen aus dem Knochenmark auswandern sind sie noch funktionell unreif, sie exprimieren große Mengen an sIgM, aber nur wenig sIgD. Neu gebildete B-Zellen

gelangen über das Blut in die Milz, dort durchwandern sie zunächst die T-Zellzone und gelangen dann schließlich in die primären Lymphfollikel, die vor allem B-Zellen enthalten. B-Zellen bleiben etwa einen Tag in den Follikeln, wenn sie nicht auf ihr spezifisches Antigen treffen, und aktiviert werden und wandern dann zurück ins Blut [47]. B-Zellen exprimieren konstitutiv den Chemokinrezeptor CXCR5 auf ihrer Zelloberfläche, und werden durch den Liganden dieses Rezeptors – CXCL13 zu den Follikeln gelockt. CXCL13 wird von den follikulären dendritischen Zellen gebildet, möglicherweise auch von follikulären Stromazellen [53]. Im Follikel erhalten die B-Zellen Signale die für ihr Überleben essentiell sind. Eine wichtige Rolle spielt hier der B-Zell-aktivierende Faktor der TNF-Familie (BAFF), der von verschiedenen Zelltypen sezerniert wird und der zugehörige Rezeptor BAFF-R, der von den B-Zellen exprimiert wird [54]. Auch ständige Signale über den B-Zellrezeptor sind entscheidend für die Reifung und die permanente Zirkulation der peripheren B-Zellen. Dies konnte experimentell durch Mäuse, in denen durch Deletion eines Gens der B-Zellrezeptor auf reifen B-Zellen ausgeschaltet wurde, bestätigt werden. Diese Tiere haben keine reifen B-Zellen, obwohl sie unreife B-Zellen besitzen. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Signal über den B-Zellrezeptor nicht von antigenspezifischen Wechselwirkungen abhängt, sondern dass es durch den B-Zellrezeptor selbst ständig zur Aussendung eines schwachen Signals kommt [55].

Im Gegensatz zur vorhergehenden Reifung, sind die im Weiteren beschriebenen Entwicklungsschritte abhängig von exogenem Antigen. Wenn eine zirkulierende B-Zelle in Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen kommt, dann wird ihr ein Signal vermittelt, die Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche, zum Beispiel LFA-1, zu aktivieren. Somit werden wandernde B-Zellen festgehalten, sobald sie ihr spezifisches Antigen gebunden haben. B-Zellen, die über das Blut in die Milz gelangen durchwandern zunächst die T-Zellzone. Wenn eine zirkulierende B-Zelle im Blut oder im lymphatischen Gewebe an ihr spezifisches Antigen gebunden hat, dann wird sie in der T-Zellzone festgehalten. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die B-Zelle schließlich mit einer T-Helferzelle in Kontakt kommt, die für das gleiche Antigen spezifisch ist und von dieser ein Aktivierungssignal erhält. Auch B-Zellen, die in den Follikeln auf ihr Antigen treffen, wandern nach Erkennung des Antigens an die Grenze zur T-Zellzone [47]. Nach ihrer Aktivierung exprimieren die B-Zellen vermehrt CCR7. Die Liganden für CCR7, CCL19 und CCL21 werden von retikulären Zellen in der T-Zellzone produziert [56]. Dies ist der Grund für die Wanderung der aktivierten B-Zellen in Richtung der T-Zellzone. Da die B-Zellen gleichzeitig immer noch CXCR5 exprimieren, dessen Ligand CXCL13 von



follikulär dendritischen Zellen in der B-Zellzone exprimiert wird, ordnen sich die B-Zellen entsprechend ihrer Empfänglichkeit für die Chemokine an der Grenze zwischen B- und T-Zellzone an [57]. An dieser Stelle verweilen die B-Zellen ein bis zwei Tage, danach wird die Expression von CCR7 herunterreguliert und als Folge davon wandern die B-Zellen zusammen mit den T-Zellen von der Grenze zwischen B- und T-Zellzone weg, um ihre Proliferation und Differenzierung fortzusetzen [47]. Hierbei spielt EB12 (Epstein-Barr virus induced molecule 2) eine wichtige Rolle. Dieser Rezeptor wird bereits auf naiven B-Zellen exprimiert und nach Aktivierung der Zelle hochreguliert. Solange CXCR5 und CCR7 vorhanden sind dominieren die Effekte dieser Chemokine das Wanderverhalten der B-Zellen. Wenn aber CCR7 nach Aufenthalt der B-Zellen an der Grenze zur T-Zellzone herunterreguliert wird, tritt der Effekt von EB12 in den Vordergrund. Dieser bewirkt die Wanderung der Zellen zum äußeren Follikelbereich und zu Regionen zwischen den Follikeln [58].

In der Milz erfolgt die Wanderung zunächst an die Grenze von T-Zellzone und roter Pulpa. Hier entsteht ein Primärfokus der klonalen Vermehrung. In den Lymphknoten liegt der Primärfokus an den Marksträngen. Einige der proliferierenden B-Zellen differenzieren sich bereits im Primärfokus zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (siehe 2.1.4.3). Die anderen B-Zellen wandern aus dem Primärfokus zusammen mit den spezifischen T-Helferzellen in einen primären Lymphfollikel, wo sie die Bildung eines germinalen Zentrums induzieren. Für die Wanderung der B-Zellen in den primären Lymphfollikel ist die Herunterregulation von EB12 von großer Bedeutung [59]. Im germinalen Zentrum finden dann die weiteren Reifungs- und Differenzierungsschritte statt [60].

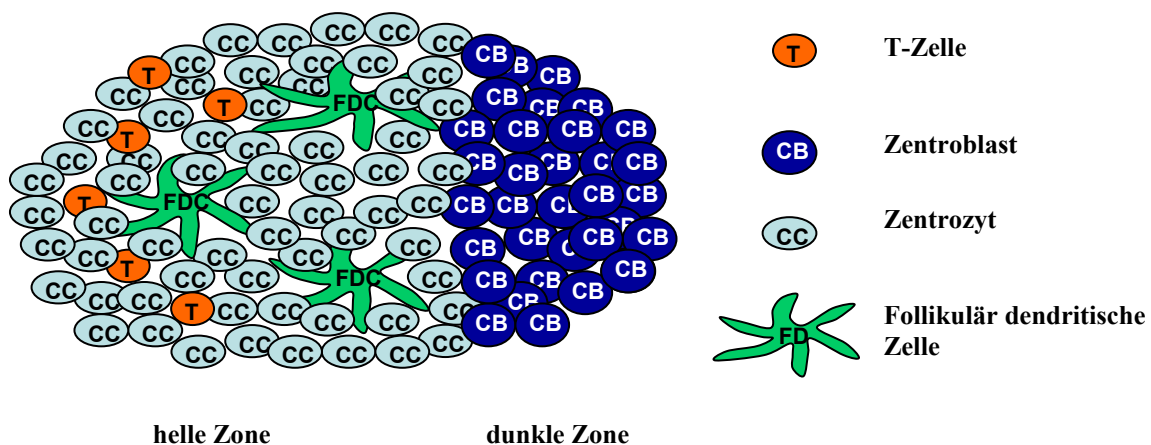
#### **2.1.4.1 Germinale Zentrumsreaktion**

Die frühen Ereignisse im Primärfokus bewirken eine schnelle Bildung spezifischer Antikörper, die den infizierten Organismus sofort schützen. Die Reaktion im Keimzentrum bietet dagegen eine effektive und spätere Antwort, wenn es zu einer chronischen Infektion kommt, oder das Individuum erneut infiziert werden sollte. Um dies zu gewährleisten durchlaufen die B-Zellen im germinalen Zentrum eine Reihe wichtiger Modifikationen. Dazu gehören die somatische Hypermutation durch die die Antigenbindungsstellen der Immunglobuline verändert werden, und wodurch eine Affinitätsreifung der B-Zellen erreicht wird. Außerdem findet ein Klassenwechsel statt, durch diesen ist es der B-Zelle

möglich, mittels verschiedener Isotypen von Antikörpern eine Vielzahl von Effektorfunktionen auszuüben. Die selektierten B-Zellen differenzieren sich letztendlich zu B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen, die dann Antikörper von höherer Affinität und einem anderen Isotyp sezernieren [61].

Im germinalen Zentrum findet zunächst eine starke Vermehrung der B-Zellen statt. Bei den rasch proliferierenden B-Zellen ist die Expression des Oberflächenimmunglobulins vor allem von IgD deutlich vermindert. Diese Zellen werden als Zentroblasten bezeichnet. Mit der Zeit verringern einige B-Zellen ihre Teilungsrate und exprimieren dann wieder mehr Oberflächenimmunglobulin, diese Zellen nennt man Zentrozyten [61].

Ein Keimzentrum besteht aus einer hellen und einer dunklen Zone umgeben von einer Mantelzone. In der hellen Zone befinden sich vor allem Zentrozyten, follikulär dendritische Zellen und  $CD4^+$  T-Zellen. In der dunklen Zone befinden sich die Zentroblasten die sich kontinuierlich teilen und Zentrozyten hervorbringen, die in die helle Zone wandern [62]. Die Mantelzone wird gebildet von ruhenden B-Zellen die von den proliferierenden Zentroblasten an den Rand des germinalen Zentrums gedrängt werden. Die Organisation des germinalen Zentrums in eine helle und dunkle Zone, kommt zustande durch einander entgegen wirkende Chemokingradienten von CXCL12 und CXCL13. Für eine Lokalisation in der dunklen Zone müssen die GC-B-Zellen große Mengen an CXCR4, dem Rezeptor für CXCL12 exprimieren [63].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines germinalen Zentrums**  
Modifiziert nach Gordon [64].

Antigenspezifische T-Helferzellen und Follikulär dendritische Zellen sind essentiell für die germinale Zentrumsreaktion [65]. Interaktionen zwischen CD40-Ligand auf der T-Zelle und CD40 auf der B-Zelle spielen dabei eine wichtige Rolle, genauso wie die Cytokine, die

von den T-Zellen exprimiert werden [6]. Die T-Helferzellen im germinalen Zentrum haben besondere Eigenschaften, so weisen sie eine hohe Expression des CXC-Chemokin Ligand 13 (CXCL13) auf, der dazu dient B-Zellen durch Chemotaxis in das germinale Zentrum zu locken [66], außerdem produzieren sie große Mengen an IL-21 [67]. Follikulär dendritische Zellen können über ihre Komplementrezeptoren (CD21 und CD35) und über Fc-Rezeptoren opsonisierte Antigene binden und diese so für lange Zeit im germinalen Zentrum speichern [68]. Antigene die auf diese Weise von follikulär dendritischen Zellen gespeichert werden, können über den B-Zellrezeptor erkannt und die B-Zelle so stimuliert werden.

Eine der oben genannten Veränderungen die die B-Zellen im germinalen Zentrum durchlaufen, ist die somatische Hypermutation. Durch diese wird eine Steigerung der Affinität für ein bestimmtes Antigen erreicht. Normalerweise findet eine somatische Hypermutation nur bei B-Zellen statt, die sich gerade im germinalen Zentrum vermehren [26]. Bei der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in den rearrangierten V-Regionen der Ig-Gene [69] oder in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft [70] eingefügt. Da durch diesen Mechanismus in großem Maße B-Zellen mit veränderter Antiköperspezifität gebildet werden, ist an dieser Stelle eine strenge Kontrolle nötig, die garantiert, dass nur hoch-affine B-Zellen überleben, und niedrig-affine bzw. autoreaktive B-Zellen eliminiert werden [71]. Im Gegensatz zu ruhenden, naiven und Gedächtnis-B-Zellen exprimieren proliferierende B-Zellen im germinalen Zentrum nur niedrige Level von Bcl-2 [72] und sie scheinen darauf programmiert zu sein in Apoptose zu gehen wenn sie keine Überlebenssignale erhalten [73]. Für diese Überlebenssignale spielen die Erkennung von Antigen und Antigen-spezifische T-Zellen eine wichtige Rolle [74]. Daher können auf diese Weise B-Zellen, die einen hoch affinen B-Zellrezeptor exprimieren, im Milieu des germinalen Zentrums positiv selektioniert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Affinitätsreifung.

Ein anderer Faktor der zu dieser Selektion beiträgt, könnte der Klassenwechsel sein, der ebenfalls im germinalen Zentrum stattfindet [75]. Antikörper werden anhand der konstanten Region ihrer schweren Kette in verschiedene Subklassen eingeteilt (siehe 2.1.1). Beim Klassenwechsel wird die konstante Region des Antikörpermoleküls durch eine nicht homologe Rekombination ausgetauscht [76].

Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus liegen die  $C_{\mu}$ - und die  $C_{\delta}$ -Gene direkt nebeneinander. IgD wird auf der Oberfläche von reifen, naiven B-Zellen zusammen mit

IgM exprimiert [77]. Zellen die IgM und IgD produzieren haben keinen Klassenwechsel durchlaufen, sondern bilden beim Ablesen des Gens für die schwere Kette ein langes Primärtranskript, das dann nachfolgend unterschiedlich geschnitten und gespleißt wird, sodass jeweils eines von zwei möglichen Genprodukten entsteht. Die unterschiedliche Prozessierung ist entwicklungssteuert, so produzieren unreife B-Zellen vor allem das  $\mu$ -Transkript und reife B-Zellen hauptsächlich das  $\delta$ -Transkript zusammen mit wenig  $\mu$ -Transkript [78].

Durch den Klassenwechsel kommt es zur Expression von Antikörpern der Klasse IgG, IgA und IgE anstelle von IgM und IgD [79]. Welcher Isotyp exprimiert wird, ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Art des Antigens, des Infektionsweges und der an der Immunantwort beteiligten regulatorischen Zellen [80]. So werden bei einer viralen Infektion vor allem Antikörper der Subklasse IgG2a und in einem geringeren Umfang auch vom Subtyp IgG1 gebildet [81]. Bei einer Immunantwort gegen Helminthen überwiegt die Produktion von IgE [82].

#### **2.1.4.2 Die Entstehung von B-Gedächtniszellen**

B-Gedächtniszellen sind langlebige Abkömmlinge von B-Zellen, die sich nach Stimulation durch ein Antigen im germinalen Zentrum vermehrt und differenziert haben. Sie exprimieren Immunglobulin auf ihrer Oberfläche, sezernieren jedoch keine Antikörper. Bei erneutem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen sind sie in der Lage eine schnellere und stärkere Immunantwort auszulösen [10].

B-Zellen, die die Selektion im germinalen Zentrum überleben, haben vermutlich mehrere Runden positiver Selektion durchlaufen, sie regulieren dann Bcl-2 hoch [72] und werden zu ruhenden B-Zellen oder zu Plasmazellen [83]. Diese Zellen exprimieren ein neues Repertoire an hypermutierten, hochaffinen Antikörpern. Im Menschen und in der Maus bilden B-Gedächtniszellen eine kleine Untergruppe der B-Zellen. Sie können aufgrund ihrer somatisch hypermutierten Antikörper und charakteristischer Oberflächenmarker angesprochen werden. Die meisten der Gedächtniszellen sind ruhend, langlebig und zum Teil rezirkulieren sie auch. Ob die Lebensdauer dieser Zellen durch gelegentlichen Kontakt mit persistierendem Antigen verlängert werden kann, wird kontrovers diskutiert, da eine Messung *in vivo* ohne persistierendes Antigen bisher nicht durchgeführt werden konnte. Es

gibt Ergebnisse, die nahelegen, dass B-Gedächtniszellen vor allem zu mukosalen Oberflächen wandern, wo sie schnell auf eindringende Pathogene reagieren können [10]. Da B-Gedächtniszellen T-Zellen sehr effizient Antigene präsentieren können [84], kommt es bei erneutem Antigenkontakt zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort. Bei dieser Reaktion kann eine massive Proliferation ohne weitere Hypermutationen stattfinden [85]. Der Grund für die fehlende Hypermutation ist wahrscheinlich, dass die meisten Zellen außerhalb des germinalen Zentrums proliferieren [62]. Einige der Gedächtniszellen können aber auch erneut in ein germinales Zentrum einwandern und dort ihren B-Zellrezeptor durch somatische Hypermutationen weiter modifizieren [86].

#### **2.1.4.3 Die Entstehung von Plasmazellen**

Die Differenzierung zu Plasmazellen erfolgt über die Zwischenstufe der Plasmablasten. Diese sind schon in der Lage Immunglobuline freizusetzen, aber im Gegensatz zu den Plasmazellen proliferieren sie noch [87]. Plasmazellen entwickeln sich unter der Kontrolle des regulatorischen Proteins BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1). Das Protein ist ein Repressor für Gene, die für die Proliferation der B-Zellen in germinalen Zentren, für einen Isotypwechsel und die Affinitätsreifung notwendig sind [48]. Nach Antigenkontakt können Plasmazellen sowohl aus naiven Marginalzonen-B-Zellen, aus follikulären B-Zellen, aus aktivierten germinalen Zentrum-B-Zellen oder aus B-Gedächtniszellen entstehen (siehe Abbildung 2) [46].

Eine frühe Antwort auf einige Pathogene wird auch durch sogenannte „natürliche“ Antikörper, die von B1-B-Zellen produziert werden, erreicht (siehe 2.1.3) [46]. B1-B-Zellen können zur IgM-Antwort auf T-Zellunabhängige Antigene wie Phosphorylcholin ein Antigen auf vielen Bakterien beitragen. In der Mukosa können B1-B-Zellen einen Beitrag zur Produktion von IgA leisten [50].

Die ersten B-Zellen, die auf ein Fremdanigen reagieren, sind die Marginalzonen-B-Zellen [88]. Ihre Lage erleichtert das frühe Zusammentreffen mit Antigenen die über das Blut in die Milz gelangt sind [46]. Nach Antigenkontakt kommt es zu einer massiven Proliferation und zugleich zur Bildung von sogenannten Primärfoci, bestehend aus Plasmablasten die Immunglobuline sezernieren und gleichzeitig weiter proliferieren. Eine wichtige Eigenschaft der Marginalzonen-B-Zellen ist ihre Fähigkeit schnell auf Antigene zu

reagieren [89]. Auch zirkulierende folliculäre B-Zellen reagieren schnell nach Antigenkontakt, sie proliferieren und bilden ähnlich wie die Marginalzonen-B-Zellen extrafolliculäre Foci in denen sie sich zu Plasmablasten und Plasmazellen weiter entwickeln [46]. Plasmazellen die entweder aus Marginalzonen-B-Zellen oder aus folliculären B-Zellen in dieser frühen, extrafolliculären Immunantwort entstanden sind, sind kurzlebig und sie haben keine somatisch hypermutierten Ig-Gene [90]. Sie durchlaufen aber einen Klassenwechsel und produzieren 5-6 Tage nach Antigenkontakt auch andere Immunglobulinklassen wie IgG [91]. Wenn folliculäre B-Zellen auf ein passendes Antigen treffen und T-Zell Hilfe erhalten, dann kann es auch zur Bildung eines germinalen Zentrums kommen (siehe 2.1.4.1). Aus der germinalen Zentrumsreaktion gehen Plasmazellen und B-Gedächtniszellen hervor, die hochaffine, somatisch-hypermutierte B-Zellrezeptoren tragen und einen Klassenwechsel durchlaufen haben. Es gibt verschiedene Meinungen darüber, wie die post-germinalen B-Gedächtniszellen und Plasmazellen miteinander in Verbindung stehen. Die eine Möglichkeit wäre, dass sich post-germinale Zellen auf einem einzigen Weg entwickeln, so dass sich Plasmazellen aus den B-Gedächtniszellen entwickeln [48]. Die andere Möglichkeit wäre, dass Plasmazellen und B-Gedächtniszellen zwei unterschiedliche Entwicklungswege von post-germinalen-B-Zellen darstellen [46].

Plasmazellen verändern die Eigenschaften ihrer Zelloberfläche, die Expression von CXCR5 wird vermindert, dafür werden vermehrt CXCR4 und  $\alpha_4\beta_1$  exprimiert, dadurch können die Plasmazellen die germinalen Zentren verlassen und in die peripheren Gewebe einwandern. Plasmazellen aus den germinalen Zentren in den Lymphknoten oder der Milz wandern entweder ins Knochenmark, wo eine Subpopulation beim Mensch über Jahre hinweg in „Nischen“ überlebt, wenn sie die nötigen Signale von Stromazellen erhält, oder sie gelangen in die rote Pulpa der Milz. Für das Überleben der Plasmazellen im Knochenmark sind die von den Stromazellen produzierten Zytokine APRIL und/oder BAFF von entscheidender Bedeutung [92]. B-Zellen, die in den germinalen Zentren der Schleimhaut aktiviert wurden und vor allem IgA-Antikörper produzieren, verbleiben dagegen im mucosalen System [93].

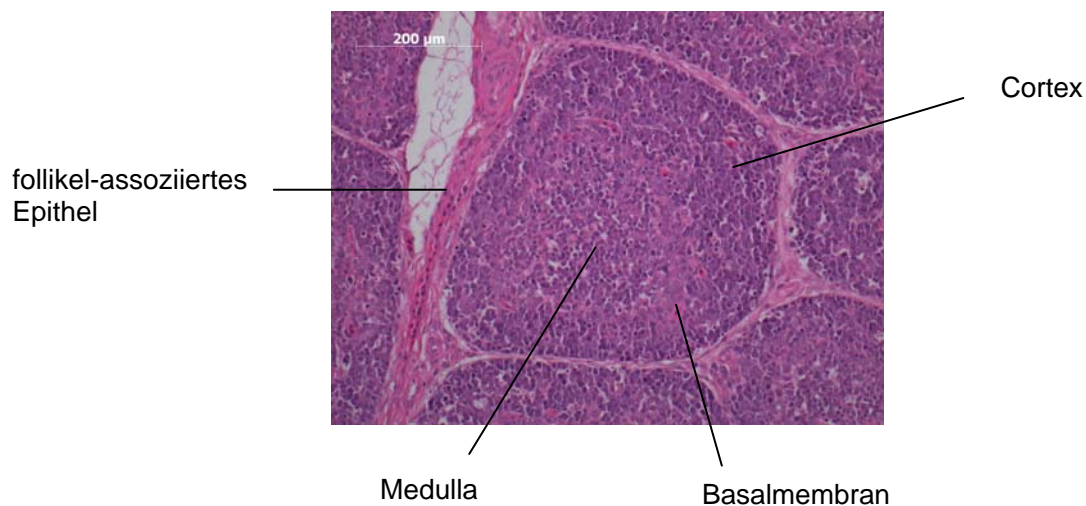
## 2.2 Die B-Zellentwicklung beim Huhn

Die B-Zellentwicklung beim Huhn weist essentielle Unterschiede zu der bei Mensch und Maus auf. Ein Hauptunterschied ist sicherlich, dass die primäre B-Zellentwicklung beim Huhn nicht im Knochenmark, sondern in der Bursa Fabricii stattfindet [1]. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass im Gegensatz zu Mensch und Maus bei denen eine lebenslange Neubildung von B-Zellen im Knochenmark stattfindet [18], beim Huhn die Reifung von B-Zellen in der Bursa auf eine frühe Lebensphase begrenzt ist. Der Grund hierfür ist die Involution der Bursa mit Eintritt der sexuellen Reife [94]. Danach wird der periphere B-Zellpool durch eine kleine Population sich selbst erneuernder B-Zellen, den sogenannten post-bursalen Stammzellen aufrecht erhalten [95]. Aufgrund der zentralen Rolle, die die Bursa Fabricii bei der B-Zellentwicklung im Huhn spielt, können in zeitlicher Abfolge drei Phasen unterschieden werden: die prä-bursale, bursale und post-bursale Phase [96].

### 2.2.1 Struktur der Bursa Fabricii

Die Entwicklung der Bursa Fabricii beginnt an Embryonaltag 4 als dorsale endodermale Ausstülpung der Kloake die von Mesoderm umgeben ist [97]. Im weiteren Verlauf der Embryogenese entstehen durch das wachsende Stroma der Bursa Falten die einen zentralen Hohlraum umgeben. Dieser steht mit dem hinteren Enddarm in Verbindung. Die Falten sind bedeckt von einem Säulenepithel unter dem ein loses Netzwerk von mesenchymalen Zellen liegt. Durch Proliferation des Epithels entstehen epitheliale Knospen, die in die darunterliegende Lamina propria vordringen. Dadurch wird die Bildung von Bursafollikeln induziert [98]. Ab Embryonaltag 8 beginnen lymphoide Vorläuferzellen diese Follikel zu besiedeln [99]. Die Vorläuferzellen vermehren sich in den Bursafollikeln sehr stark, sodass ein reifer Follikel etwa  $10^5$  Lymphozyten enthält [100]. Die Bursa eines vier Wochen alten Tieres enthält zwischen 8.000 und 12.000 Follikel [101]. Jeder Follikel umfasst eine Medulla die lymphoide Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und eine kleine Anzahl an T-Zellen enthält. Die Medulla wird von einer Lage von Epithelzellen umgeben, um die ein Netzwerk von Kapillaren liegt. Um den Zeitpunkt des Schlupfes entwickelt sich ein Cortex aus einer dichten Lymphozytenpopulation um dieses Epithel herum [98]. Medulla und Cortex sind durch eine Basalmembran getrennt. Lymphozyten verlassen die Bursa über das kapilläre Netzwerk im Bereich des Cortex [102]. Das Epithel über den Follikeln differenziert sich zum sogenannten follikel-assoziierten Epithel. Diese ist spezialisiert für

die Aufnahme von Partikeln aus dem Bursa-Lumen [103]. Die Bursa wächst kontinuierlich, bis sie im Alter von 2 bis 4 Wochen eine Plateauphase erreicht. Bis zu einem Alter von 4-6 Monaten bleibt die Bursa erhalten, mit Eintritt der sexuellen Reife beginnt die Rückbildung der Bursa Fabricii [104].



**Abbildung 5: Darstellung eines Bursafollikels**

*Im Zentrum des Follikels liegt die Medulla, diese ist umgeben vom Cortex. Die Basalmembran trennt die beiden Bereiche voneinander. Zum Lumen hin wird der Follikel vom Follikel-assoziierten Epithel bedeckt.*

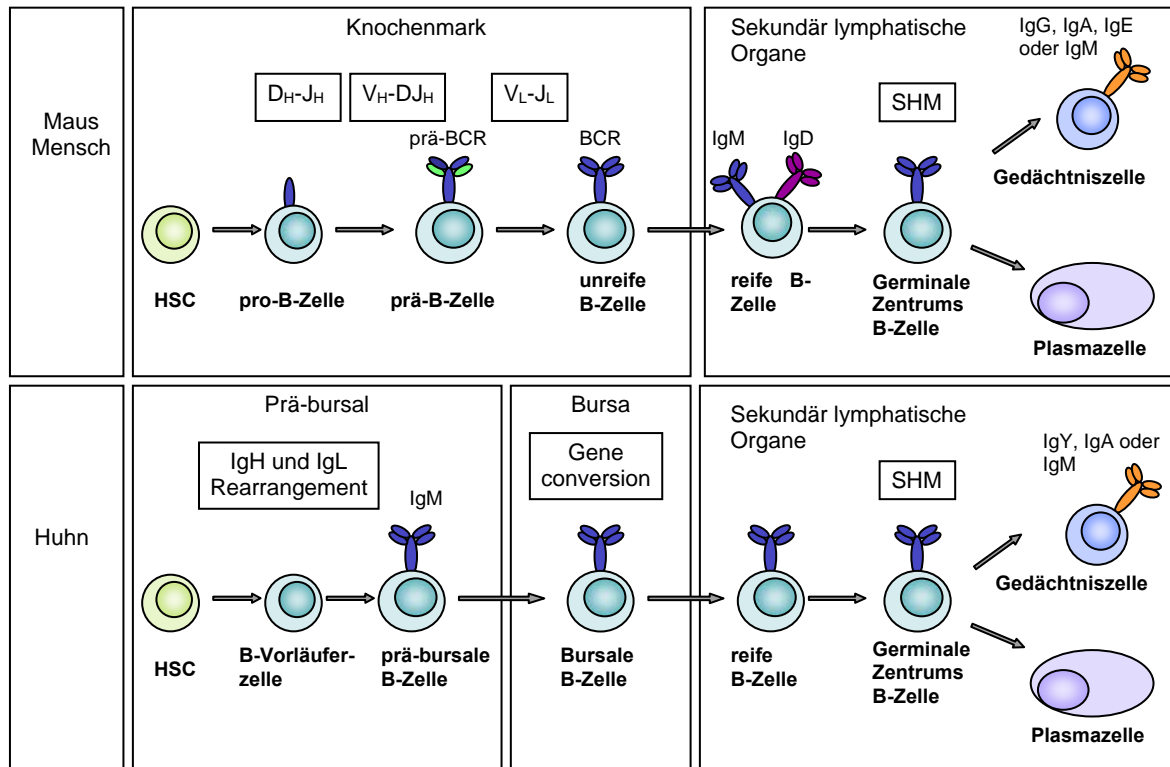
### 2.2.2 Prä-bursale Phase

Ab Embryonaltag 5 konnten hämatopoetische Vorläuferzellen im Mesenchym im Bereich der späteren Aorta nachgewiesen werden [105]. Von hier aus wandern die hämatopoetischen Vorläuferzellen zum Dottersack, Knochenmark, zur Milz und zur Leber [96]. Die hämatopoetische Vorläuferzelle wird bereits während der prä-bursalen Phase auf die B-Zelllinie festgelegt [106]. Da die B-Zellen im Unterschied zu den T-Zellen ihr Immunglobulingen schon rearrangieren, stellt ein DJ<sub>H</sub>-Rearrangement einen Marker dar, für die endgültige Festlegung einer Vorläuferzelle auf die B-Zelllinie [107]. B-Zellvorläufer mit rearrangierten DJH-Genen sind zwischen Embryonaltag 5 und 6 im Dottersack und wenige Tage später in Milz, Knochenmark, Leber und Blut vorhanden [107]. Sowohl die Festlegung der hämatopoetischen Vorläuferzelle auf die B-Zelllinie, als auch die Induktion des V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Genrearrangements sind folglich unabhängig von Einflüssen der Bursa [108].

Das Genrearrangement des Immunglobulinlokus unterscheidet sich in einigen Punkten von dem Vorgang bei Mensch und Maus. So findet das Ig-Gen-Rearrangement beim Huhn nur



während der frühen Embryonalentwicklung in einem engen zeitlichen Rahmen statt [109]. Außerdem erfolgt das Rearrangement gleichzeitig am Locus für die schwere und für die leichte Kette [110]. Aus diesem Grund gibt es beim Huhn kein definiertes Entwicklungsstadium, das der Prä-B-Zelle beim Säuger entspricht, denn dieses wäre gekennzeichnet durch eine rearrangierte  $VDJ_H$ -Sequenz bevor ein Rearrangement am Locus der leichten Kette stattgefunden hat [111]. Daher wird beim Huhn auch kein Prä-B-Zellrezeptor exprimiert [112] (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus**

Während beim Mensch das  $VDJ$ -Rearrangement des Locus der schweren Kette zur Ausbildung eines prä-B-Zellrezeptors führt, erfolgt beim Huhn zeitgleich das Rearrangement der schweren und leichten Kette, was in der Expression von oberflächlichem IgM auf den präbursalen B-Zellen resultiert. Die Diversifizierung des B-Zellrepertoires erfolgt durch Genkonversion während der bursalen Phase und durch somatische Hypermutation im germinalen Zentrum. Nach Kohonen et al.[113].

Ein weiterer Unterschied zum Ig-Rearrangement bei Mensch und Maus ist die geringe Rezeptor-Diversität die beim Huhn durch diesen Mechanismus erzeugt wird [114]. Die Ursache hierfür liegt in der Organisation der Immunglobulinloci. Zum einen gibt es beim Huhn nur einen  $Ig_L$ -Locus, zum anderen enthält der Locus für die  $Ig_L$ -Kette nur ein einziges  $J_L$ -Segment [115], das während des Rearrangements mit dem einzigen funktionellen  $V_L$ -Segment verknüpft wird [114]. Ein ähnliches Bild ergibt sich für den  $Ig_H$ -Locus, hier ist jeweils ein einzelnes  $V_H$ - und  $J_H$ -Gensegment vorhanden, das in allen B-Zellen benutzt wird [116]. Von den 15 vorhandenen  $D_H$ -Segmenten sind sich viele

untereinander sehr ähnlich, sodass trotz Nutzung verschiedener  $D_H$ -Segmente die generierte Diversität sehr limitiert ist [117]. B-Zellen, in denen ein erfolgreiches Ig-Gen-Rearrangement stattgefunden hat, exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen B-Zellrezeptor, der wie beim Säuger aus  $\mu$ - und  $\lambda$ - Ketten besteht, die kovalent mit dem  $I\alpha$ -/ $I\beta$  (CD79a/CD79b)- Heterodimer verbunden sind [112].

### 2.2.3 Bursale Phase

Die Einwanderung der prä-bursalen Stammzellen in die Bursa-Anlage erfolgt in einer Welle zwischen ET 8 und 15 [118]. Zunächst migrieren die prä-bursalen Stammzellen ins Bursa-Mesenchym und von dort dann weiter zum Epithel der Bursa, wo sie die Bildung von Bursafollikeln induzieren [99]. Pro Follikel wandern dabei 2-4 prä-bursale Stammzellen ein [119]. Um in das Mesenchym der Bursa einwandern zu können, müssen die prä-bursalen Stammzellen nicht zwingend sIg-Komplexe exprimieren [110], aber nur die B-Zellvorläufer, die in der Lage sind einen B-Zellrezeptor zu exprimieren, werden in den Bursafollikeln durch massive Proliferation vermehrt [120]. An dieser Stelle findet somit eine Selektion von B-Zellvorläufern statt, die ein erfolgreiches Ig-Genrearrangement durchlaufen haben. Während der bursalen Phase der B-Zellentwicklung wird die Diversität der  $VDJ_H$ - und  $VJ_L$ -Gene durch den Prozess der Genkonversion vergrößert und das prä-immune B-Zellrepertoire gebildet [111]. Dabei werden  $V_L$ - oder  $VD_H$ -Sequenzen innerhalb des funktionell rearrangierten  $VJ_L$ - oder  $VDJ_H$ -Lokus durch Sequenzen von benachbarten  $V_L$ - oder  $V_H$ -Pseudogenen ersetzt [121]. Beim Huhn gibt es am Genlocus der leichten Kette 25 V-Pseudogene [121], für die schwere Kette stehen in etwa 100 V-Pseudogene zur Verfügung [116]. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass dieser Entwicklungsschritt unabhängig von Antigen-Kontakt ist [122]. Ein Großteil der gebildeten B-Zellen geht noch in der Bursa in Apoptose [123], nur ca. 5% der Bursazellen emigrieren pro Tag in die Peripherie [124]. Der Grund hierfür ist noch nicht völlig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen, die kein sIg exprimieren in Apoptose gehen [125]. Daher wurde vermutet, dass B-Zellen bei denen die Genkonversion zur Bildung von nicht funktionellen  $VDJ_H$ - oder  $VJ_L$ -Sequenzen führt, auf diese Weise eliminiert werden [124]. Dem widerspricht allerdings die Entdeckung, dass nur 3% der Genkonversions-Ereignisse zu nicht funktionalen Gensequenzen führen [122]. Eine weitere mögliche Erklärung für das große Ausmaß an Apoptose ist, dass durch die Genkonversion schwere und leichte Ketten entstehen, die zwar intrinsisch funktional sind, aber nicht richtig miteinander assoziieren können, und somit kein B-Zellrezeptor ausgebildet werden kann [111].

### 2.2.4 Post-bursale Phase

Die Emigration der B-Zellen aus der Bursa beginnt kurz vor dem Schlupf, und dauert bis zur Involution der Bursa im Alter von 4-6 Monaten an. Die meisten der peripheren B-Zellen stammen aus dem Cortex der Bursafollikel [126], und wandern von dort aus zu den verschiedenen sekundär lymphatischen Organen [127]. Es ist nicht ganz klar, ob die B-Zellen, die aus dem Cortex auswandern zufällig ausgewählt werden, oder ob in der Bursa eine Selektion erfolgt. Anhand ihrer Überlebenszeit ist es möglich, verschiedene B-Zell-Populationen im peripheren Blut zu unterscheiden. In 3 Wochen alten Hühnern hat die Mehrzahl der peripheren B-Zellen (ca. 60%) eine kurze Lebensdauer von ca. 3 Tagen, das heißt diese B-Zellen sind vor weniger als 3 Tagen aus der Bursa emigriert. Eine zweite Population hat eine längere Lebensdauer im peripheren Blut von ca. 2-3 Wochen. Es wäre möglich, dass die kurzlebigen B-Zellen aus dem Follikelkortex stammen und eine große Auswahl an Antigenpezifitäten haben, die sie in der Bursa erlangt haben, ohne mit Antigen in Kontakt getreten zu sein. Viele dieser B-Zellen würden nach ihrer Emigration nicht mit einem Antigen zusammentreffen, das sie erkennen können, und würden daher schnell wieder eliminiert werden. Die zweite Population würde dann B-Zellen umfassen, die vor ihrer Emigration durch Antigenkontakt in der Medulla der Bursafollikel selektioniert worden sind und daher eine längere Lebensdauer besitzen. Eine dritte Population von langlebigen peripheren B-Zellen, die in 3 Wochen alten Hühnern nur einen kleinen Anteil von ca. 5% ausmacht, umfasst B-Zellen, die nicht aus der Bursa stammen und außerhalb der Bursa kontinuierlich nachgebildet werden. Der Anteil dieser Zellen an der gesamten B-Zellpopulation im peripheren Blut nimmt mit der Zeit zu [127]. Es wird angenommen, dass unter diesen langlebigen B-Zellen sich selbst erneuernde postbursale Stammzellen sind, die nach Involution der Bursa den peripheren B-Zellpool aufrecht erhalten [128].

Über die weitere Entwicklung der B-Zellen ist beim Huhn im Gegensatz zur Maus noch relativ wenig bekannt. Der Grund hierfür ist vor allem das Fehlen von Markern um die unterschiedlichen Entwicklungsstadien ansprechen zu können. Was bekannt ist, ist dass es auch beim Huhn nach Antigenkontakt in den sekundär lymphatischen Organen zur Bildung von germinalen Zentren kommt [129]. Anders als beim Säuger liegen die germinalen Zentren in der Milz nicht innerhalb der primär vorhandenen B-Zellregion, sondern im T-Zellbereich [130]. In den germinalen Zentren findet dann die weitere B-Zellreifung statt [131]. Zum einen findet dabei ein Klassenwechsel zur Bildung verschiedener

Immunglobulinsubklassen statt [132]. Ein Unterschied zum Säuger ist hierbei, dass bislang kein IgE und IgD identifiziert wurde, und statt IgG beim Huhn IgY produziert wird [111]. Zum anderen erfolgt eine weitere Diversifizierung des B-Zellrezeptors durch Genkonversion [133] und somatische Hypermutation [134]. Anders als beim Säuger ist die B-Zellregion in der Milz beim Huhn auf die B-Zellen der periellipsoidalen weißen Pulpa beschränkt. Eine Einteilung in Marginalzonen-B-Zellen und folliculäre B-Zellen ist daher beim Huhn nicht möglich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der Milz des Huhnes ein Kompartement vorhanden ist, das funktionell der Marginalzone der Säuger entspricht. Dieses besteht aus der ellipsoidalen Hülle von retikulären Zellen die die terminalen Kapillaren umgeben, der periellipsoidalen Lymphozyten-Hülle bestehend aus B-Zellen und einem Ring von Makrophagen um diese herum [135].

Genauso wie beim Säuger entstehen im Huhn im Rahmen der Immunantwort Plasmazellen. So entstehen nach Immunisierung mit einem thymusabhängigen Antigen in der Milz zunächst IgM-produzierende Plasmazellen, nach 72 Stunden findet ein Klassenwechsel zu IgY statt. In der Milz sind nur wenige IgA-produzierende Plasmazellen zu finden. Die ersten Plasmazellen wurden nach 48 Stunden an der Grenze zwischen T-Zellbereich und roter Pulpa und auch innerhalb der roten Pulpa nachgewiesen. Nach 96 Stunden waren auch im germinalen Zentrum Plasmazellen zu finden [130]. Plasmazellen in der Haderschen Drüse, einem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe, das sich retrobulbär befindet, produzieren große Mengen an IgA und auch IgY [136]. In den Cäcaltonsillen- einem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe, produzieren Plasmazellen viel IgA und daneben IgY [137].

### 2.3 B-Zellmarker bei Mensch und Maus

Bei Mensch und Maus sind eine Vielzahl von Oberflächenmarker für B-Zellen bekannt, die je nach Entwicklungsstadium auf der Zelloberfläche exprimiert werden (siehe Tabelle 1). So ist es möglich aus der Kombination verschiedener B-Zellmarker die einzelnen Subpopulationen von B-Zellen zu unterscheiden. Bei B-Zellen aus der Milz ( $CD19^+$ ) können beispielsweise anhand ihrer Expression von CD21 und CD23 Marginalzonen-B-Zellen ( $CD21^{+++}CD23^-$ ), Follikuläre B-Zellen ( $CD21^{++}CD23^{++}$ ) und neu gebildete B-Zellen ( $CD21^{+/-}CD23^-$ ) unterschieden werden [89]. Anhand zusätzlicher Marker wie CD93, IgM und IgD können die Subpopulationen noch weiter unterteilt werden. So werden

bei den neu gebildeten Zellen T1- und T2-B-Zellen unterschieden, und auch die folliculären und die Marginalzonen-B-Zellen können noch in Untergruppen eingeteilt werden [50].

	pro BZ	prä BZ	immature BZ	T1 BZ	T2 BZ	MZ BZ	follikuläre BZ	GC BZ	Plasma- blast	Plasma- zelle	Ged.- zelle
BP-1	-/++	+									
CD138	++	++	+/-					-	+++	++	
CD19	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++/+	++
CD20	+	++	++	++			++	++		+	++
CD21/CD35	-	-	-/+	+	+++	+++	++	+/++		-	++
CD22			++	++							
CD23	-	-	-	-	++	+/-	++	+/-			-
CD24			+++	+++		+++	++	++			
CD25	-	++	+/-	-	-						
CD27					-				+++	+++	++
CD32							++	+/-			
CD34	++										
CD38 Maus		+++				++	++	+/-	++	+/-	
CD38 Mensch	+++	+++	-	-		+++	++/-	+++	++	+++	-
CD40	++	++	++	+/++	+/++	+++	++	++			++
CD43	++	-	++	-	-						
CD54							+/-	+++			
CD62L			-	-	++		++	+/-			
CD80/CD86			+	+		+++	+	+			+++
CD93			++	++	++	-	-/+				
CD95							-	+++			
c-kit	++	+/-									
MHCII	++	++	++	++		+++	++	++			+++
slgD	-	-	-/+	-/+	+/++	+	+++	-	-	-	-/+
slgM	-	-	++	+++	+++	+++	+	++	+/-	+/-	*
λ5/VpreB	++	++									

**Tabelle 1: Übersicht über die B-Zellmarker bei Mensch und Maus**

MZ-BZ: Marginalzonen-B-Zellen GC-BZ: Germinale Zentrums-B-Zellen Ged.-Zelle: Gedächtniszelle

-: keine Expression +: schwache Expression ++: mittelstarke Expression +++: starke Expression

\*: IgM, IgG, IgA oder IgE; Auf die farbig hinterlegten B-Zellmarker wird im Folgenden näher eingegangen.

Nach Allman et al. [50], Nutt et al. [138], Oliver et al. [89, 139], Smith et al [91] und Tedder et al. [140, 141].

Im Folgenden soll auf einige der wichtigsten B-Zellmarker (in der Tabelle 1 farbig hinterlegt) bei Mensch und Maus näher eingegangen werden.

### 2.3.1 CD19 (B4)

CD19 bildet zusammen mit CD21 (Komplementrezeptor 2, CR2) und CD81 (TAPA-1) den B-Zell-Corezeptor auf reifen B-Zellen [142]. Dieser kann ein antigenabhängiges Signal des BCR verstärken [143], wenn er gleichzeitig von einem Ligand gebunden wird, und sich mit dem Antigenrezeptor zusammenlagert.

CD21 ist ein Rezeptor für aktivierte Produkte der Komplementfaktoren C3 und C4. Daher können Antigene, an die zum Beispiel C3d bindet, den Corezeptor mit dem B-Zellrezeptor quervernetzen [143]. Infolge dessen kommt es zur Phosphorylierung des cytoplasmatischen Anteils von CD19 durch Tyrosinkinasen die mit dem BCR assoziiert sind. Phosphoryliertes CD19 bindet an Tyrosinkinasen der Src-Familie (z.B. Lyn) und an die PI-3-Kinase, diese löst nachgeschaltete Signalwege aus [142].

CD19 hat eine Molekülmasse von 95kDa, ist ein Transmembran-Protein, und Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie [144]. Es ist das früheste B-Zell-spezifische Antigen und wird ab den frühen B-Zellvorläufern exprimiert [145], die Expression dauert bis zur Differenzierung zur Plasmazelle an [144]. Die Expression von CD19 beginnt im Stadium der pro-B-Zelle und wird durch den Transkriptionsfaktor Pax-5 induziert [138]. Dieser wird während der gesamten B-Zellentwicklung, außer in enddifferenzierten Plasmazellen exprimiert [25]. Außer auf B-Zellen wird CD19 jedoch auch auf follikulär dendritischen Zellen exprimiert [140].

CD19 spielt während der gesamten B-Zellentwicklung eine wichtige Rolle. So kann es bereits im prä-B-Zellstadium Signale durch den prä-B-Zellrezeptor verstärken [146] und könnte so dazu führen, dass sich die prä-B-Zellen weiterentwickeln können. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass bei CD19<sup>-/-</sup> Mäusen die B-Zellentwicklung in diesem Stadium beeinträchtigt ist [147]. Auch für den Übergang von unreifen zu reifen B-Zellen, und für das Überleben der B-Zellen in der Peripherie ist CD19 von essentieller Bedeutung [148].

### 2.3.2 CD21/CD35

Die Komplementrezeptoren CD21 und CD35 werden auf B-Zellen und auf follikulär dendritischen Zellen coexprimiert. Außerdem wird CD21 auch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert [149]. CD21 und CD35 sind alternative Spleißprodukte des gleichen Genlokus [150]. Zusammen mit CD19 und CD81 bilden sie den B-Zellcorezeptor (siehe 2.3.1).

Im Gegensatz zu CD19 wird CD21 nur auf reifen B-Zellen exprimiert [140]. Immature B-Zellen und Plasmazellen sind dagegen CD21<sup>-</sup> [141]

### 2.3.3 CD27

CD27 ist ein Marker für B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. Es ist ein Typ I Glykoprotein und gehört zur TNF-Rezeptor-Familie [151]. Die Interaktion zwischen CD27 und seinem Liganden (CD70), der zur TNF-Familie gehört und nicht nur auf aktivierten B-Zellen, sondern auch auf T-Zellen vorkommt, kann die Produktion von Immunglobulinen verstärken [152]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CD27 und CD70 an der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen beteiligt ist [153].

B-Zellen aus dem peripheren Blut und aus Tonsillen können beim Menschen eingeteilt werden in eine CD27<sup>+</sup> und eine CD27<sup>-</sup> Population. Auf B-Zellen aus den Tonsillen ist die Expression von CD27 negativ korreliert mit der Expression von IgD [154]. Da IgD nicht mehr exprimiert wird, nachdem eine B-Zelle durch ihr spezifisches Antigen aktiviert wurde, und CD27 vor allem auf IgD<sup>-</sup> Zellen vorhanden ist, lag die Vermutung nahe, dass CD27 einen Differenzierungsmarker für B-Zellen darstellt. Es wurde gezeigt, dass CD27<sup>+</sup> Zellen im Gegensatz zu CD27<sup>-</sup> B-Zellen nach Stimulation mit SAC (Staphylococcus Cow Strain) und IL-2 schnell aktiviert werden und größere Mengen an IgA, IgM und IgG produzieren [155]. CD27<sup>+</sup> B-Zellen weisen somit charakteristische Merkmale von B-Gedächtnis-Zellen auf [156]. Daher ist CD27 ein wichtiger Marker für B-Gedächtniszellen und wird auch auf Plasmazellen exprimiert [155].

### 2.3.4 IgM und IgD

IgM ist das erste Immunglobulinmolekül, das während der Entwicklung auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert wird (siehe 2.1.2). IgD wird auf der Oberfläche von reifen, naiven B-Zellen zusammen mit IgM exprimiert, wobei es kaum Plasmazellen gibt, die Immunglobuline von diesem Isotyp sezernieren [26].

Daher sind immature B-Zellen zunächst sIgM<sup>+</sup> und sIgD<sup>-</sup> (siehe Abbildung 6). Im Laufe ihrer weiteren Entwicklung exprimieren die B-Zellen dann zusätzlich zu IgM auch IgD auf ihrer Zelloberfläche. Nach Aktivierung nimmt die Expression von IgD schnell und stark ab, Gedächtniszellen, die nach Antigenkontakt gebildet werden, sind hinsichtlich ihrer sIgD-Expression nicht einheitlich. Frühe B-Gedächtniszellen exprimieren zum Teil IgD,

während spätere B-Gedächtniszellen mit einer höheren Affinität kein IgD mehr auf ihrer Zelloberfläche tragen [157].

Unreife B-Zellen bilden vor allem IgM und reife B-Zellen hauptsächlich IgD zusammen mit wenig IgM (siehe 2.1.4.1). Wenn eine B-Zelle aktiviert wurde, exprimiert sie kein IgD mehr zusammen mit IgM, entweder weil die  $\mu$ - und  $\delta$ - Gensequenzen im Rahmen des Immunglobulin-Klassenwechsels entfernt wurden (siehe 2.1.4.1), oder bei IgM-produzierenden Plasmazellen weil die Transkription nicht mehr bis zu den  $C_\delta$ -Exons vorangeht [26]. Der schnelle Verlust von IgD nach Aktivierung der B-Zelle legt die Vermutung nahe, dass ein spezifischer Mechanismus die Expression von sIgD während der Aktivierung moduliert. So könnte die verminderte Expression von sIgD durch eine Protease auf der Zelloberfläche zustande kommen [158]. Es konnte gezeigt werden, dass sIgD im Vergleich zu IgM eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteolyse aufweist, und dass Proteasen auf der Zelloberfläche eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten spielen [159].

### 2.3.5 CD23

CD23 hat eine Molekülmasse von 45 kDa, ist ein Typ II Membranprotein und gehört zur Familie der C-Typ-Lektine [160]. Es gibt zwei Isoformen von CD23, CD23a und CD23b. CD23a ist die B-Zell-spezifische Form, die konstitutiv exprimiert wird, während CD23b auf verschiedenen Zelltypen vorkommt und induziert werden kann [161].

Die Expression von CD23 kann durch die Zytokine IL-4 und IL-13 induziert werden [162], während sie durch Interferon- $\gamma$  CD23 vermindert wird [163]. CD23 fungiert sowohl als Rezeptor, als auch als Ligand. Als Rezeptor für IgE (Fc $\epsilon$ R2) kann CD23 IgE-Immunkomplexe binden, wodurch Antigene verstärkt T-Zellen präsentiert werden können. Als Adhäsionsmolekül interagiert CD23 mit CD21 und reguliert so die Produktion von IgE, das Überleben von B-Zellen im germinalen Zentrum, und die Präsentation von löslichen Proteinantigenen durch B-Zellen gegenüber T-Zellen [161]. CD23 ist als Adhäsionsmolekül sowohl an heterotypischen, als auch homotypischen Interaktionen beteiligt. Durch die Interaktion mit CD21 auf T-Zellen kann CD23 den Kontakt zwischen B- und T-Zellen verstärken [164], außerdem spielt die CD21-CD23 Paarung auch eine Rolle für die Interaktion von B-Zellen untereinander [165].



CD23 kann als Marker zur Unterscheidung von folliculären B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen verwendet werden, denn folliculäre B-Zellen sind CD23<sup>++</sup>, während Marginalzonen-B-Zellen kaum CD23 exprimieren [89].

### 2.3.6 CD38

CD38 ist ein TypII Transmembranprotein mit einer langen extrazellulären Domäne [166]. Außerdem kommt CD38 auch in löslicher Form vor [167]. CD38 hat eine Ektoenzymaktivität die NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid Adenin Dinukleotid) über cyclische ADP Ribose in ADPR umwandelt [168]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD38 in Mäusen nach Quervernetzung eine B-Zell-Proliferation induziert. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von IL-4 oder IL-5 verstärkt werden [169]. Wie diese beiden Effekte zur B-Zelldifferenzierung beitragen ist bisher noch nicht geklärt [139]. Außer auf B-Zellen wird CD38 auch noch auf einer Reihe anderer Zellen, darunter T-Zellen, myeloide Zellen und neuronale Zellen exprimiert [170].

Beim Mensch wird CD38 auf germinalen Zentrums B-Zellen und Plasmazellen stark exprimiert, nicht aber auf B-Gedächtniszellen. CD38 wird beim Mensch als ein Indikator für aktivierte B-Zellen angesehen, und insbesondere als ein nützlicher Marker um Plasmazellen und germinale Zentrums B-Zellen zu unterscheiden. Die Expression von CD38 in der Maus unterscheidet sich von der beim Mensch. So wird CD38 auf humanen prä B-Zellen exprimiert, auf folliculären B-Zellen wird es herunter reguliert und auf germinalen Zentrums B-Zellen wird es wieder exprimiert. Bei der Maus wird es dagegen auf prä B-Zellen exprimiert, auf folliculären B-Zellen hoch reguliert und auf germinalen Zentrums-B-Zellen schließlich wieder herunter reguliert. Außerdem sind Plasmazellen in der Maus CD38<sup>-</sup> [139]. Auch die Expression von CD38 auf T-Zellen bzw. Thymozyten unterscheidet sich zwischen Mensch und Maus [171].

### 2.3.7 CD40

CD40 ist ein membrangebundenes Mitglied der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Familie. Im Säuger wurde die Expression von CD40 zunächst auf B-Zellen nachgewiesen, wo es während allen Entwicklungsstadien vorhanden ist, außerdem wird es auf einer Reihe anderer Zellen, wie Monozyten, Dendritischen Zellen, Endothel- und Epithelzellen exprimiert [172]. Der CD40-Ligand (CD40L/CD154), der zur TNF-Familie gehört, wird außer auf aktivierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen auch auf anderen Zellen exprimiert [173]. Im Säuger

konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CD40 mit CD40L für viele Schritte in der Entwicklung von B-Zellen von entscheidender Bedeutung ist [174]. So induziert die Aktivierung von CD40 Proliferation [175], Differenzierung zu Germinalen Zentrums B-Zellen, Klassenwechsel, Selektion und Reifung zu B-Gedächtniszellen [176]. Die terminale Differenzierung zur Plasmazelle wird durch die Aktivierung von CD40 allerdings verhindert [177].

### **2.3.8 CD138 (Syndecan-1)**

CD138 ist ein Mitglied der transmembranen Heparan-Sulfat-Proteoglykan Familie. Es fungiert als ein Rezeptor für Komponenten der extrazellulären Matrix, so bindet es zum Beispiel Kollagen [178], Fibronektin [179] und Thrombospondin [180] und ist an vielen zellulären Funktionen einschließlich der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt. Im Gewebe adulter Mäuse wird CD138 vor allem auf der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert [181]. Während der Embryonalentwicklung wird es dagegen im Mesenchym induziert. Die Expression von CD138 auf B-Zellen ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle. Im Knochenmark wird CD138 auf B-Zellvorläuferzellen exprimiert. Bevor diese das Knochenmark als reife B-Zellen verlassen wird die Expression von CD138 herunter reguliert. Periphere B-Zellen exprimieren kein CD138, erst während der Differenzierung zur Plasmazelle kommt es zur erneuten Expression von CD138. Die Bindung von CD138 an die Matrix könnte dazu dienen die Vorläuferzellen im Knochenmark „festzuhalten“, der Verlust der CD138-Expression könnte dann dazu führen, dass die reifen B-Zellen das Knochenmark verlassen können. Die fehlende Expression von CD138 würde es peripheren B-Zellen ermöglichen durch lymphatisches Gewebe zu wandern. Mit der Differenzierung zur Plasmazelle wird CD138 erneut exprimiert, sodass die Zellen wieder an das Interstitium binden können [182]. Gegen humanes CD138 wurden monoklonale Antikörper entwickelt. Diese sind unter den hämatopoetischen Zellen spezifisch für Plasmazellen [183, 184].

## 2.4 Möglichkeiten verschiedene B-Zell-Subpopulationen beim Huhn zu unterscheiden

Die B-Zellentwicklung im Huhn weist zwar einige Unterschiede zu der beim Säuger auf (siehe 2.2.2), trotzdem durchlaufen die B-Zellen während ihrer Reifung genauso verschiedene Stadien wie die B-Zellen im Säuger. Daher ist es naheliegend, dass es auch beim Huhn verschiedene B-Zellsubpopulationen gibt. Im Gegensatz zum Säuger, wo eine Vielzahl von Markern für die einzelnen Subpopulationen zur Verfügung steht, ist die Auswahl an B-Zellmarkern beim Huhn aber eher gering. Es gab trotzdem verschiedene Ansätze, um die B-Zellen beim Huhn in Subgruppen einzuteilen. Auf diese und auf die wenigen bekannten B-Zellmarker beim Huhn soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 2.4.1 Bu-1 (chB6)

Das Bu-1 Antigen ist ein wichtiger Marker für Hühner B-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Alloantigen handelt, für das zwei Allele- Bu-1a und Bu-1b existieren [185]. Das Bu-1-Antigen ist ein Homodimer mit einer Molekülmasse von 70 kDa [186]. Außer auf B-Zellen wird das Bu-1 Antigen auch auf einer Subgruppe von Makrophagen exprimiert [187]. Die Expression des Antigens ist nicht auf eine bestimmte Phase des Zellzyklus beschränkt [188]. Außerdem ist der Bu-1 Locus nicht mit dem MHC-Locus verknüpft [188]. Die Funktion von Bu-1 ist bisher noch unbekannt, aber es wurde berichtet, dass Bu-1 für das Überleben und für die Adhäsion während der B-Zellentwicklung von Bedeutung ist [189]. Es konnte keine Homologie zu einem B-Zellprotein im Säuger nachgewiesen werden [190].

Zunächst wurde ein monoklonaler Antikörper (L22) gegen Bu-1a beschrieben [191], einige Jahre später erfolgte die Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Bu-1b (11G2) [188]. Es gibt auch einen monoklonalen Antikörper, der sowohl Bu-1a als auch Bu-1b erkennt. Das Antigen, mit dem dieser Antikörper (AV20) reagiert ist eine monomorphe Determinante auf dem Bu-1 Antigen [186].

Antikörper gegen Bu-1 wurden in zahlreichen Ansätzen verwendet, um die Entwicklung von B-Zellen im Huhn zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass prä-bursale B-Zellen bereits chB6<sup>+</sup> sind, denn während der Embryonalentwicklung erscheinen chB6<sup>+</sup> Zellen fast gleichzeitig in Dottersack, Thymus, Bursa, Milz und Knochenmark etwa

zwischen Embryonaltag (ET) 9 und 11 [187]. Es wurde weiterhin beobachtet, dass die  $\text{chB6}^+$  Zellen, die sich in der Bursa entwickeln von Vorläufer-Zellen aus dem Blut abstammen und das  $\text{chB6}$ -Antigen schon exprimieren, wenn sie in die Bursa einwandern [192]. Das Bu-1-Antigen wird auf allen B-Zellen in Bursa und peripherem Blut gleich stark exprimiert [193]. Auf allen weiteren Differenzierungsstadien der B-Zellen wird das  $\text{chB6}$ -Antigen exprimiert, mit Ausnahme der Plasmazellen, die  $\text{chB6}^-$  sind [187].

#### 2.4.2 Sialyl-LewisX/ LewisX

Während der B-Zellentwicklung im Huhn wandern unreife, prä-bursale Stammzellen zwischen ET8 und ET15 in die Bursa-Anlage ein, um sich hier weiter zu differenzieren (siehe 2.2.3). Selektine sind in der Lage, das Sialyl-Lewis-X Carbohydrat-Epitop, ein sialyliertes, fucosyliertes Lactosamin zu binden [194]. Zusammen mit ihren Liganden mediiieren sie den Kontakt von Leukozyten mit Endothelzellen der Blutgefäße, dem ersten Schritt in einem mehrstufigen Prozess, der letztendlich zur Emigration der Leukozyten aus dem Gefäß führt [195]. Ob die gleiche Art von Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden für die Einwanderung von prä-bursalen B-Zellen in die Bursa von Bedeutung sein könnte, wurde von Masteller et al. untersucht [196]. Sie fanden heraus, dass der Selektin-Ligand Sialyl-Lewis-X auf B-Zellvorläufern exprimiert wird, die in der Lage sind in die Bursa einzuwandern. Zwischen ET15 und ET17 ändert sich die Expression von Carbohydraten auf der Zelloberfläche von sich entwickelnden B-Zellen in der Bursa [197]. Es wird dann Lewis-X an Stelle von Sialyl-Lewis-X exprimiert. Der Verlust der Expression von Sialyl-Lewis-X korreliert mit dem Zeitpunkt, ab dem sich entwickelnde B-Zellen nicht mehr in der Lage sind eine Bursa zu besiedeln. Der Grund hierfür könnte der Verlust von Oberflächenmolekülen sein, die essentiell für die Einwanderung in die Bursa sind. Die Veränderung der Expression ist gewebespezifisch, nur sich entwickelnde B-Zellen in der Bursa durchlaufen diese Veränderung, B-Zellvorläufer in der Milz exprimieren Sialyl-Lewis-X während der gesamten Embryonalentwicklung [196]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es eine starke Korrelation zwischen dem Glykosylierungs-Phänotyp und dem Status der Genkonversion gibt. So umfasst die Sialyl-Lewis-X<sup>+</sup> Population vor allem B-Zellen die noch keine Genkonversion durchlaufen haben, während die Genkonversion bei Zellen die Lewis-X auf ihrer Oberfläche exprimieren bereits stattgefunden hat. Der Wechsel von Sialyl-Lewis-X zu Lewis-X könnte für die B-Zelle nötig sein, um die Fähigkeit zu erlangen, ihre Immunglobulingene

durch Genkonversion zu modifizieren, oder Lewis-X könnte nur ein Marker für weiter differenzierte Zellen sein [198].

Zum Zeitpunkt des Schlupfes findet erneut eine Veränderung in der Glykosylierung der Zelloberfläche statt. B-Zellen regulieren dann die Expression von Lewis-X herunter, sodass nur noch geringe Mengen auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Die starke Expression von Lewis-X auf bursalen Lymphozyten könnte Zell-Zell-Interaktionen erleichtern, während die verminderte Expression die homotypischen Interaktionen zwischen Lewis-X und Lewis-X bzw. anderen Liganden unterbricht und so die Emigration von B-Zellen, die ihre Reifung in der Bursa abgeschlossen haben ermöglichen könnte [198].

### 2.4.3 CD40

Im Huhn konnte gezeigt werden, dass CD40 homogen auf allen AV20<sup>+</sup> B-Zellen aus Bursa, Milz, PBL (peripheren Blutleukozyten), Caecaltonsillen und Thymus exprimiert wird [199]. Außerdem wurde die Expression von CD40 auf Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten nachgewiesen [200].

In weiteren Studien mit dem löslichen Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass CD40L eine Proliferation der B-Zellen induziert. Außerdem durchliefen die stimulierten B-Zellen ein Differenzierungsprogramm, bei diesem entwickelten sich die unreifen, Bu-1<sup>++</sup>B-Zellen zu einem reiferen Bu-1<sup>+</sup> Stadium und schließlich zu einem Bu-1<sup>-</sup>sIg<sup>-</sup>cIgM<sup>+</sup> Phänotyp, der einer Plasmazelle ähnelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die B-Zellen zunächst alle CD40<sup>++</sup> sind, nach Stimulation mit CD40L aber zwei Populationen von B-Zellen unterschieden werden können. Die eine zeigt dann eine noch stärkere Expression von CD40 (CD40<sup>+++</sup>), während die andere nun weniger CD40 exprimiert (CD40<sup>+</sup>). Die CD40<sup>+++</sup> B-Zellen entsprechen Blasten und die CD40<sup>+</sup> Zellen sind kleine B-Zellen, die durch Stimulation mit CD40L nicht aktiviert wurden. Dies konnte bisher aber nur *in vitro* gezeigt werden [199].

### 2.4.4 FITC-Labeling

Die Markierung von bursalen B-Zellen mit kolloidalem Fluorescein Isothiocyanat (FITC) *in situ* ermöglichte die Unterscheidung von verschiedenen B-Zellpopulationen im peripheren Blut. Nach der Markierung mit FITC wurde bei den drei Wochen alten Tieren

eine Bursektomie durchgeführt. Basierend auf ihrer Halbwertszeit konnten dann drei verschiedene Populationen von B-Zellen im peripheren Blut unterschieden werden (siehe 2.2.4) [127].

#### 2.4.5 Ov-Antigen (chL12)

Das Ov-Antigen (chL12) ist ein gemeinsames Leukozyten Alloantigen mit einer Molekülmasse von 38-40kD [127]. Es wird erkannt vom monoklonalen Antikörper 11A9, da es sich um ein Alloantigen handelt erkennt dieser Antikörper jedoch nicht bei allen Tieren das Antigen [201]. Während der Embryonalentwicklung wird chL12 auf den meisten hämatopoetischen Zellen, und damit auch auf den sich entwickelnden B-Zellen exprimiert. Ov<sup>+</sup> Zellen wurden bereits an ET7 im Mesenchym im Bereich der späteren Aorta nachgewiesen [202]. An ET14 sind die Bu-1<sup>+</sup> Zellen in Milz und Bursa auch positiv für das Ov-Antigen. Zum Zeitpunkt des Schlupfes verschwindet das Antigen auf den meisten Zellen [106]. Es wurde außerdem gezeigt, dass B-Zellen die gerade aus der Bursa ausgewandert sind hohe Level an Ov-Antigen exprimieren [127], während nur etwa 10-20% der B-Zellen in der Bursa kurz nach dem Schlupf auch Ov<sup>+++</sup> sind [203]. Des Weiteren wurde die Expression von chL12 mit dem Überleben von bursalen B-Zellen nach Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht [203]. Daher wird angenommen, dass die Ov<sup>+++</sup> B-Zellen in der Bursa die Vorläufer für die auswandernden B-Zellen sind [127].

#### 2.4.6 CD80 (B7.1)

CD80 ist ein Typ I Glykoprotein, das aus zwei extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Teil besteht. CD80 wird im Säuger auf antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen/Monozyten und B-Zellen) exprimiert und bindet an CD28 auf T-Zellen. Durch diese Interaktion wird den T-Zellen ein kostimulatorisches Signal übermittelt das für ihre Aktivierung nötig ist [204]. CD80 wird auf naiven und frühen germinalen Zentrums B-Zellen nur in sehr geringer Menge exprimiert, auf aktivierten B-Zellen, späten Zentrozyten und Gedächtnis-B-Zellen wird es dagegen sehr stark exprimiert [10].

Im Huhn wurde ein monoklonaler Antikörper gegen chCD80 beschrieben, der bestimmte Zellen in der Milz und in der Bursa und intestinale dendritische Zellen erkennt [205]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CD80 auch im Huhn einen Aktivierungsmarker für B-Zellen darstellt. Denn in Kulturen von Milz-B-Zellen, die mit dem rekombinanten

chCD40L stimuliert wurden, beginnt ein Teil der B-Zellen CD80 zu exprimieren. Bei den Zellen die CD80 exprimieren handelt es sich um große, junge Lymphoblasten die durch Stimulation mit CD40L entstanden sind, während die kleinen Lymphozyten, die nicht proliferiert haben kein CD80 exprimieren. Bei den CD80<sup>+</sup> Zellen konnten außerdem zwei Populationen unterschieden werden. Die eine exprimiert auch nach längerer Stimulation mit CD40L noch hohe Mengen an CD80, bei diesen Zellen könnte es sich um aktivierte B-Zellen oder B-Gedächtniszellen handeln. Die andere Population zeigt eine abfallende Expression von CD80, diese Population könnte bereits terminal differenzierte B-Zellen enthalten, die sich schon in Richtung Plasmazelle differenzieren und deshalb weniger CD80 exprimieren (Dissertation Magdalena Schumacher) [206].

#### 2.4.7 CD57

Der monoklonale Antikörper HNK-1, der humanes CD57 erkennt wurde ursprünglich gegen eine humane Thymom-Zelllinie entwickelt, es konnte aber gezeigt werden, dass dieser mit dem CD57 Molekül im Huhn kreuzreagiert [207]. Im Säuger wird CD57 auf einer Reihe verschiedener Zellen exprimiert, darunter neuronale Zellen und natürliche Killerzellen [208]. Außerdem ist die Expression dieses Antigens auf humanen B-Zellen abhängig von der Aktivierung der Zellen [209]. Auch beim Huhn reagiert HNK-1 mit Komponenten des zentral-nervösen Systems [210]. Außerdem wird CD57 auf einer Subpopulation von T-Zellen und auch auf ellipsoid-assoziierten retikulären Zellen (EARC) in der Milz exprimiert. CD57 konnte auf bursalen B-Zellen zu einem hohen Prozentsatz nachgewiesen werden, während es auf B-Zellen im peripheren Blut nicht zu finden war. In den sekundär lymphatischen Organen können anhand der Expression von CD57 und Bu-1 drei verschiedene Populationen von B-Zellen unterschieden werden. Von Mast et al. konnte gezeigt werden, dass ruhende B-Zellen CD57<sup>-</sup>Bu-1<sup>+</sup> sind, germinale Zentrums-B-Zellen CD57<sup>+</sup>Bu-1<sup>+</sup> und Plasmazellen CD57<sup>++</sup>Bu-1<sup>-</sup> sind. CD57 stellt daher auch im Huhn einen Aktivierungsmarker für B-Zellen dar [211].

#### 2.4.8 Anti Ig-Antikörper

Antikörper gegen IgM, IgY und IgA des Huhnes sind verfügbar, und mit Hilfe dieser Antikörper können B-Zellen, die Immunglobuline verschiedener Subklassen auf ihrer Oberfläche tragen, unterschieden werden [212]. Die Verwendung dieser Antikörper ist von großer Bedeutung um die B-Zellentwicklung im Huhn genauer zu untersuchen. So konnte

gezeigt werden, dass die B-Zellvorläufer vor ihrer Einwanderung in die Bursa noch kein Ig auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, die ersten IgM-positiven Zellen ab ET12 in der Bursa in sehr geringer Zahl nachgewiesen werden können, und ihre Zahl danach stetig zunimmt, sodass an ET18 über 85% der Zellen in der Bursa IgM<sup>+</sup> sind [213]. Da es bisher keinen spezifischen Marker für Plasmazellen beim Huhn gibt, stellen Antikörper gegen Immunglobuline eine Möglichkeit dar, Plasmazellen anzusprechen. Je nach Organ produzieren Plasmazellen unterschiedliche Mengen an IgM, IgA und IgY (siehe 2.2.4).

Außerdem sind auch Antikörper gegen die leichte Kette des Hühner-Immunglobulin Moleküls verfügbar. Diese ermöglichen es B-Zellen anzusprechen die ein Immunglobulin-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen und dienen so als Marker für B-Zellen [214].



### **3 Zielsetzung der Arbeit**

Für die Untersuchung der B-Zellenwicklung im Huhn ist es nötig, die verschiedenen Entwicklungsstadien der B-Zellen gezielt ansprechen zu können. Die bisher verfügbaren Marker erkennen jedoch jeweils alle B-Zellen in gleichem Maße weshalb es mit Hilfe von diesen nicht möglich ist, verschiedene B-Zellsubpopulationen anzusprechen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit bereits vorhandene Marker auf Hühner-B-Zellen näher zu charakterisieren, und neue Marker für Hühner-B-Zellen zu generieren. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz sollten Antikörper gegen Bursazellen aus Hühnern generiert werden. Der zweite Ansatz war ein Kandidatengen-Ansatz mit CD138. CD138 stellt beim Mensch einen Plasmazellmarker dar. In diesem Ansatz sollten Antikörper gegen Hühner-CD138 generiert werden, und mit diesen untersucht werden, ob CD138 auch im Huhn einen Plasmazellmarker darstellt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

Zur Gewinnung von primären Lymphozyten aus Blut und Organen wurden Hühner der Linien M11 (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp) und LSL (Lohmann's selected Leghorn) verwendet. Die LSL-Eier und -Tiere wurden von der Firma LSL Rhein-Main bezogen, die Eier der Linie M11 vom Institut für Tierzucht in Mariensee. Die Eier wurden am Institut ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Volieren gehalten. Als Futter wurde handelsübliches Alleinfuttermittel verwendet, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Für die Generierung von monoklonalen Antikörpern wurden Mäuse vom Stamm BALB/c verwendet. Die Tiere stammten von Charles River Deutschland. Die Immunisierung wurde bei der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.21-1-54-2531.6-12-09 angezeigt.

### 4.2 Gewinnung von primären Hühnerleukozyten

#### 4.2.1 Material

Soweit nicht anders angegeben wurden die im Folgenden aufgeführten Reagenzien bei 4°C gelagert.

##### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2**

- 8,00g Natriumchlorid (NaCl)<sup>1</sup>
- 1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O)<sup>1</sup>
- 0,2g Kaliumchlorid (KCl)<sup>1</sup>
- 0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>1</sup>
- ad 1000ml Aqua dest.
- Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2
- Für Arbeiten in der Zellkultur autoklaviert.

##### **Ficoll Separating Solution<sup>2</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

**Heparinlösung (500 U/ml)**

1ml Heparin-Natrium 20.000<sup>3</sup>  
ad 40ml RPMI 1640 mit stabilem Glutamin  
("Glutamax", im Folgenden RPMI 1640)

**Falcon Filters 50µm<sup>24</sup> (Zellfilter)****Neubauer Zählkammer****Gefrierröhrchen<sup>25</sup>****4.2.2 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL)**

Die für die Blutentnahme verwendeten Spritzen wurden unter sterilen Bedingungen mit 0,2ml Heparinlösung benetzt. Es wurden Kanülen der Größe 22G verwendet. Die Blutentnahme erfolgte aus der linken Vena jugularis bzw. aus der linken oder rechten Vena ulnaris. Um das Vollblut in einzelne Fraktionen aufzutrennen wurde anschließend eine Ficoll-Präparation durchgeführt. Hierfür wurde das gewonnene Vollblut im Verhältnis 1 zu 1 mit kaltem PBS versetzt und anschließend auf eine gleich große Menge Ficoll Separating Solution geschichtet. Nach Zentrifugation bei RT und 650xg für 12min wurde die der Ficollösung aufliegende Lymphozytenschicht (Interphase) vorsichtig abgenommen und in PBS mittels eines erneuten Zentrifugationsschrittes bei 4°C und 470xg für 10 min gewaschen. Die qualitative und quantitative Beurteilung der Lymphozyten erfolgte anschließend durch eine Lebend-/Tot-Färbung mittels Trypanblau-Färbung (10µl Trypanblau-Lösung ad 10 µl Zellsuspension) in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer.

**4.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus Organen**

Die zur Organentnahme vorgesehenen Hühner wurden zunächst mechanisch betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet. Zunächst wurde das Abdomen mit 70% Ethanol benetzt und die Haut im Bauch und Brustbereich abgezogen. Danach wurde die Bauchhöhle mit einer Schere so weit eröffnet, dass das Sternum nach kranial umgeklappt werden konnte. Die Organentnahme erfolgte dann mit chirurgischen Instrumenten, die entnommenen Organe wurden sofort in Röhrchen mit kaltem PBS überführt und auf Eis gestellt. Um Knochenmark zu gewinnen wurde beidseits der Femur der Tiere entnommen.

Dazu wurde zunächst der Femurkopf luxiert und anschließend wurde die Oberschenkelmuskulatur abpräpariert. Nach Durchtrennen der Bänder im Knie- und Hüftgelenk wurde der Femur ebenfalls in ein Röhrchen mit kaltem PBS überführt.

Anschließend wurden die jeweiligen Organe (Milz, Bursa, Caecaltonsille) mit einem Spritzenstempel durch ein in PBS stehendes Sieb gedrückt. Die entstandene Organsuspension wurde in ein 50ml Zentrifugations-Röhrchen überführt, mit kaltem PBS auf 50ml aufgefüllt und für 10min auf Eis gestellt, um die größeren Gewebestücke durch Sedimentation entfernen zu können. Zur Präparation des Knochenmarks wurde der Femur mittels einer Schere in Höhe der Kondylen durchtrennt. Dann wurde mittels einer Knopfkanüle die vom Femurkopf her eingeführt wurde das Knochenmark mit kaltem PBS heraus gespült. Die weitere Präparation erfolgte analog zu den anderen Organen. Nach dem Sedimentations-Schritt wurde der Überstand bis auf 5ml abgenommen, in ein neues 50ml Zentrifugations-Röhrchen überführt und bei 4°C für 10min bei 225xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10ml PBS gelöst und auf 10ml Ficoll-Separating Solution geschichtet. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei RT und 650g für 12min wurde die Interphase vorsichtig abgenommen und wiederum in PBS bei 4°C für 10min bei 470xg gewaschen. Bursa-Zellsuspensionen die anschließend für eine durchflusszytometrische Färbung verwendet wurden, wurden mit einem Zellfilter filtriert um sicher zu stellen, dass eine Einzelzellsuspension vorlag. Die Beurteilung erfolgte dann ebenfalls über eine Trypanblau-Färbung (siehe 4.2.2).

#### **4.2.4 Gewinnung von Leukozyten aus embryonalen Organen**

Für die Entnahme von Embryonen wurden die bebrüteten Eier am Rand einer Glas-Petrischale aufgeschlagen und ihr Inhalt wurde in die Petrischale überführt. Der Embryo wurde dann sofort durch Dekapitation getötet. Im Anschluss daran wurde der Dottersack abgetrennt und der Embryo zur Entnahme der Organe auf ein Filterpapier gelegt. Die Entnahme von Milz und Bursa erfolgte mit feinen Instrumenten. Die Organe wurden dann sogleich in Röhrchen mit kaltem PBS überführt und auf Eis gestellt. Aufgrund der geringen Organgröße wurden Organe von mehreren Embryonen für eine Leukozytenpräparation eingesetzt. Die Homogenisierung der Organe erfolgte mit einer 1ml Spritze. Im Weiteren wurde vorgegangen wie unter 4.2.3 beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass 1ml Ficoll-Ansätze gewählt wurden und die Zellen in 15ml PBS gewaschen wurden.

## 4.3 Zellkultur

### 4.3.1 Medien und Zusätze

Soweit nicht anders angeführt wurden die im Folgenden aufgeführten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

#### Standardmedium

445ml	RPMI 1640 <sup>4</sup>
50ml	fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) <sup>2</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml in RPMI) <sup>2</sup>

Lagerung der Penicillin/Streptomycin-Lösung und des FBS als Aliquots bei -20°C.

#### B-Zellmedium

445ml	Iscove Basal Medium <sup>2</sup>
40ml	FBS <sup>2</sup>
10ml	Hühnerserum <sup>4</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml in RPMI) <sup>2</sup>
50µl	Selen/Insulin/Transferrin-Lösung <sup>13</sup>

Lagerung der Penicillin/Streptomycin-Lösung, des Hühnerserums und des FBS als Aliquots bei -20°C.

#### Einfriermedium

45ml	FBS <sup>2</sup>
5ml	DMSO (Dimethylsulfoxid (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO) <sup>1</sup>

Lagerung als Aliquot bei -20°C

#### Fusionsmedium

445ml	Iscove Basal Medium <sup>2</sup>
50ml	Low IgG <sup>5</sup>
10ml	muriner IL-6 Zellkulturüberstand
10ml	HAT (1x) <sup>4</sup>
5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

Lagerung des Low IgG und des HAT als Aliquot bei -20°C

**Erhaltungsmedium**

445ml	Iscove Basal Medium <sup>2</sup>
50ml	Low IgG <sup>5</sup>
10ml	muriner IL-6 Zellkulturüberstand
10ml	HT (1x) <sup>4</sup>
5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

**Medium für Sp2/0 Zellen und Klone aus der Fusion**

445ml	Iscove Basal Medium <sup>2</sup>
50ml	FBS <sup>2</sup>
5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

**4.3.2 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Zellart	Spezies	Transformation	Medium	Referenz
<b>HEK-293</b>	embryonale Zellen, Niere	Mensch	humanes Adenovirus	Standard	[215]
<b>HEK-293-T</b>	embryonale Zellen, Niere	Mensch	humanes Adenovirus	Standard	[216]
<b>SP2/0</b>	BALB/c Milzzellen/ Myelomzelllinie P3X63 AG8	Maus	Hybridom	Sp2/0- Medium	[217]

**Tabelle 2: verwendete Zelllinien**

Alle angegebenen Zelllinien wurden bei 37°C kultiviert.

**4.3.3 Stimulierung von Milzzellen mit CD40-Ligand**

Um Milzzellen mit CD40-Ligand zu stimulieren wurden die Milzzellen in Kultur genommen. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml in B-Zell-Medium aufgenommen. In 24-Loch-Platten erfolgte die Kultivierung in 1ml Medium pro Delle. Um die Zellen zu stimulieren wurde CD40-Ligand in einer Konzentration von  $2 \mu\text{g/ml}$  zugegeben. Die Zellen wurden dann für 3 Tage bei 40°C kultiviert.

#### 4.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst, in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C für 10 min bei 250xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer kleinen Menge PBS resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen (siehe 4.2.2) wurde das Röhrchen mit PBS auf 50ml aufgefüllt und die Zellen erneut bei 4°C für 10 min bei 258xg zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge des Einfriermediums resuspendiert sodass die Zelldichte  $1 \times 10^7$  Zellen/ml betrug. Von der Zellsuspension wurden dann jeweils 1,8ml in ein entsprechendes Gefrier Röhrchen überführt und über Nacht in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox (Abkühlung 1°C/min) bei -80°C eingefroren. Für bis zu einem Jahr verblieben die Zellen bei -80°C, für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 4.3.5 Auftauen von Zellen

Um Zellen aufzutauen, wurde die gefrorene Zellsuspension möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in ein 50ml Röhrchen überführt. Dann wurden schrittweise 50ml kaltes RPMI 1640 zugegeben, die ersten 20ml tropfenweise, um das zellschädigende DMSO langsam auszuverdünnen. Danach wurden die Zellen bei 4°C für 10 min bei 250xg abzentrifugiert und dann erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß der entsprechenden Größe überführt und in den Brutschrank verbracht.

### 4.4 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

#### 4.4.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung der Mäuse wurden Hühner-Bursazellen und in einem zweiten Ansatz stabil transfizierte HEK-293 chCD138-GFP Zellen (siehe 4.6.2) verwendet.

Die Gewinnung der Bursazellen erfolgte wie unter 4.2.3 beschrieben. Die zur Immunisierung verwendeten HEK-293 chCD138-GFP Zellen wurden abgelöst, bei 4°C für 10 min bei 258xg abzentrifugiert und anschließend gezählt (siehe 4.2.2). Das Volumen der Zellsuspension das  $1 \times 10^8$  Zellen entsprach wurde erneut mit PBS gewaschen und das

Pellet wurde dann in 500µl warmem PBS resuspendiert. Zur Immunisierung wurde eine Kanüle der Größe 22G verwendet. Die Mäuse wurden intraperitoneal immunisiert. Die Immunisierung wurde dreimal im Abstand von vier Wochen durchgeführt und schließlich nochmals drei Tage vor der Fusion. Die Immunisierung wurde bei der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.21-1-54-2531.6-12-09 angezeigt.

## **4.4.2 Fusion von Sp2/0-Zellen mit Maus-Milzzellen**

### **4.4.2.1 Material**

**RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>**

**Fusionsmedium (siehe 4.3.1)**

**Erhaltungsmedium (siehe 4.3.1)**

**Medium für Sp2/0 Zellen und Klone aus der Fusion (siehe 4.3.1)**

**Polyethylene Glykole 1500 (PEG)<sup>13</sup>**

### **4.4.2.2 Durchführung**

Die Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet und anschließend wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen und in kaltes RPMI überführt. Danach wurden die Milzzellen präpariert (siehe 4.2.3). Die Sp2/0-Zellen wurden in 50ml Röhren überführt und 10min bei 300xg und RT abzentrifugiert. Dann wurden die Zellpellets in ca. 10ml RPMI 1640 resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt (siehe 4.2.2).

Um die Zellen zu fusionieren, wurden alle Milzzellen und die entsprechende Menge Sp2/0-Zellen im Verhältnis 1:3 in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gemischt und bei RT für 5min bei 300xg zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet durch Klopfen gegen das Röhrchen gelockert. Anschließend wurden mit einer 2ml Spritze innerhalb von einer Minute 1,5ml 37°C-warmes PEG tropfenweise zugegeben. Nachdem das Röhrchen 1 Minute im Wasserbad bei 37°C inkubiert wurde, wurde tropfenweise 37°C warmes RPMI 1640 nach folgendem Schema zugegeben: in den ersten 30 Sekunden 1ml, dann innerhalb von 30 Sekunden 3ml in schließlich in den nächsten 60 Sekunden 16ml. Danach wurde das Röhrchen sofort bei RT für 5min bei 300xg zentrifugiert und im Anschluss daran für 5min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 420ml Fusionsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Delle auf 20



96-Lochplatten verteilt, woraufhin die Platten bei 37°C für 10 Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Die restliche Zellsuspension wurde in eine 175cm<sup>3</sup> Flasche pipettiert, bis zum nächsten Tag bei 37°C kultiviert und dann als Reserve weggefroren (siehe 4.3.4).

#### 4.4.3 Testen der Fusion

Zehn Tage nach der Fusion wurde der erste Test mittels FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden von den 96-Lochplatten aus den Dellen in denen ein Zellklon gewachsen war jeweils 100µl Überstand abgenommen und diese wieder durch Fusionsmedium ersetzt. Die Zellkulturüberstände von der Fusion mit den Hühner-Bursazellen wurden auf Bursazellen eines 3 Monate alten Huhnes getestet, die Zellkulturüberstände von der Fusion mit den stabil transfizierten HEK-293-chCD138 Zellen (siehe 4.6.2) wurden auf diesen Zellen getestet. Für die FACS-Färbung wurden jeweils 2x10<sup>5</sup> Zellen/Delle eingesetzt.

Positive Klone wurden anschließend auf 24-Lochplatten umgesetzt und weiterhin in HAT-Medium kultiviert. Nach erneutem Testen wurden die noch immer positiven Klone auf 6-Lochplatten und nachdem sie in diesen hochgewachsen waren auf 75cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen umgesetzt. In den 75cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen wurden die Klone dann mit HT-Medium kultiviert, welches nach einiger Zeit durch Sp2/0 Medium (siehe 4.3.1) ersetzt wurde. In der Zwischenzeit wurden immer wieder Zellen als Reserve weggefroren (siehe 4.3.4).

#### 4.4.4 Reklonierung

##### 4.4.4.1 Material

###### Medium

450ml	Iscove Basal Medium <sup>2</sup>
50ml	FBS <sup>2</sup>
10ml	muriner IL-6 Zellkulturüberstand
5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

#### 4.4.4.2 Durchführung

Da nach der Fusion in einer Delle der 96-Lochplatten oftmals mehr als ein Klon wächst, müssen die positiven Klone rekloniert werden, um sicher zu stellen, dass die gewonnen Antikörper monoklonal sind.

Dazu wurden die Zellen eines jeden Klons in einer Konzentration von 0,4 Zellen/ Delle auf vier 96-Lochplatten ausgesät und in oben genanntem Medium zehn Tage lang bei 37 °C kultiviert. Um sicher zu gehen, dass Klone wachsen wurde in der 12.Reihe jeder Platte eine Zellzahl von 10 Zellen/Delle ausgesät. Nach den zehn Tagen wurde erneut ein Test der Klone durchgeführt (siehe 4.4.3).

### 4.5 Klonierung von chCD138 mittels des GFP Fusion TOPO<sup>®</sup>TA Expression Kits

#### 4.5.1 Primer

Da das Insert später in den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert werden sollte wurden die Primer so gestaltet, dass das durch die PCR amplifizierte DNA-Fragment nur der Länge des gewünschten Inserts entsprach und keine zusätzlichen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt wurden.

#### 4.5.2 Polymerase Kettenreaktion

Mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es möglich ein bestimmtes DNA-Fragment anhand einer DNA-Matritze zu amplifizieren. Dazu werden eine hitzestabile Polymerase und Sequenz-spezifische Primer verwendet. Die Reaktion läuft in einem Thermocycler ab, dabei werden pro Zyklus nacheinander drei Phasen durchlaufen. Zuerst erfolgt eine Erhitzung auf 95°C, dabei kommt es zur Trennung der DNA-Doppelstränge. Danach erfolgt die Anlagerung der Primer bei der Primer-spezifischen Temperatur, und in der anschließenden Phase der Elongation synthetisiert die Polymerase bei 72°C den komplementären DNA-Strang. Initial wird eine Denaturierungsphase bei 98°C durchlaufen und am Ende der PCR findet noch eine finale Elongationsphase bei 72°C statt.

#### 4.5.2.1 Material

**Phusion® Hot Start II Polymerase<sup>7</sup>**

**5x Fusion HF Buffer<sup>7</sup>**

**dNTP 2mM<sup>7</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**Primer 1 pmol/μl<sup>10</sup>**

Lagerung aller Reagenzien bei -20°C

#### 4.5.2.2 Durchführung

##### Ansatz für eine PCR-Reaktion:

10μl	sense-Primer
10μl	antisense-Primer
10μl	5x Fusion HF Buffer
5μl	dNTP
0,5μl	Phusion® Hot Start II Polymerase
1μl	cDNA oder Aqua bidest., nukleasefrei für Negativkontrolle
ad 50μl	Aqua bidest., nukleasefrei

Wenn mehrere Ansätze durchgeführt wurden, dann wurde aus oben genannten Reagenzien ein Master-Mix hergestellt, der dann auf die einzelnen Ansätze verteilt wurde. Die Reaktion erfolgte wie oben beschrieben im Thermocycler und die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

#### 4.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

##### 4.5.3.1 Material

##### EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)

186,1g Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-Dinatrium-Dihydrat ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$ )<sup>1</sup>

20g Natriumhydroxid (NaOH)<sup>1</sup>

ad 700ml Aqua dest.

pH 8,0 eingestellt mit NaOH, Lagerung bei Raumtemperatur

**5x TBE-Puffer**

54g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan <sup>1</sup>
27,5g	Borsäure <sup>1</sup>
20ml	EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)
ad 1l	Aqua dest.

**0,5x TBE-Puffer**

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

**1% Agarose**

0,5g	Agarose <sup>1</sup>
50ml	0,5x TBE Puffer

kurz vor Gebrauch ansetzen

**DNA-Ladder-Mix<sup>7</sup> (Marker)****6x LoadingDye Solution<sup>7</sup> (Ladepuffer)****GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain 10.000x<sup>8</sup>**

im 6xLoadingDye 1:100 verdünnt

im Marker:

- 100µl Marker,
- 400µl nuklaese-freies Wasser und
- 100µl 6xLoadingDye

**4.5.3.2 Durchführung**

Die verwendeten Agarose-Gele wurden in einer Konzentration von 0,8% gegossen. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle gekocht bis eine klare Lösung entstanden war. Nach Abkühlen der Lösung auf ca.60°C wurde diese in die Elektrophorese-Kammer mit eingesetztem Probenaschenkamm gefüllt. Wenn das Agarose-Gel ausgehärtet war, wurde der Probenaschenkamm entfernt und das Gel mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit dem Ladepuffer (Loading Dye) gemischt (1µl 6xLoading-Dye und 5µl Probe) und in die Taschen des Gels

eingbracht. Als Referenzgröße wurde ein Marker aufgetragen, der DNA-Stücke definierter Länge enthält.

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 Volt durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend fotografiert.

#### 4.5.4 Aufreinigung von DNA

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Wizard®SV Gel and PCR Clean Up System<sup>12</sup> gemäß den Hersteller-Angaben aufgereinigt.

#### 4.5.5 Anfügen von A`-Überhängen

Da der pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO® Vektor am 3`Ende einzelne Thymidin-Überhänge besitzt ist es notwendig an das 3`Ende des PCR-Produkts einzelne Desoxyadenosin-Überhänge anzufügen um eine Klonierung in den Vektor zu ermöglichen. Dazu wird eine Taq-Polymerase verwendet, die eine nicht-Template abhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt und einzelne Desoxyadenosin-Nukleotide an das 3`Ende der DNA-Stücke hinzufügt.

##### 4.5.5.1 Material

**Taq Polymerase<sup>7</sup>**

**MgCl<sub>2</sub> Lösung 25mM<sup>9</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**10x Taq Puffer<sup>7</sup>**

**dNTP 2mM<sup>7</sup>**

Lagerung aller Reagenzien bei -20°

##### 4.5.5.2 Durchführung

**Ansatz für eine Reaktion:**

4µl	MgCl
5µl	10x Puffer
5µl	dNTP
23µl	aufgereinigtes PCR-Produkt

0,25µl	Taq Polymerase
ad 50µl	Aqua bidest., nukleasefrei

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und der Ansatz für 20 Minuten bei 72°C auf dem Thermoblock inkubiert.

## 4.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

### 4.5.6.1 Material

#### CT- GFP Fusion TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit<sup>4</sup>

Lagerung bei -20°C, enthält:

- pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup>
- Salz Lösung: 1,2 M NaCl  
0,06 M MgCl<sub>2</sub>
- Aqua dest., nukleasefrei

### 4.5.6.2 Durchführung

#### Ansatz für eine Reaktion:

3 µl	PCR-Produkt
1µl	Salz-Lösung
1µl	TOPO <sup>®</sup> Vektor
1µl	Aqua dest., nukleasefrei

Die Ligation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Reagenzien vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion auf Eis gestellt und direkt im Anschluss wurde die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien durchgeführt.

## 4.5.7 Transformation von Bakterien

Das erstellte Plasmid wurde in chemisch kompetente Bakterien des E.coli-Stamms TOP 10 eingebracht.

### 4.5.7.1 Material

#### One Shot<sup>®</sup> E.coli TOP 10<sup>4</sup>

#### Ampicillin 100µg/ml<sup>11</sup>

Lagerung als 500µl Aliquots bei -20°C

#### S.O.C.-Medium<sup>4</sup>

Lagerung bei -20°C; zur Durchführung der Transformation auf Raumtemperatur erwärmen

#### LB-Agar-Platten

25g                    Luria Broth Base (LB)-Agar Pulver<sup>1</sup>  
ad 1l                    Aqua dest.; autoklaviert; Lagerung bei 4°C  
dem auf ca. 60°C abgekühlten, aber noch flüssigen Agar wurde Ampicillin  
in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt.

### 4.5.7.2 Durchführung

Die Bakterien wurden für 10 Minuten auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 2µl der Ligationsreaktion zugegeben. Da die Zellwand der Bakterien durch die chemische Vorbehandlung äußerst instabil ist, wurde die Ligationsreaktion vorsichtig mit der Pipettenspitze eingerührt und nicht durch auf- und abpipettieren vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Hitzebehandlung der Bakterien für 30 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad. Danach wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt und es erfolgte die Zugabe von 250µl S.O.C.-Medium. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Dann wurden 50µl bzw. 200µl der Transformations-Reaktion auf eine auf 37°C vorgewärmte LB-Agar-Platten, die mit Ampicillin versetzt worden war ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 4.5.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien

### 4.5.8.1 Material

Glycerol<sup>1</sup>

Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System<sup>12</sup>

Wizard® Plus SV Midiprep DNA Purification<sup>12</sup>

### 4.5.8.2 Durchführung

Von den bebrüteten LB-Agarplatten wurden 5-10 Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in jeweils 5ml steriles LB-Medium mit Ampicillin abgeworfen. Die Ansätze wurden dann über Nacht bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst ein Bakterienstock angelegt; dazu wurden 850µl der Bakteriensuspension mit 150µl Glycerol gemischt. Aus der restlichen Bakteriensuspension wurde das Plasmid entweder mit Hilfe des "Wizard® Plus Miniprep Kits" oder des "Wizard® Plus Midiprep Kits" nach Herstellerangaben aufgereinigt.

## 4.5.9 Erfolgskontrolle der Ligation

Um die korrekte Integration des Inserts in den Vektor zu überprüfen wurde ein analytischer Restriktionsenzymverdau durchgeführt.

Dazu wurde ein Enzym mit nur wenigen Schnittstellen ausgewählt, welches sowohl im Vektor als auch im Insert schneidet. In einer darauffolgenden Gelelektrophorese konnte anhand der Länge der Fragmente die korrekte Integration überprüft werden.

### 4.5.9.1 Material

#### LB-Medium

25g	Luria Broth Base (LB)-Agar Pulver <sup>1</sup>
ad 1l	Aqua dest.; sofort nach Herstellung autoklavieren; Lagerung bei 4°C

#### Ampicillin 100µg/ml<sup>11</sup>

Lagerung als 500µl Aliquots bei -20°C



**Restriktions-Endonuklease****Restriktions-Endonuklease spezifischer Reaktionspuffer****Aqua bidest., nukleasefrei****4.5.9.2 Durchführung****Ansatz für einen diagnostischen Verdau:**

0,3-0,5µg	Plasmid-DNA
1µl	Restriktionsenzym
2µl	Enzymspezifischer Reaktionspuffer (10x)
Ad 20µl	Aqua bidest., nukleasefrei

Um einen analytischen Verdau durchzuführen wurden zuerst Aqua dest. und Puffer gemischt, dann wurden die Enzyme zugegeben und am Ende erfolgte die Zugabe der DNA. Der Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 37°C und 600rpm im Thermoschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Enzyme bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Plasmide bei denen in der Gelelektrophorese Banden an den erwarteten Stellen zusehen waren wurden anschließend zur Bestätigung der korrekten Sequenz an die Firma GATC Konstanz geschickt.

**4.6 Rekombinante Expression von chCD138 (K116) in eukaryotischen Zellen****4.6.1 Transiente Transfektion von HEK 293-T-Zellen****4.6.1.1 Material****Plasmid ( K116)****HEK 293-T-Zellen****Standard-Medium für HEK 293-T-Zellen (siehe 4.3.1)****RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>****FuGene® HD Transfection Reagent<sup>12</sup>**

#### 4.6.1.2 Durchführung

HEK 293-T-Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass die Zellen am Tag der Transfektion eine Dichte von ca. 90% hatten. Für eine Transfektion in einer 10cm Zellkulturschale wurden  $2 \times 10^6$  Zellen im 10ml Standard-Medium ausgesät. Bevor am nächsten Tag die Transfektion durchgeführt wurde wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurde die Transfektionslösung nach folgendem Schema hergestellt:

##### 500µl-Ansatz:

10µg	Plasmid
30µl	FuGene® HD Transfection Reagent <sup>12</sup>
Ad 500µl	RPMI 1640 Medium <sup>4</sup>

Dazu wurde zunächst das Medium in ein steriles Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und dann das Plasmid zugegeben. Nachdem der Ansatz gemischt worden war erfolgte die Zugabe des FuGene® HD Transfection Reagents. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieses nicht in Kontakt mit den Wänden des Röhrchens kommt, sondern direkt in die Flüssigkeit pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Dann wurden die HEK 293-Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Falle einer erfolgreichen Transfektion waren nach dieser Zeit im Fluroeszenzmikroskop grün leuchtende Zellen zu sehen.

#### 4.6.2 Stabile Transfektion von HEK 293 Zellen

Für eine stabile Transfektion wird ein zweites im Vektor enthaltenes Antibiotika-Resistenzgen (in diesem Falle für eine Neomycin-Resistenz) benötigt. Hierdurch wird durch Zugabe dieses Antibiotikums zum Zell-Kulturmedium eine Selektion transfizierter Zellen möglich.

##### 4.6.2.1 Material

**Plasmid**

**HEK 293-Zellen**

**RMPI 1640 Medium<sup>4</sup>**

**Standard-Medium für HEK 293-T-Zellen (siehe 4.3.1)**

**FuGene® HD Transfection Reagent<sup>12</sup>**

**Selektionsmedium**

450ml	RPMI 1640 <sup>4</sup>
50ml	FBS <sup>2</sup>
250µg/ml	Geneticin (G418) <sup>2</sup> (50mg/ml)

Zusatz des Antibiotikums kurz vor Verwendung des Mediums.

**4.6.2.2 Durchführung**

Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen am Vortag in 24-Lochplatten in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Delle ausgesät. Die Transfektion wurde wie unter 4.6.1.2 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass ein 100µl-Ansatz gewählt wurde.

**100µl Ansatz:**

2µg	Plasmid
6µl	FuGene® HD Transfection Reagent <sup>12</sup>
Ad 100µl	RPMI 1640 Medium <sup>4</sup>

Pro Delle der 24-Lochplatten wurden 25µl der Transfektions-Lösung aufgetropft.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die adhärennten Zellen in den Dellen der 24-Lochplatten aufsuspendiert und 10µl der Zellsuspension in 20ml Selektionsmedium gegeben. Diese Zellsuspension wurde dann mit 200µl pro Delle in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach etwa 2 bis 3 Wochen waren Kolonien auf der Platte sichtbar. Sobald das Zellkulturmedium einen Farbumschlag zeigte wurden die Zellen aufsuspendiert, das gesamte Medium entnommen und die Delle erneut mit frischem Selektionsmedium aufgefüllt. Durch dieses Vorgehen wurde verhindert, dass sich plasmid-negative Klone aufgrund der mit der Zeit nachlassenden Aktivität des Geneticins vermehren konnten. Die entnommenen Zellkulturüberstände wurden verwendet, um einen ersten Test der Klone mittels FACS-Analyse durchzuführen. Die Klone die positiv waren wurden weiter gezogen. Sobald erneut ein Farbumschlag des Zellkulturmediums zu sehen war wurden die Zellen aufsuspendiert in das nächst größere Zellkulturgefäß überführt und unter anhaltendem Selektionsdruck kultiviert.

## 4.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die generierten Antikörper Hühner-Immunglobuline erkennen.

### 4.7.1 Material

#### NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten<sup>25</sup>

##### Beschichtungspuffer pH 9,6

3,1g	Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) <sup>1</sup>
6g	Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) <sup>1</sup>
ad 1l	Aqua bidest.

pH auf 9,6 eingestellt, Lagerung bei 4°C

##### Magermilchlösung 4%

4g	Magermilchpulver <sup>1</sup>
ad 100ml	PBS (siehe 4.2.1)

kurz vor Gebrauch ansetzen

##### PBS-T (0,05% Tween 20)

0,5ml	Tween20 <sup>11</sup>
ad 1l	PBS

##### TMB-Puffer

8,2g	Na-Azetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) <sup>1</sup>
3,15g	Zitronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ ) <sup>1</sup>
ad 1l	Aqua bidest.

Lagerung bei 4°C

##### TMB-Stammlösung

6mg	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB) <sup>6</sup>
ad 1ml	DMSO <sup>6</sup>

Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

**TMB-Gebrauchslösung**

10ml	TMB-Puffer 37°C
332µl	TMB Stammlösung
3µl	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup>

Kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden.

**Schwefelsäure 1M**

472ml	Aqua dest.
28ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96% <sup>2</sup>

Wasser vorlegen und langsam unter Rühren die Säure zugeben.

**Hühner-Serum<sup>4</sup>****Antikörper**

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
2G1	ch Ig-leichte Kette	IgG1	Maus	pur	[214]
anti-Maus IgG POD	Maus IgG	polyklonal	Ziege	10.000	<sup>15</sup>

**Tabelle 3: Im ELISA eingesetzte Antikörper**

**4.7.2 Durchführung**

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die angegebenen Volumina auf die Kavität einer Nunc Maxisorb 96-Lochplatte. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde die Platte jeweils dreimal mit Hilfe eines ELISA-Washers mit PBS-T gewaschen. Inkubationen erfolgten für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Sofern nicht anders angegeben erfolgten alle Verdünnungen in PBS-T.

Die Platten wurden jeweils am Vortag mit 100µl des 1:100 in Beschichtungspuffer verdünnten Hühner-Serums beschichtet und anschließend bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde für jede Probe eine Kavität der 96-Lochplatte ohne Beschichtung mitgeführt. Am nächsten Tag wurde die Platte zunächst gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen durch Aufbringen von

200µl einer 4%igen Magermilchlösung. Nach einstündiger Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C erfolgte das Auftragen von 100µl der zu testenden Antikörper. Als Positivkontrolle diente hierbei ein Antikörper gegen die leichte Kette des Hühner-Immunglobulinmoleküls (2G1). Dieser wurde unverdünnt eingesetzt und log<sub>2</sub> verdünnt. Nachdem die Platte wiederum für eine Stunde bei 37°C inkubiert worden war, wurden 50µl des sekundären Antikörpers aufgetragen und die Platte nochmals für maximal 60 Minuten inkubiert. Zur Entwicklung wurden 100ml einer auf 37°C vorgewärmten TMB-Gebrauchslösung aufgetragen und die Platte für 5 bis 10 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle einer positiven Reaktion färbte sich der Inhalt der Delle blau. Um die Reaktion abzustoppen wurden 50µl einer 1M Schwefelsäure zugegeben, dadurch kam es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm im Plattenphotometer.

## 4.8 Durchflusszytometrie

### 4.8.1 Material

#### Fluo-Puffer

5g	Bovines Serum Albumin <sup>1</sup>
50mg	Natrium-Azid (NaN <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>
ad 500ml	PBS
Lagerung bei 4°C	

#### Fluo-Puffer 0,1% EDTA

500ml	Fluo-Puffer
500mg	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-Tetranatrium-Dihydrat (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>
Lagerung bei 4°C	

#### Propidiumjodid (PI)

200µg	Propidiumjodid <sup>2</sup>
ad 1ml	PBS
Lagerung der Aliquots bei -20°C	

**7-Amino-Actinomycin-D<sup>17</sup> (7-AAD)**

1mg            7-AAD<sup>6</sup>  
0,5ml        Methanol<sup>1</sup>  
ad 5ml        Aqua bidest  
Lagerung der Aliquots bei -20°C

**Paraformaldehyd (PFA) 4%**

20g            Paraformaldehyd<sup>1</sup> ( (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>)  
ad 450ml      A.bidest.  
im Wasserbad bei 60°C ca. 1 Stunde rühren, dann  
einige Tropfen NaOH<sup>1</sup> zugeben um das restliche PFA in Lösung zu bringen,  
50ml            10x PBS zugeben  
Lagerung bei 4°C

**Normal Maus Serum<sup>4</sup>****Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Klonname	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration
	Antigen			
AV20	chB6	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
11C6	chIgLc	IgG3	Maus	10µg/ml
2G1	chIgLc	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
M2	chIgM	IgG2a		5µg/ml
AV79	chCD40	IgG2a	Maus	0,5µg/ml
16-6	chCD45	IgG2a	Maus	2µg/ml
LT40	chCD45	IgM	Maus	5µg/ml
8D12	chIRAB1	IgG2a	Maus	Zellkulturüberstand
3H7	CHIR-B2	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand
8D12	CHIR-AB1	IgG2a	Maus	Zellkulturüberstand
28-4	unbekannt	IgG3	Maus	1:100
4A5	unbekannt	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
CD15	huCD15	IgG1	Maus	2,5µg/ml
CD15s	huCD15s	IgM	Maus	5µg/ml
CT-3	chCD3	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
3-298	chCD8	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand
K1	chTz, chMz	IgG2a	Maus	Zellkulturüberstand
Kul1	chMz, chMQ	IgG1	Maus	1:1000
F71D7	Hapten	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand

**Tabelle 4: Primär-Antikörper für die Durchflusszytometrie**

chTrz: Hühner-Thromozyten, chMz: Hühner-Monozyten, chMQ: Hühner-Makrophagen

Klonname	gebundenes Antigen	Isotyp	Konjugat	Tierart	Konzentration
	Antigen				
AV20	chB6	IgG1	FITC	Maus	1:300
AV20	chB6	IgG1	RPE	Maus	1:100
AV20	chB6	IgG1	APC	Maus	1:1000
2G1	chIgLc	IgG1	FITC	Maus	1:100
2G1	chIgLc	IgG1	APC	Maus	1:500
CT-3	chCD3	IgG1	FITC	Maus	1:50
3-298	chCD8	IgG2b	FITC	Maus	1:500
16-6	chCD45	IgG2a	FITC	Maus	1:50
LT40	chCD45	IgM	APC	Maus	1:100

**Tabelle 5: Direkt-konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie**



Antikörper	Verdünnung
Ziege-anti-Maus-IgG FITC <sup>6</sup>	1:250
Ziege-anti-Maus-IgG1 FITC <sup>14</sup>	1:200
Ziege-anti-Maus-IgG2a FITC <sup>14</sup>	1:100
Ziege-anti-Maus-IgG2b FITC <sup>14</sup>	1:200
Ziege-anti-Maus-IgG3 FITC <sup>14</sup>	1:200
Ziege-anti-Maus-IgM FITC <sup>14</sup>	1:200
Ziege-anti-Maus-IgG PE <sup>15</sup>	1:200
Ziege-anti-Maus-IgG1PE <sup>14</sup>	1:300
Ziege-anti-Maus-IgG2a PE <sup>14</sup>	1:300
Ziege-anti-Maus-IgG2b PE <sup>14</sup>	1:300
Ziege-anti-Maus-IgG3 PE <sup>14</sup>	1:300
Ziege-anti-Maus-IgM PE <sup>14</sup>	1:2000

**Tabelle 6: Sekundär-Antikörper für die Durchflusszytometrie**

#### 4.8.2 Einfachfärbung indirekt

Für die Färbungen wurden jeweils 96-Rundlochplatten verwendet, alle Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Delle. Die Inkubationsschritte erfolgten stets im Dunklen auf Eis. Die Verdünnungen wurden in Fluo-Puffer angesetzt.

Pro Delle wurden  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die entsprechende Menge der Zellsuspension wurde in der Platte für eine Minute bei 716xg zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurde das Zellpellet in 50µl der Verdünnung des entsprechenden Primär-Antikörpers resuspendiert. Nach einer 25-minütigen Inkubation wurden 200µl Fluo-Puffer zugegeben und die Platte wurde erneut eine Minute bei 716xg zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 40µl des Sekundär-Antikörpers resuspendiert und die Platte anschließend für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Fluo-Puffer. Zur Messung wurden die Zellen in 200µl Fluo-Puffer resuspendiert und entweder direkt aus der Platte gemessen oder in geeignete Probenröhrchen überführt in welche nochmals 200µl Fluo-Puffer zugegeben wurden. Um eine Lebend-Tot-Färbung durchzuführen wurden pro Röhrchen 10 µl Propidiumiodid (Endkonzentration 2µg/ml) bzw. 7-AAD (Endkonzentration 2µg/ml) hinzugefügt.

### 4.8.3 Einfachfärbung direkt

Bei der direkten Einfachfärbung wurde an Stelle der Kombination von primärem und sekundären Antikörper ein primärer Antikörper verwendet, der direkt mit einem Flurochrom markiert war. So konnte die Färbung in einem Schritt erfolgen.

### 4.8.4 Mehrfachfärbung indirekt

Für die Doppelfärbungen wurden verschiedene primäre Antikörper unterschiedlichen Isotyps miteinander kombiniert. Im zweiten Schritt wurden dann die entsprechenden isotypspezifischen, mit unterschiedlichen Flurochromen markierten sekundären Antikörper zugegeben.

Bei diesen Färbungen wurde das Zellpellet zunächst in beiden primären Antikörpern resuspendiert und anschließend für 25 Minuten inkubiert. Nach dem Waschschrift erfolgte eine Inkubation mit einer Mischung aus den beiden isotypspezifischen sekundären Antikörpern.

Für Mehrfachfärbungen mit mehr als zwei primären Antikörpern wurden die Zellen zunächst mit einer Mischung aus allen primären Antikörpern inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit der Mischung aus den benötigten isotypspezifischen sekundären Antikörpern.

Im Falle einer Doppelfärbung mit zwei primären Antikörpern des gleichen Isotyps wurde zwischen den einzelnen Färbungen eine Blockierung mit Normal Maus Serum durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Einfachfärbung mit einem der primären Antikörper und dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe 4.8.3). Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in 40 µl des 1:20 verdünnten Maus-Serums gelöst und für 20 Minuten inkubiert. Im Weiteren erfolgte dann eine zusätzliche Einfachfärbung mit dem zweiten direkt konjugierten primären Antikörper des gleichen Isotyps.

### 4.8.5 Mehrfachfärbungen direkt

Bei direkten Mehrfachfärbungen wurden die Zellen in 50 µl einer Mischung aus verschiedenen, mit Flurochromen markierten primären Antikörpern inkubiert.

## 4.8.6 Messung der Proben und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte jeweils am FACS CantoII oder FACS CantoII mit HTS. Die anschließende Auswertung der Messungen wurde mit DIVA- oder FlowJo-Software durchgeführt.

## 4.9 Histologie

### 4.9.1 Material

**TissueTek®<sup>12</sup>**

**Peel-Off-Einbettkassetten für Kryohistologie<sup>17</sup>**

**flüssiger Stickstoff<sup>18</sup>**

**Aluminiumfolie<sup>19</sup>**

**SuperFrost®Plus Objektträger<sup>16</sup>**

**feuchte Kammer**

**Imm-Edge-Pen<sup>20</sup>**

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (siehe 4.2.1)**

**Parafilm®<sup>19</sup>**

**Aceton<sup>1</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur, Verwendung eisgekühlt

**30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

**Methanol 40%<sup>21</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

**Bovines Serumalbumin (BSA)<sup>6</sup>**

Lagerung bei 4°C

**Pferdeserum<sup>20</sup>**

Lagerung bei -20°C

**Primäre Antikörper**

Lagerung bei 4°C

**Avidin/Biotin Blocking Kit<sup>20</sup>**

Lagerung bei 4°C

**Vectastain® ABC-Kit<sup>20</sup>**

Lagerung bei 4°C

**Vektor® DAB Kit<sup>20</sup>**

Lagerung bei 4°C

**Aqua dest.****Mayer`s Hämatoxylin-Lösung<sup>22</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

**Aufsteigende Alkoholreihe**Ethanol<sup>23</sup> 70%Ethanol<sup>23</sup> 96%Isopropanol<sup>23</sup> 1Isopropanol<sup>23</sup> 2Xylol<sup>23</sup> 1Xylol<sup>23</sup> 2

Lagerung bei Raumtemperatur

**Eukitt® Eindeckelmedium<sup>6</sup>**

Lagerung bei Raumtemperatur

**Deckgläser<sup>22</sup>**

#### 4.9.2 Entnahme von Organen und Vorbereitung für die Histologie

Die Organentnahme erfolge wie unter 4.2.3 beschrieben. Anschließend wurden die Organe in mit TissueTek® gefüllte Peel-Off-Einbettkassetten überführt. Nach dem Einbetten wurden die Behältnisse mit den Organen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Schälchen bis zum vollständigen Durchfrieren mit einer Pinzette in den flüssigen Stickstoff gehalten. Wobei darauf geachtet wurde, dass kein Stickstoff auf die Oberfläche des TissueTek® gelangt, da dies zur Bildung von Blasen führt. Die Blöcke wurden anschließend in Alufolie eingewickelt und bei -80°C gelagert.

#### 4.9.3 Herstellung von Gewebeschnitten

Von den Kryoblöcken wurden mit Hilfe eines Kryotoms der Firma Thermo Scientific 8µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf Superfrost® Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 4.9.4 Vorbereitung der Schnitte für die Färbungen

Vor Beginn der immunhistologischen Färbung wurden die Gefrierschnitte zwei Minuten in eisgekühltem Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zehn Minuten luftgetrocknet und dann für 15 Minuten in PBS gewässert.

#### 4.9.5 Immunhistologische Färbungen

In Organen mit hoher endogener Peroxidaseaktivität wie zum Beispiel der Milz wurde im ersten Schritt zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität eine Lösung von 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 40% igem Methanol auf die Schnitte aufgetragen und diese mit Parafilm bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung durch dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für jeweils fünf Minuten entfernt. Vor dem nächsten Schritt wurden dann die Schnitte auf dem Objektträger mit hydrophobem Markierstift umrandet. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zur Blockierung von unspezifischen Bindungen eine Stunde lang mit einer Blockierlösung aus Pferdeserum 1:40 in PBS mit 1% BSA inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Blockierlösung vorsichtig abgekippt, es erfolgte kein Waschen mit PBS.

Bei Milzschnitten erfolgte an dieser Stelle ein zusätzlicher Schritt um endogenes Biotin zu blockieren. Dazu wurde nach Abkippen der Blockierlösung die unverdünnte Biotin-Lösung auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten in der feuchten Kammer wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen und im Anschluss daran für 15 Minuten mit einer Avidin-Lösung in der feuchten Kammer inkubiert, woraufhin die Schnitte erneut in PBS gewaschen wurden.

Im nächsten Schritt erfolgte das Auftragen des jeweiligen Primärantikörpers verdünnt in PBS. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Schnitt der statt mit dem Primärantikörper mit PBS bedeckt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der biotinierte anti-Maus-IgG-Antikörper aufgetragen und die Schnitte damit 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte wiederum dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde für 30 Minuten vorinkubiertes Avidin-Peroxidase-Reagenz aufgetragen und die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer

inkubiert. Anschließend erfolgte das Entwickeln der Schnitte mit dem Vector® DAB-Kit. Die DAB-Lösung wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und auf die Schnitte aufgebracht. Nach zwei Minuten Inkubation wurde die DAB-Lösung abgekippt.

Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht, dann für 35 Sekunden in Mayer`s Hämatoxylin-Lösung verbracht und anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Hierbei entsteht ein Komplex aus dem Hämalaun und den Calcium-Ionen aus dem Leitungswasser, der dann zu der Blaufärbung führt.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden sie unter einem Abzug jeweils 15 mal in die entsprechende Alkohollösung getaucht. Zum Schluss wurden die Präparate mit einem passenden Deckglas, auf das ein bis zwei Tropfen Eukitt® Eindeckelmedium gegeben wurden eingedeckelt.

#### **4.9.6 Fotodokumentation der histologischen Färbungen**

Die Betrachtung der histologischen Schnitte erfolgte mit einem Zeiss Axioskop, Durchlichtaufnahmen wurden mit einer AxioCam MRc5 der Firma Zeiss angefertigt. Dazu wurde die Software Axiovision Rel. 4.8 verwendet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung bereits vorhandener Antikörper

#### 5.1.1 Antikörper 3H7, 8D12, 28-4 und 4A5

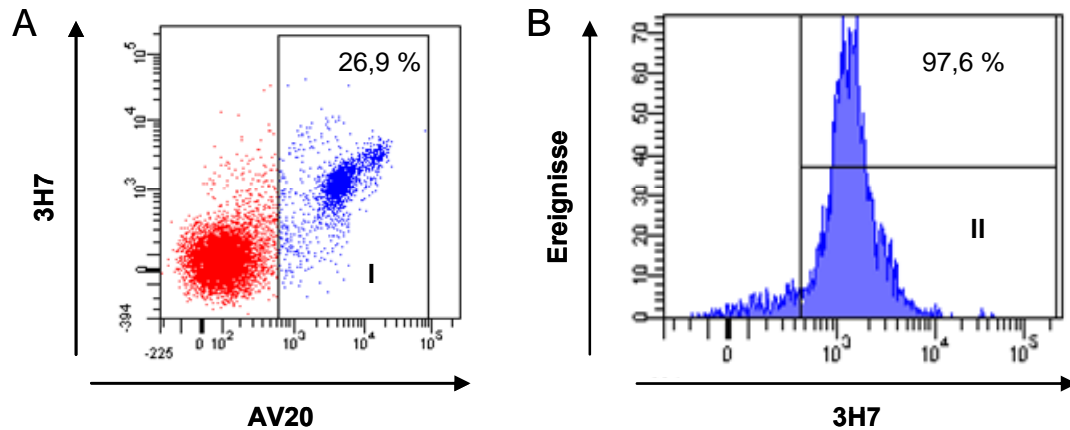
Von Herrn Prof. T. Göbel wurden freundlicherweise die Antikörper 3H7, 8D12, 28-4 und 4A5 für eine Untersuchung ihrer Bindung an B-Zellen zur Verfügung gestellt. Der Antikörper 3H7 erkennt das Antigen CHIR-B2 und der Antikörper 8D12 das Antigen CHIR-AB1. Von den beiden anderen Antikörpern ist nicht bekannt, welches Antigen sie erkennen. 4A5 ist aus einer Fusion gegen aufgereinigte CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> periphere Blutleukozyten entstanden, der Antikörper 28-4 wurde in einer Fusion gegen CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> intraepitheliale Leukozyten generiert.

AK	Isotyp	Antigen	Referenz
3H7	IgG2b	CHIR-B2	[218]
8D12	IgG2a	CHIR-AB1	[219]
28-4	IgG3	unbekannt	[220]
4A5	IgG1	unbekannt	

*Tabelle 7*

##### 5.1.1.1 Test auf Leukozyten aus verschiedenen Organen

Um zu untersuchen, inwieweit diese Antikörper B-Zellen aus verschiedenen Organen erkennen wurden mit Leukozyten aus verschiedenen Organen durchflusszytometrische Doppelfärbungen mit einem anti-chB6-Antikörper (AV20) durchgeführt (siehe 4.8). Im Falle von 4A5 wurde aufgrund des Isotyps ein anti-L-Ketten-Antikörper (11C6, IgG3) als B-Zellmarker eingesetzt. Um die Prozentzahl der B-Zellen, die für den jeweiligen Antikörper positiv waren darzustellen, wurden zunächst die AV20-positiven Zellen ausgewählt (A). Diese wurden dann in einem Histogramm dargestellt, in dem die Fluoreszenz der untersuchten Antikörper aufgetragen war (B). Die Zahl der Zellen in Gate II entspricht der Anzahl der positiven B-Zellen.



**Abbildung 7: Beispielfhafte Darstellung einer Doppelfärbung gegen AV20.**

Milzzellen wurden mit dem Antikörper 3H7 gegen AV20 doppelgefärbt. In Gate I sind die AV20 positiven Zellen zu sehen, diese entsprechen den B-Zellen. In Gate II sind die die B-Zellen dargestellt, die auch positiv für 3H7 sind. A: Darstellung der Leukozyten in einem Dot Plot B: Darstellung der AV20 positiven Zellen aus A(GateI) in einem Histogramm.

Wie Abbildung 8 zeigt, erkannte der Antikörper 3H7 in peripheren Blutleukozyten, Milz, Bursa, Caecaltonsillen und Knochenmark über 98% der B-Zellen, dabei waren in Milz und Caecaltonsillen jeweils eine  $3H7^+AV20^+$  und eine  $3H7^{++}AV20^{++}$  Zellpopulation erkennbar.

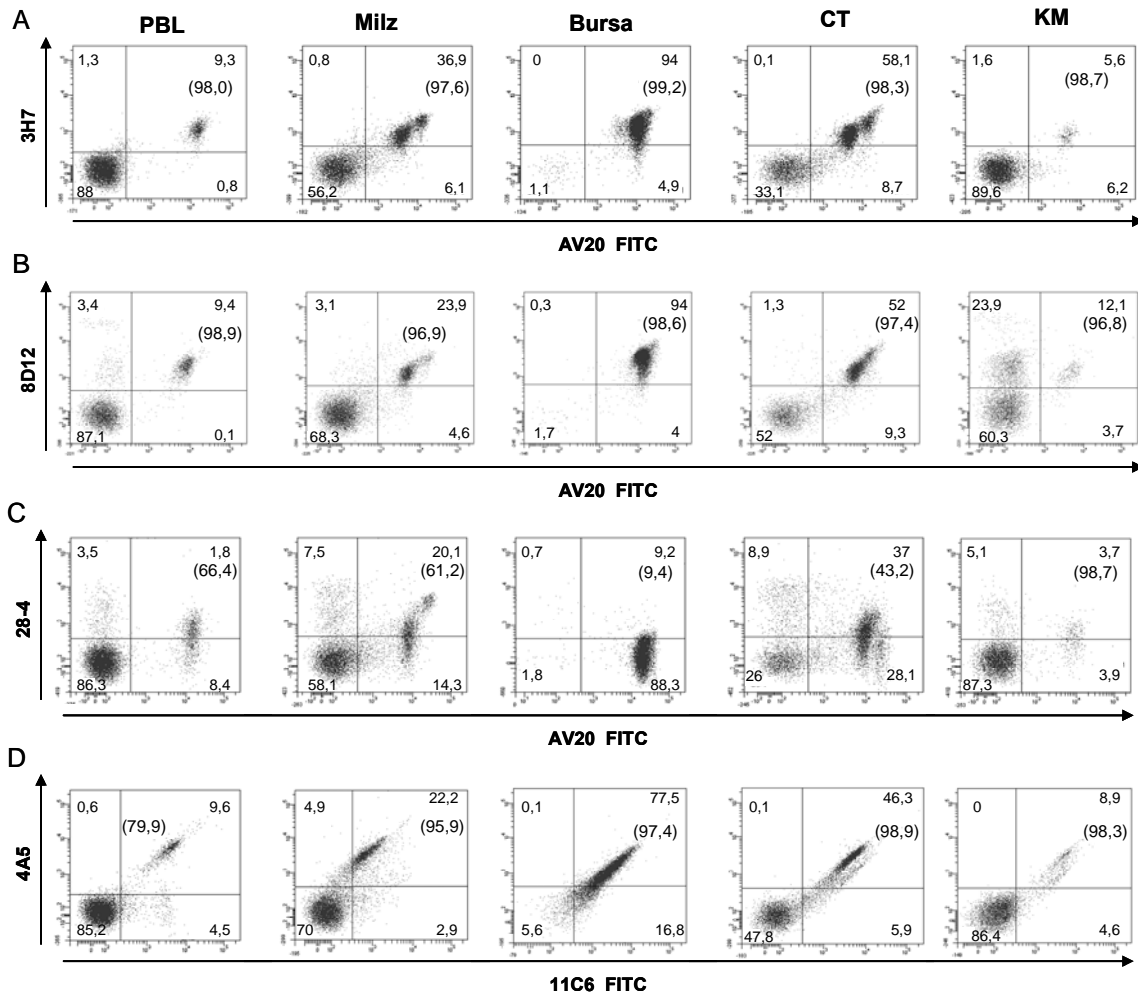
Der Antikörper 8D12 erkannte auf allen Organen über 97% der  $AV20^+$  Zellen (Abbildung 8B). Bursa-B-Zellen wurden von dem Antikörper stärker angefärbt, als die B-Zellen in Milz, PBL, Caecaltonsillen und Knochenmark. Daneben wurden auch andere Zellen von diesem Antikörper angefärbt. In PBL und Knochenmark gab es zwei Subpopulationen an  $8D12^+AV20^-$  Zellen, mit unterschiedlich starker Expression von CHIR-AB1.

Der Antikörper 28-4 zeigte auf den verschiedenen Organen ein unterschiedliches Färbeverhalten (Abbildung 8C). So erkannte er auf Bursazellen nur etwa 9% der B-Zellen. Auf peripheren Blutleukozyten, Milz, Caecaltonsille und Knochenmark war dagegen eine Verschiebung der gesamten B-Zellpopulation zu erkennen. Damit erkennt dieser Antikörper die unreifen B-Zellen nicht, die reifen B-Zellen dagegen schon. Zwischen Milz und Caecaltonsille war ein Unterschied im Hinblick auf die  $AV20^{++}$  Population zu erkennen. In der Milz waren die AV20 hoch positiven Zellen  $28-4^{++}$ , während sie in der Caecaltonsille  $28-4^+$  waren. Außerdem erkannte 28-4 jeweils zwischen 3 und 9% der  $AV20^-$  Zellen.

Der Antikörper 4A5 erkannte auf allen Organen über 95% der L-Ketten positiven Zellen (Abbildung 8D). Bei den  $L-Kette^+4A5^-$  Zellen die in peripheren Blutleukozyten zu finden waren, handelt es sich um Monozyten. Dies konnte durch eine Darstellung dieser Zellen im



FSC/SSC-Bild gezeigt werden. Das Bild von einer diagonal liegenden doppelt positiven Population, das sich in der Doppelfärbung von 4A5 gegen 11C6 zeigte, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem von 4A5 erkannten Antigen um eine Struktur handelt, die mit dem B-Zell-Rezeptor in der Expression assoziiert ist.

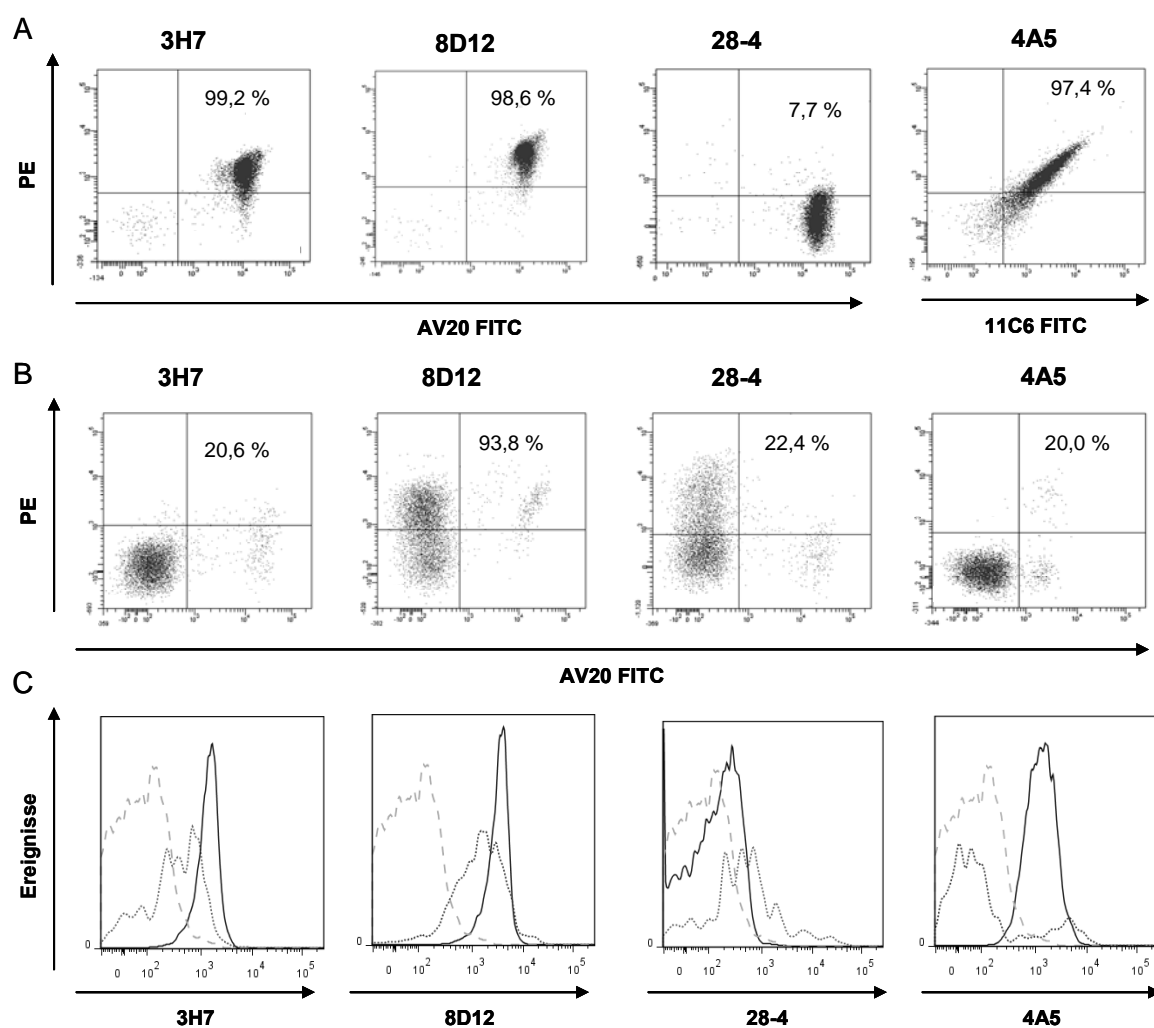


**Abbildung 8: Test der Antikörper auf verschiedenen Organen.**

Leukozyten aus den angegebenen Organen wurden mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Die Detektion der Antikörper erfolgte dabei mit einem entsprechenden PE-konjugierten Sekundärantikörper. Es wurde jeweils eine Doppelfärbung gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20) bzw. einen anti-L-Ketten-Antikörper (11C6) durchgeführt. Die Zahlen geben die Prozent der positiven Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die positiv für den getesteten Antikörper waren. PBL:periphere Blutleukozyten, CT:Caecaltonsille, KM:Knochenmark; A:3H7, B:8D12, C:28-4, D:4A5.

### 5.1.1.2 Test auf embryonalen Bursazellen

Im Weiteren wurden die Antikörper vergleichend auf Zellen aus einer Bursa eines 3 Monate alten Tieres sowie auf embryonaler Tag 14 Bursa getestet. Die Gewinnung der Leukozyten erfolgte dabei wie unter 4.2.4 beschrieben. Es wurde die gleiche Färbung durchgeführt, wie bei der Färbung auf Leukozyten aus den verschiedenen Organen (siehe 5.1.1.1). Der einzige Unterschied war, dass hier bei der Färbung mit 4A5 eine Blockierung mit normalem Maus-Serum (siehe 4.8.4) durchgeführt wurde, sodass eine Doppelfärbung gegen AV20 möglich war.



#### Abbildung 9: Test der Antikörper auf Bursazellen

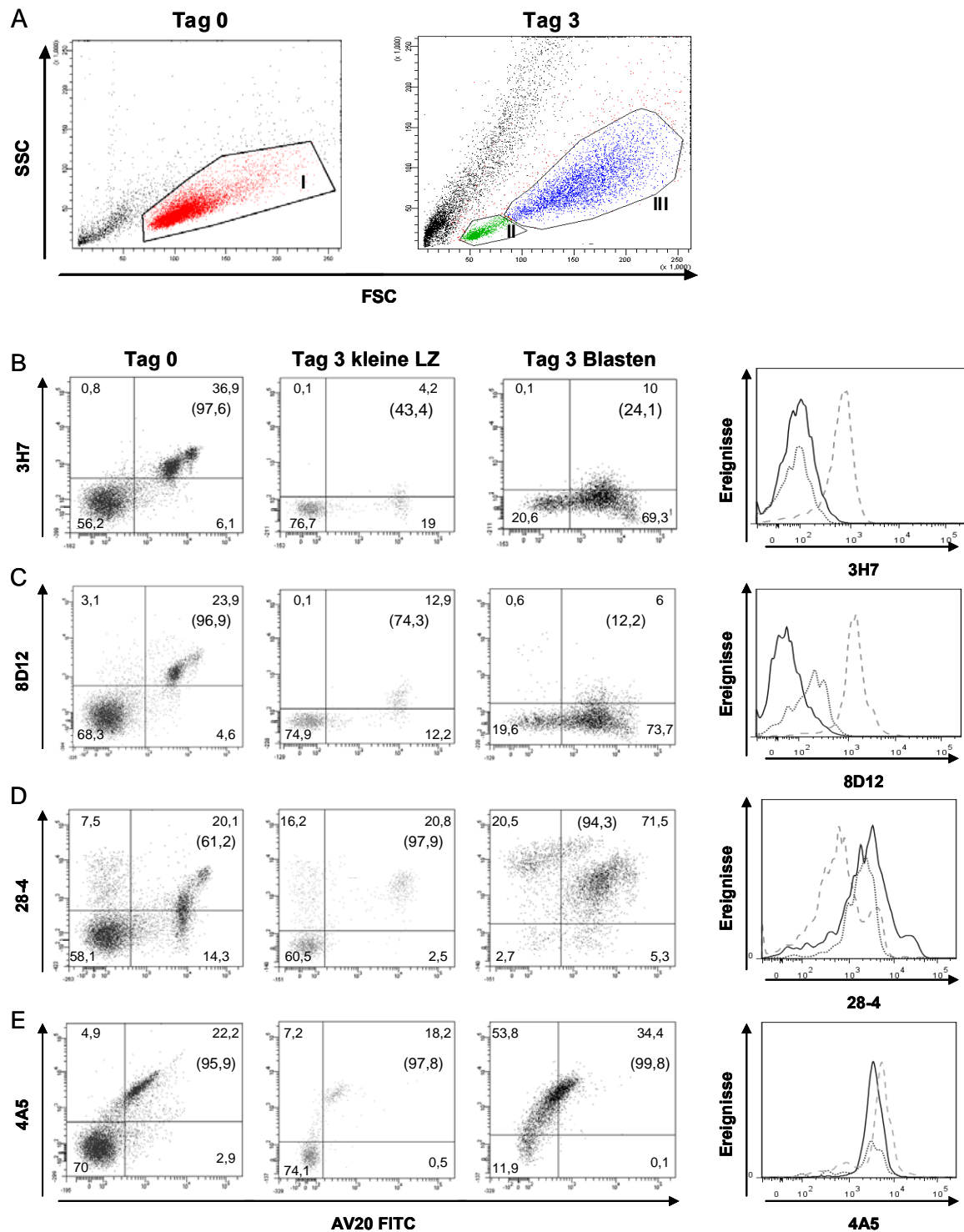
Die genannten Antikörper wurden auf Bursazellen getestet, dabei wurde eine Doppelfärbung gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20) bzw. einen anti-L-Ketten-Antikörper (11C6) durchgeführt, die Detektion der Antikörper erfolgte mit einem entsprechenden PE-konjugierten Sekundär-Antikörper. Die Zahlen geben den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die für den getesteten Antikörper positiv waren. A: zum Vergleich Bursazellen eines 3 Monate alten Tieres, B: embryonale Bursa von Tag 14, C: Overlay-Bilder von maturaer Bursa (durchgehende Linie), embryonaler Tag 14 Bursa (gestrichelte Linie) und einer Negativ-Kontrolle (gestrichelte Linie).

Wie in Abbildung 9C zu sehen ist, ist das von 3H7 gebundene Antigen CHIR-B2 in der embryonalen Bursa nur sehr schwach exprimiert. Im Gegensatz dazu waren auf den Bursazellen eines 3-4 Monate alten Tieres 99,2% positiv, d.h. die Expression von CHIR-B2 wird während der Entwicklung in der Bursa hochreguliert. Der Antikörper 8D12 erkannte zu beiden Zeitpunkten über 94% der B-Zellen. Der Antikörper 28-4 erkannte zu beiden Zeitpunkten jeweils nur einen Teil der AV20<sup>+</sup> Zellen. An ET14 waren ca. 22% der B-Zellen positiv für diesen Antikörper, auf adulter Bursa waren es knapp 8%. Das Overlay-Histogramm zeigt sowohl für Embryonaltag 14, als auch für die mature Bursa eine leichte Verschiebung der gesamten B-Zellpopulation nach rechts, d.h. dass das von 28-4 detektierte Antigen auf bursalen B-Zellen in geringer Menge exprimiert ist. Bei der Färbung mit dem Antikörper 4A5 war auf embryonaler Bursa deutlich eine positive B-Zell-Subpopulation (20% der AV20<sup>+</sup> Zellen) zu erkennen, während dieser Antikörper auf adulter Bursa über 97% der B-Zellen erkannte.

#### 5.1.1.3 Test auf CD40L-stimulierten Milzzellen

Im Weiteren wurden die Antikörper auch auf aktivierten Milzzellen getestet. Dazu wurden Milzzellen in Kultur genommen und mit CD40L stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die Färbung mit den Antikörpern wie unter 5.1.1.1 beschrieben. Zum Vergleich wurden auch Milzzellen unmittelbar nach der Entnahme der Milz gefärbt. In Abbildung 10A sind unstimulierte Milzzellen zu sehen (Gate I), daneben sind die stimulierten Milzzellen dargestellt. In Gate II liegen die kleinen Lymphozyten, die nach Stimulation mit CD40L nicht proliferiert haben, in Gate III liegen die großen Blasten, die nach Stimulation mit CD40L angefangen haben zu proliferieren.

Wie in Abbildung 10B zu sehen ist, waren an Tag 3 von den kleinen Lymphozyten 43,4% der AV20<sup>+</sup> Zellen positiv für 3H7. Von den Blasten waren 24,1 % der AV20 positiven Zellen positiv für 3H7. Im Overlay-Bild ist zu sehen, dass die Intensität der Färbung jedoch deutlich geringer war als an Tag 0. Das heißt, die Expression von CHIR-B2 wird durch die Aktivierung der B-Zellen herunter reguliert.



**Abbildung 10: Test der Antikörper auf stimulierten Milzzellen**

Milzzellen wurden in Kultur genommen und für drei Tage mit CD40L stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Die Detektion von 3H7, 8D12, 28-4 und 4A5 erfolgte mit einem entsprechenden PE-konjugierten Sekundärantikörper. Die Zahlen geben den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die für den getesteten Antikörper positiv waren. A: vergleichende Darstellung der Milzzellen an Tag 0 und Tag 3; Gate I: Milzzellen Tag 0, Gate II: kleine Lymphozyten Tag 3, Gate III: Blasten Tag 3, die im Gate markierten Zellen wurden dann jeweils in den weiteren Bildern für Tag 0 und Tag 3 dargestellt; Die Histogramme zeigen Zellen von Tag 0 (gestrichelte Linie), Tag 3 kleine Lymphozyten (gepunktete Linie) und Tag 3 Blasten (durchgezogene Linie).

Der Antikörper 8D12 erkannte an Tag 3 74,3% der kleinen AV20<sup>+</sup> Lymphozyten. Diese waren aber im Vergleich zu unstimulierten Milzzellen nur schwach positiv. Von den Blasten wurden an Tag 3 dagegen nur 12,2 % der AV20<sup>+</sup> Zellen von 8D12 angefärbt, auch diese waren nur schwach positiv für 8D12 (Abbildung 10C). Demnach wird durch die Aktivierung der B-Zellen auch CHIR-AB1 herunter reguliert.

Der Prozentsatz der B-Zellen, die für den Antikörper 28-4 positiv waren, war dagegen bei den stimulierten B-Zellen deutlich höher, als bei den unstimulierten. Von den kleinen Lymphozyten waren über 97% der AV20<sup>+</sup> Zellen auch deutlich 8D12<sup>+</sup>. Bei den Blasten waren 94% der AV20<sup>+</sup> Zellen positiv für 8D12. Sowohl bei den kleinen Lymphozyten, als auch bei den Blasten war auch ein Teil der AV20<sup>-</sup> Zellen 8D12 positiv (Abbildung 10D). Das von 28-4 erkannte Antigen wird folglich durch Stimulation der Zellen hochreguliert, dies gilt gleichermaßen für kleine Lymphozyten wie für proliferierende Lymphoblasten.

Der Antikörper 4A5 erkannte auf den stimulierten Milzzellen über 97% der AV20 positiven kleinen Lymphozyten, auf den Blasten färbte dieser Antikörper 99% der AV20<sup>+</sup> Zellen. Daher ist die Expression des von 4A5 erkannten Antigens konstant und erfährt durch Aktivierung bzw. Proliferation keine Veränderung.

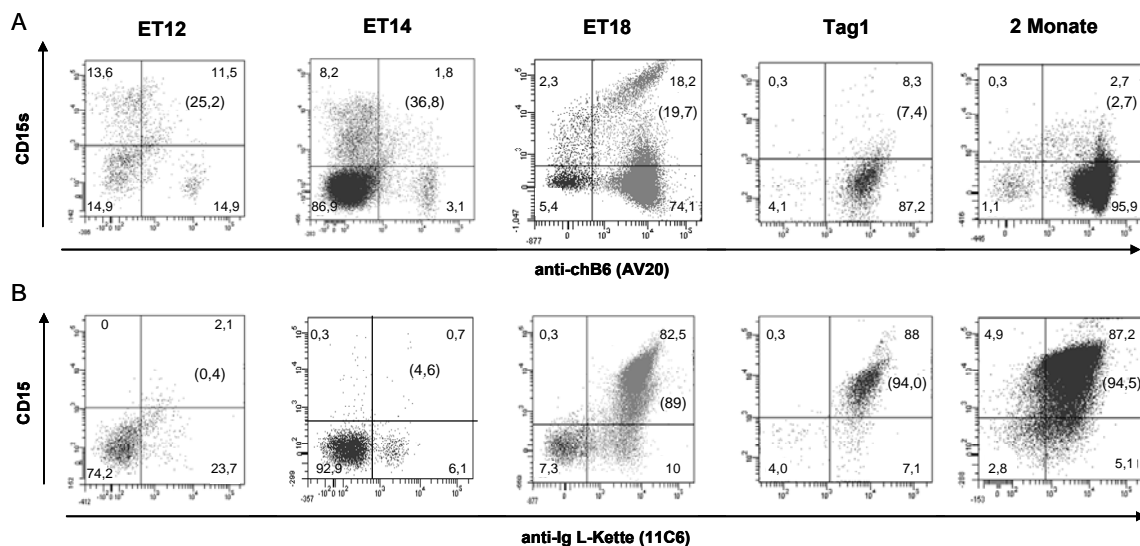
### **5.1.2 Antikörper gegen Sialyl-LewisX und LewisX**

Von Masteller et al. wurde beschrieben, dass Sialyl-LewisX und LewisX eine Rolle in der Migration der B-Zellen in die Bursa und aus der Bursa spielen (siehe 2.4.2) [198], daher sollte die Expression dieses Antigens auf verschiedenen B-Zellstadien näher untersucht werden. Dazu wurden Leukozyten aus verschiedenen Organen gewonnen und mit kreuzreagierenden Antikörpern gegen die humanen Moleküle gefärbt.

#### **5.1.2.1 Test der Antikörper auf Bursazellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten**

Zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten wurden aus der Bursa Fabricii Lymphozyten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert (siehe 4.2). Hierzu wurde der Antikörper gegen CD15s (Isotyp IgM) gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20, Isotyp IgG1) doppelgefärbt. Mit CD15 (Isotyp IgG1) wurde eine Doppelfärbung gegen einen anti-L-Ketten-Antikörper (11C6, IgG3) durchgeführt. Die Bestimmung des Anteils der B-

Zellen die positiv war für die getesteten Antikörper erfolgte wie unter 5.1.1.1 beschrieben. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, waren in der Bursa an ET12 etwa ein Viertel der B-Zellen CD15s positiv. Zu diesem Zeitpunkt gab es nur etwa 2% CD15 positive Zellen in der Bursa. An Embryonaltag 14 waren von den AV20 positiven Zellen etwa 35% positiv für CD15s. CD15 positive Zellen waren auch zu diesem Zeitpunkt nur zu etwa 1% in der Bursa zu finden. An Embryonaltag 18 waren nur ca. 20% der AV20 positiven Zellen positiv für CD15s. An Embryonaltag 18 waren ca 89% der 11C6 positiven Zellen positiv für CD15. An Tag 1 nach dem Schlupf waren von den AV20 positiven Zellen nur noch ca. 9% positiv für CD15s. Zu diesem Zeitpunkt waren 95% der 11C6 positiven Zellen auch positiv für CD15. Auf den Bursazellen eines Tieres mit voll ausgereifter Bursa zeigten die Antikörper gegen CD15 und CD15s jeweils ein ähnliches Färbemuster, wie auf der Bursa von Tag 1. Demnach wird CD15s transient in der embryonalen Bursa exprimiert, während CD15 erst zum Schlupf hin hochreguliert wird.



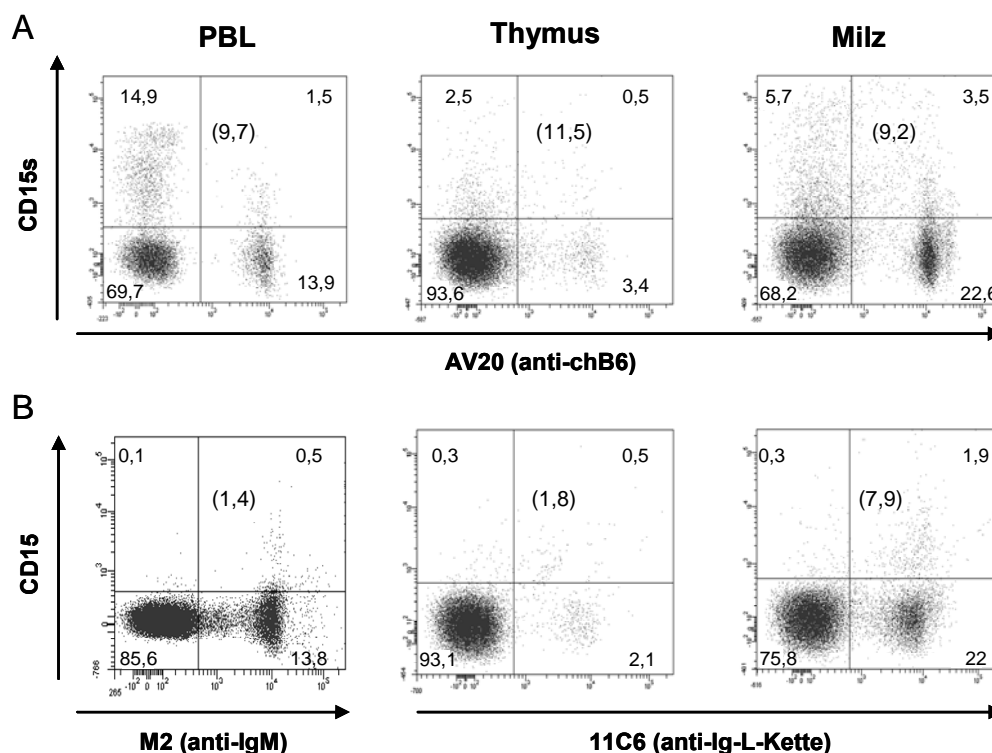
**Abbildung 11: Test der Antikörper CD15 und CD15s auf Bursazellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten.**

Zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten wurden Bursazellen gewonnen und mit den Antikörpern gefärbt. Dabei wurde jeweils eine Doppelfärbung entweder gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20) oder einen anti-L-Ketten-Antikörper (11C6) durchgeführt. Die Zahlen geben die Prozent der Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die auch für den getesteten Antikörper positiv waren. A:CD15s, B:CD15.

### 5.1.2.2 Test der Antikörper auf Thymus, Milz und peripheren Blutleukozyten

Im Weiteren wurden die Antikörper auch auf Leukozyten aus Thymus, Milz und peripherem Blut getestet. Auch hier wurde jeweils eine Doppelfärbung entweder gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20) oder einen anti-L-Ketten-Antikörper (2G1) bzw. einen Antikörper gegen chIgM (M2) durchgeführt.

Wie in Abbildung 12A zu sehen ist, waren im peripheren Blut etwa 10% der AV20 positiven Zellen positiv für CD15s. Auch in der Milz war unter den AV20<sup>+</sup> Zellen eine kleine, aber deutlich CD15s positive Subpopulation zu finden. Im Thymus waren dagegen kaum CD15s<sup>+</sup> AV20<sup>+</sup> Zellen zu finden. Ein ähnliches Bild zeigte sich für CD15. Auch hier war mit 3,4% in der Milz und 7,9% in den PBL jeweils ein kleiner Teil der B-Zellen CD15<sup>+</sup>. Im Thymus konnten auch hier kaum AV20<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> Zellen gefunden werden.



**Abbildung 12: Färbung verschiedener Organe mit den Antikörpern CD15 und CD15s.**

Aus Blut, Thymus und Milz wurden Leukozyten isoliert und mit den angegebenen Antikörpern in einer Doppelfärbung gegen AV20 (anti-chB6), M2 (anti-IgM) oder einen anti-Ig-L-Ketten Antikörper (11C6) gefärbt. Es wurden zunächst mittels einer lebend-tot-Färbung die lebenden Zellen ausgewählt, von diesen wurden dann im FSC/SSC Dot Plot die Leukozyten ausgewählt. Diese wurden dann in den gezeigten Bildern dargestellt. Die Zahlen geben die Prozent der Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die auch für CD15 bzw. CD15s positiv waren. PBL:periphere Blutleukozyten; A:CD15s, B:CD15.

## 5.2 Monoklonale Antikörper gegen Hühner-Bursazellen

Um neue Antikörper gegen Hühner-B-Zellen zu generieren wurden Balb/c Mäuse wie unter 4.4.1 beschrieben wiederholt mit Bursazellen immunisiert und anschließend wurden die Milzzellen der Maus mit Sp2/0-Zellen fusioniert (siehe 4.4.2). Die von den aus der Fusion entstandenen Hybridomen produzierten Zellkulturüberstände wurden zunächst mittels FACS-Analyse auf Bursazellen getestet um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß die gebildeten Antikörper diese erkennen (siehe 4.4.3).

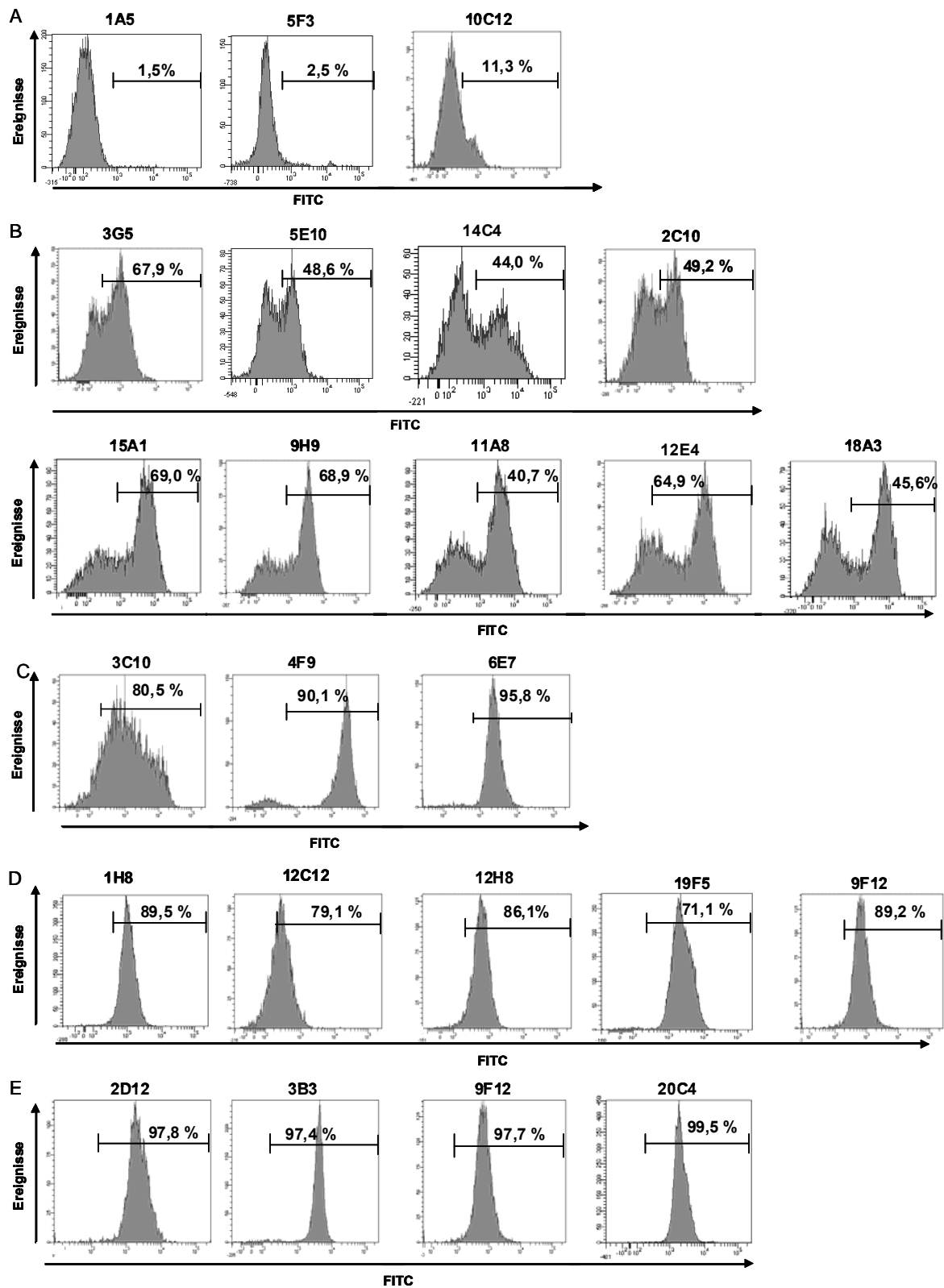
### 5.2.1 Screening auf Bursazellen

Die aus der Fusion stammenden Klone wurden mehrmals auf Bursazellen getestet. Anhand ihres Färbeverhaltens wurden aus den ursprünglich 1000 Klonen letztendlich 23 Klone ausgewählt, die dann weiter kultiviert wurden.

Diese Klone konnten anhand ihres Färbemusters folgenden Gruppen zugeordnet werden.

1) Antikörper, die nur einen geringen Prozentsatz (2-10%) der Bursazellen erkannten (Abbildung 13A). 2) Antikörper die mit einer größeren Zahl (30-70%) der Bursazellen reagierten (Abbildung 13B). 3) Antikörper, die alle B-Zellen bis auf eine kleine Subpopulation erkannten (Abbildung 13C). 4) Antikörper, die alle B-Zellen erkannten. In dieser Gruppe konnte weiter unterschieden werden, ob diese ein schwach exprimiertes Antigen erkennen, d.h. die B-Zellen nur schwach anfärben (Abbildung 13D), oder ob sie die B-Zellen stark anfärben (Abbildung 13E).

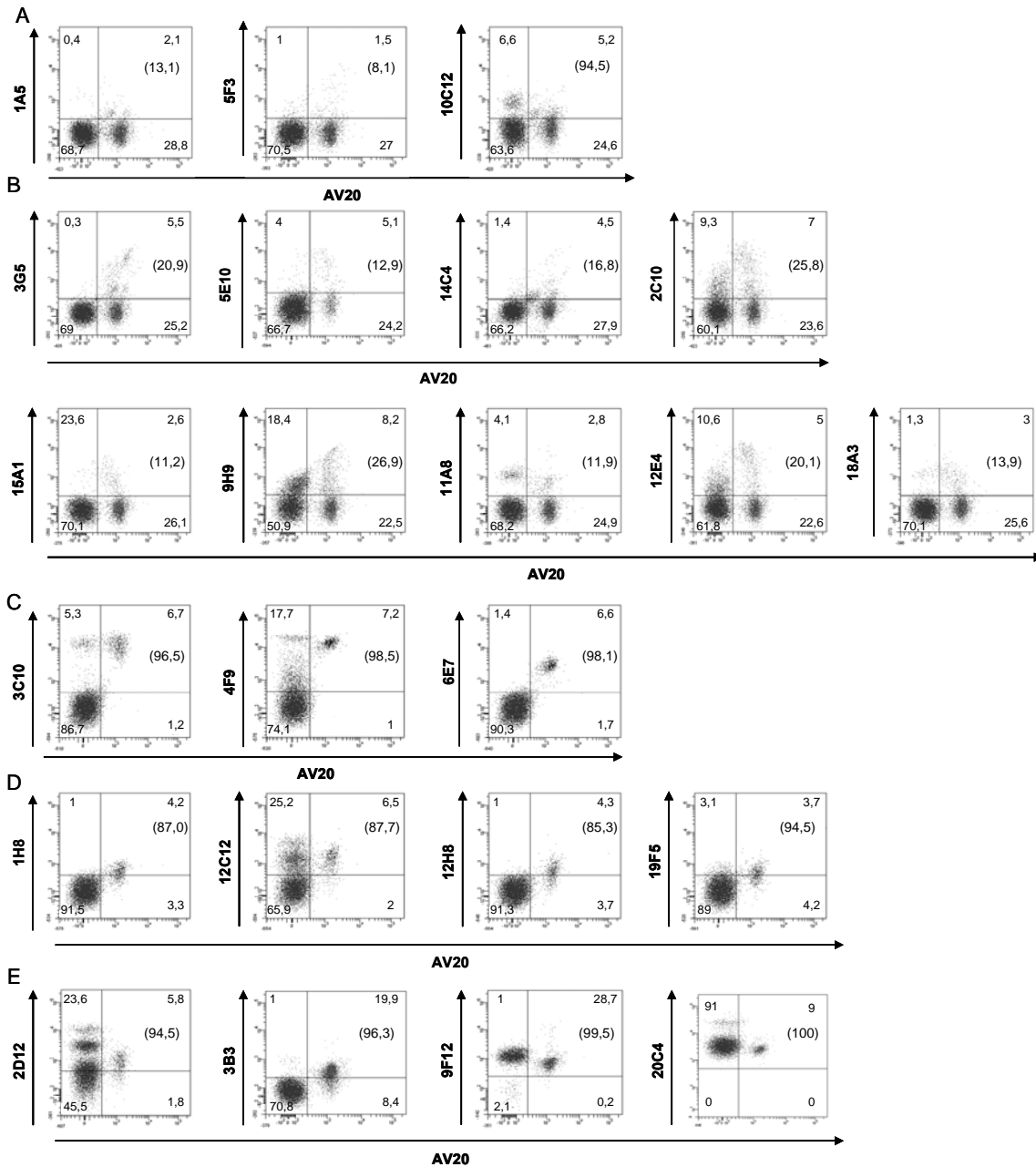




**Abbildung 13: Frequenz der B-Zellen die von den 23 ausgewählten Klonen erkannt wurden.** Die Hybridomüberstände der Fusion wurden auf Bursazellen getestet. Die Detektion der Antikörper erfolgte dabei durch einen FITC-markierten Ziege-anti-Maus Ig Sekundärantikörper. Angegeben sind die Prozentzahlen der positiven Zellen, das Gate wurde anhand der Negativkontrolle gesetzt. A: Antikörper, die nur wenige Bursazellen erkennen, B: Antikörper gegen eine größere Zahl von Bursazellen, C: Antikörper, die alle B-Zellen bis auf eine Subpopulation erkennen, D: Antikörper für die alle Bursazellen eine niedrige Antigenexpression aufweisen, E: Antikörper für die alle Bursazellen eine hohe Antigenexpression aufweisen.

## 5.2.2 Färbung auf Milzzellen und PBL

Um die ausgewählten Antikörper weiter zu charakterisieren, wurden auf Milzzellen und peripheren Blutleukozyten (PBL) durchflusszytometrische Doppelfärbungen gegen AV20 (anti-chB6) durchgeführt. So konnte dargestellt werden, welcher Anteil der B-Zellen von den generierten Antikörpern erkannt wird (siehe 5.1.1.1).

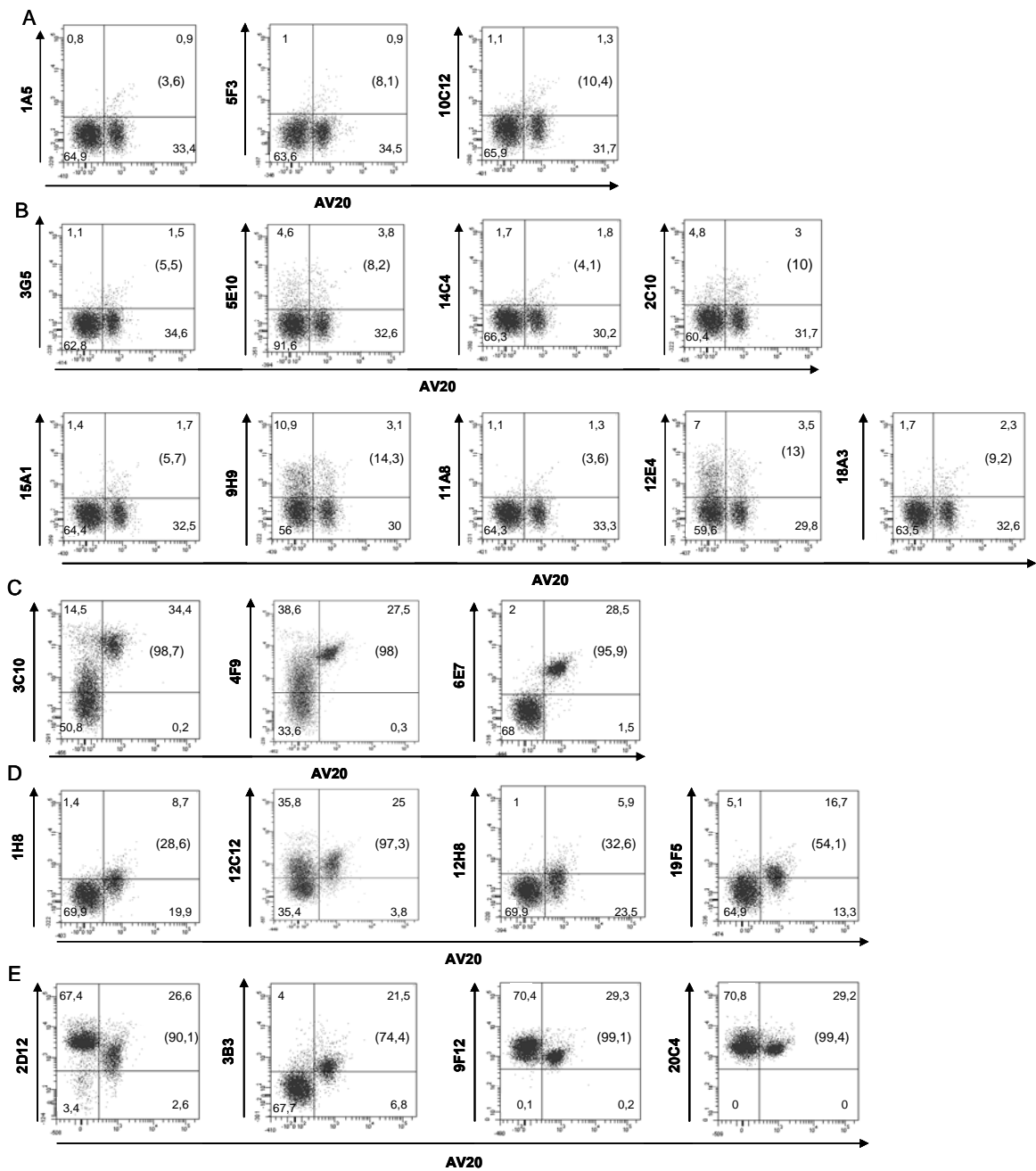


**Abbildung 14: Test der generierten Antikörper auf peripheren Blutleukozyten (PBL)**

Periphere Blutleukozyten wurden mit den generierten Antikörpern in einer Doppelfärbung mit anti-chB6 (AV20) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Reihenfolge der Darstellung entspricht der Einteilung der Klone anhand ihres Färbemusters auf Bursazellen. A: Antikörper, die nur wenige Bursazellen erkennen, B: Antikörper gegen eine größere Zahl von Bursazellen, C: Antikörper, die alle Bursa-Zellen bis auf eine Subpopulation erkennen, D: Antikörper für die alle Bursazellen eine niedrige Antigenexpression aufweisen, E: Antikörper für die alle Bursazellen eine hohe Antigenexpression aufweisen. Die Zahlen geben die Prozent der positiven Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die positiv für den getesteten Antikörper waren.

Auch auf peripheren Blutleukozyten zeigten die Antikörper ein sehr unterschiedliches Färbemuster (siehe Abbildung 14). So gab es Antikörper die auch hier nur einen Teil der B-Zellen erkannten (Klone 5F3, 1A5, 14C4, 3G5, 15A1, 5E10). Eine weitere Gruppe der Antikörper erkannte einen Teil der B-Zellen und auch einen Teil der anderen Zellen (Klone 2C10, 11A8, 18A3, 12E4 und 9H9). Andere Antikörper erkannten wie auch in der Bursa alle B-Zellen und keine anderen Zellen (Klone 10C12, 3B3, 1H8, 19F5 und 12H8). Dann gab es eine Gruppe von Antikörpern, die sowohl alle B-Zellen als auch einen Teil der anderen Zellen erkannte (Klone 4F9, 3C10, 9E11, und 12C12). Ein paar der generierten Antikörper erkannten alle B-Zellen und alle anderen Zellen (Klone 2D12, 20C4 und 9F12).

Auf den Milzzellen (siehe Abbildung 15) ergab sich für die Antikörper ein ähnliches Muster wie bei der Färbung auf peripheren Blutleukozyten. Auch hier gab es Antikörper, die nur einen Teil der B-Zellen erkannten (Klone 5F3, 1A5, 10C12, 14C4, 3G5, und 15A1). Eine weitere Gruppe der Antikörper erkannte einen Teil der B-Zellen und auch einen Teil der anderen Zellen (Klone 5E10, 2C10, 11A8, 18A3, 12E4 und 9H9). Andere Antikörper erkannten wie auch in der Bursa alle B-Zellen und keine anderen Zellen (Klone 3B3, 1H8, 19F5, 12H8 und 6E7). Dann gab es eine Gruppe von Zellen, die alle B-Zellen erkannte und einen Teil der anderen Zellen (Klone 4F9, 3C10, 9E11, und 12C12). Ein paar der generierten Antikörper erkannten alle B-Zellen und alle anderen Zellen (2D12, 20C4 und 9F12).

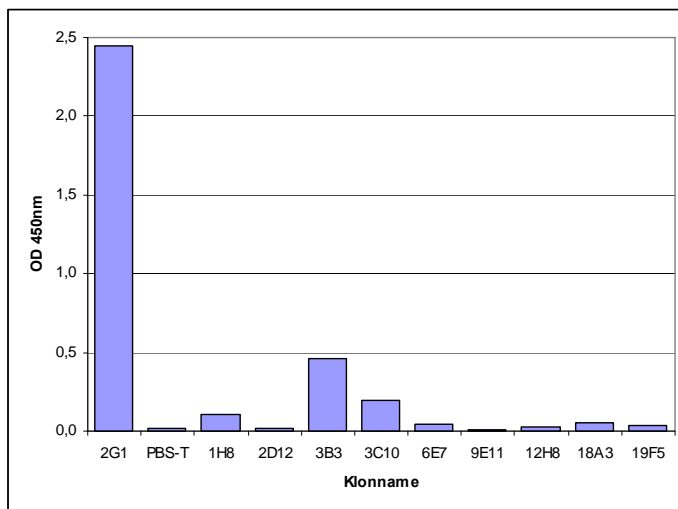


### Abbildung 15: Test der generierten Antikörper auf Milzzellen

Milzzellen wurden mit den generierten Antikörpern in einer Doppelfärbung mit anti-chB6 (AV20) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Reihenfolge der Darstellung entspricht der Einteilung der Klone anhand ihres Färbemusters auf Bursazellen. A: Antikörper, die nur wenige Bursazellen erkennen, B: Antikörper gegen eine größere Zahl von Bursazellen, C: Antikörper, die alle B-Zellen bis auf eine Subpopulation erkennen, D: Antikörper für die alle Bursazellen eine niedrige Antigenexpression aufweisen, E: Antikörper für die alle Bursazellen eine hohe Antigenexpression aufweisen. Die Zahlen geben die Prozent der positiven Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern sind die Prozent der B-Zellen angegeben, die positiv für den getesteten Antikörper waren.

### 5.2.3 Test auf Immunglobulin-Reaktivität

Einige der Antikörper erkannten sowohl bei Färbungen auf Bursazellen, als auch auf Milzzellen und peripheren Blutleukozyten alle B-Zellen. Um zu untersuchen, ob diese Antikörper Hühner-Immunglobuline erkennen, wurde ein ELISA gegen Hühner-Serum durchgeführt (siehe 4.7). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, lag der Wert für die optische Dichte der Positivkontrolle bei einer Verdünnung von 1:8 bei 2,4. Die Werte für die getesteten Antikörper lagen für keinen Klon über 0,5. Damit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass einer der Klone ein Epitop des B-Zellrezeptors erkennt.

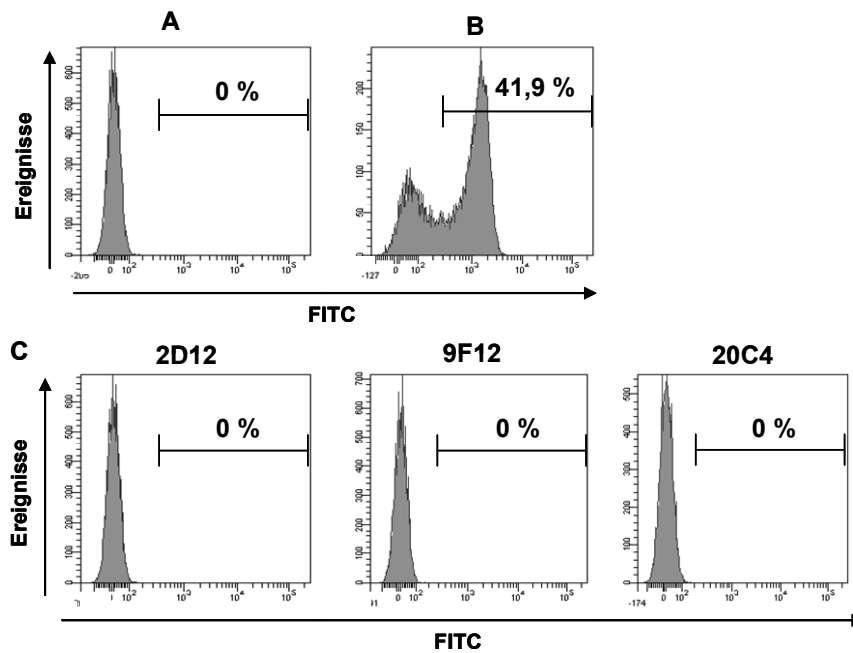


**Abbildung 16: Test der Antikörper im ELISA**

Mit den generierten Antikörpern wurde ein ELISA gegen Hühner-Serum durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Antikörper gegen die leichte Kette des Immunglobulinmoleküls (2G1). Als Negativkontrolle wurde PBS-T verwendet. OD: optische Dichte

### 5.2.4 Test auf CD45 transfizierten Zellen

Da drei der Antikörper (2D12, 9F12 und 20C4) sowohl auf Bursa als auch auf Milz und PBL mit allen Leukozyten reagierten, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem erkannten Antigen um chCD45 handeln könnte. Um dem nachzugehen, wurden 293T-HEK-Zellen mit einem CD45-Konstrukt transient transfiziert (siehe 4.6.1) welches freundlicherweise von Herrn Prof. T. Göbel zur Verfügung gestellt wurde. Anschließend wurden die Antikörper auf diesen transfizierten Zellen getestet (siehe Abbildung 17). Während ca. 42% der Zellen von 16-6, einem Antikörper gegen CD45 erkannt wurden, erkannte keiner der drei Antikörper die CD45-transfizierten Zellen.



#### Abbildung 17: Test auf chCD45-transfizierten 293T-Zellen

Die Antikörper, die alle Lymphozyten in der Bursa, Milz und PBL erkannten, wurden auf CD45-transfizierten Zellen getestet. A: Negativkontrolle B: Positivkontrolle mit anti-chCD45-Antikörper (16-6) C: Antikörper 2D12, 9F12 und 20C4

### 5.2.5 Gruppierung der Klone

Um einen Überblick über das Färbemuster der 23 Klone zu bekommen wurden die Klone anhand ihrer Reaktion auf den verschiedenen Organen in sechs Gruppen eingeteilt. Dazu wurde die Anzahl der erkannten Zellen mit einer Ziffer von 0 bis 6 gekennzeichnet. Klone in Gruppe I erkannten auf Bursa, Milz und PBL jeweils eine kleine Anzahl der B-Zellen (3-10%). Eine Ausnahme war der Antikörper 10C12, dieser erkannte zwar auf Bursa und Milz eine kleine Population der B-Zellen, die peripheren Blutleukozyten färbte dieser Antikörper jedoch alle schwach an. In Gruppe II wurden die Klone zusammen gefasst, die auf Bursazellen einen größeren Teil der B-Zellen erkannten (30-70%) und auch in Milz und auf PBLs nur einen Teil der B-Zellen (3-20%) erkannten. Gruppe III umfasste die Klone, die in der Bursa einen größeren Teil der B-Zellen erkannten (30-70%) und auf Milzzellen und peripheren Blutleukozyten einen Teil der B-Zellen (3-20%) und einen Teil der anderen Zellen erkannten. Gruppe IV enthielt die Klone, die auf allen drei Organen jeweils alle B-Zellen und keine anderen Zellen erkannten. In Gruppe V wurden die Klone eingeteilt, die über 90% der Bursazellen erkannten und in Milz und PBLs auch alle B-Zellen und einen Teil der anderen Zellen erkannten. In Gruppe VI wurden die Klone zusammen gefasst, die in allen drei Organen jeweils über 90% der Zellen erkannten.

Aufgrund ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens wurden dann aus den verschiedenen Gruppen sechs Klone ausgewählt (farbig markiert), welche im Folgenden weiter charakterisiert wurden. In Gruppe V wurden die Klone zusammen gefasst, die in allen untersuchten Organen alle B-Zellen schwach anfärbten, da diese für unsere Fragestellung nicht von Interesse waren, wude aus dieser Gruppe kein Klon ausgewählt.

Gruppe	Klonname	Bursa	PBL	Milz
I	5F3	1	1	1
	1A5	1	1	1
	10C12	1	3b	1
II	14C4	2	1	1
	3G5	2	1	1
	15A1	2	1	1
	5E10	2	1	6
III	2C10	2	6	6
	11A8	2	6	6
	18A3	2	6	6
	12E4	2	6	6
	9H9	2	6	6
IV	6E7	3a	3a	3a
	3B3	3a	3b	3b
	1H8	3b	3b	3b
	19F5	3b	3b	3b
	12H8	3b	3b	3b
V	4F9	3a	4	4
	3C10	3a	4	4
	12C12	3b	4	4
VI	2D12	3a	5	5
	20C4	3a	5	5
	9F12	3b	5	5

**Tabelle 8: Übersicht über die Färbemuster der Klone auf den verschiedenen Organen**

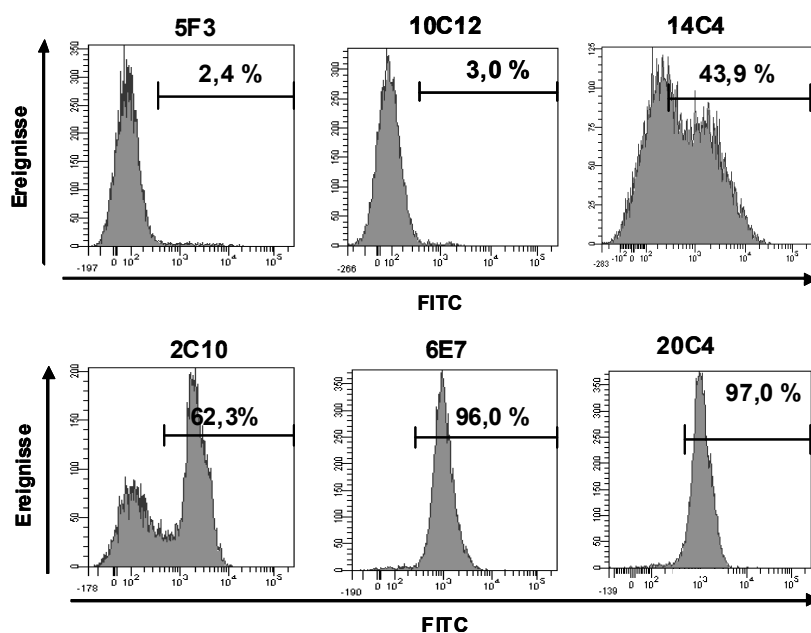
Dem Färbemuster der Klone auf den verschiedenen Organen wurde jeweils eine Zahl zugewiesen. Anhand der Summe der Färbungen wurden die Klone dann in unterschiedliche Gruppen eingeteilt.

1: Der Antikörper erkannte eine kleine Zahl der B-Zellen. 2: Der Antikörper reagierte mit einer größeren Population der B-Zellen. 3a: Alle B-Zellen waren deutlich positiv. 3b: Alle B-Zellen waren schwächer positiv. 4: Der Antikörper erkannte alle B-Zellen und zusätzlich einen Teil der anderen Zellen 5: Der Antikörper erkannte alle B-Zellen und alle anderen Zellen. 6: Der Antikörper reagierte mit einem Teil der B-Zellen und mit einem Teil der anderen Zellen.

Die farbig markierten Klone wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

## 5.2.6 Reklonierung und Isotypbestimmung

Da nach einer Fusion in den Kavitäten der 96-Lochplatten oftmals mehr als ein Klon wächst, war es nötig eine Reklonierung durchzuführen, um sicher zu stellen, dass die gewonnenen Antikörper monoklonal sind. Daher wurden die anhand der Gruppierung (siehe Tabelle 8) ausgewählten Klone 2C10, 5F3, 6E7, 10C12, 12E4, 14C4 und 20C4 wie unter 4.4.4 beschrieben rekloniert. Nach dem Hochwachsen der Klone wurden sie mehrfach auf Bursazellen getestet und von jedem Klon wurde ein nun monoklonaler Subklon selektiert.



**Abbildung 18: Test der Antikörper auf Bursazellen nach Reklonierung.**

Die ausgewählten Antikörper wurden rekloniert und nach 10 Tagen erneut auf Bursazellen getestet. Die Detektion der Antikörper erfolgte durch einen anti-Maus-Ig FITC Sekundärantikörper. Dargestellt sind die Antikörper nach erfolgreicher Reklonierung mit den Prozentzahlen der positiven Bursazellen. Der Marker wurde anhand der Negativkontrolle gesetzt.

Im Anschluss an die Reklonierung wurden die Isotypen der Antikörper auf Bursazellen bestimmt. Wie in Tabelle 9 dargestellt, hatten zwei der getesteten Klone den Isotyp IgG1 und drei der Klone den Isotyp IgM. Von 10C12 konnte auch in mehreren Ansätzen der Isotyp nicht bestimmt werden.

Klonname	Isotyp
5F3	IgM
10C12	unbekannt
14C4	IgM
2C10	IgM
6E7	IgG1
20C4	IgG1

**Tabelle 9: Isotyp der generierten Antikörper**



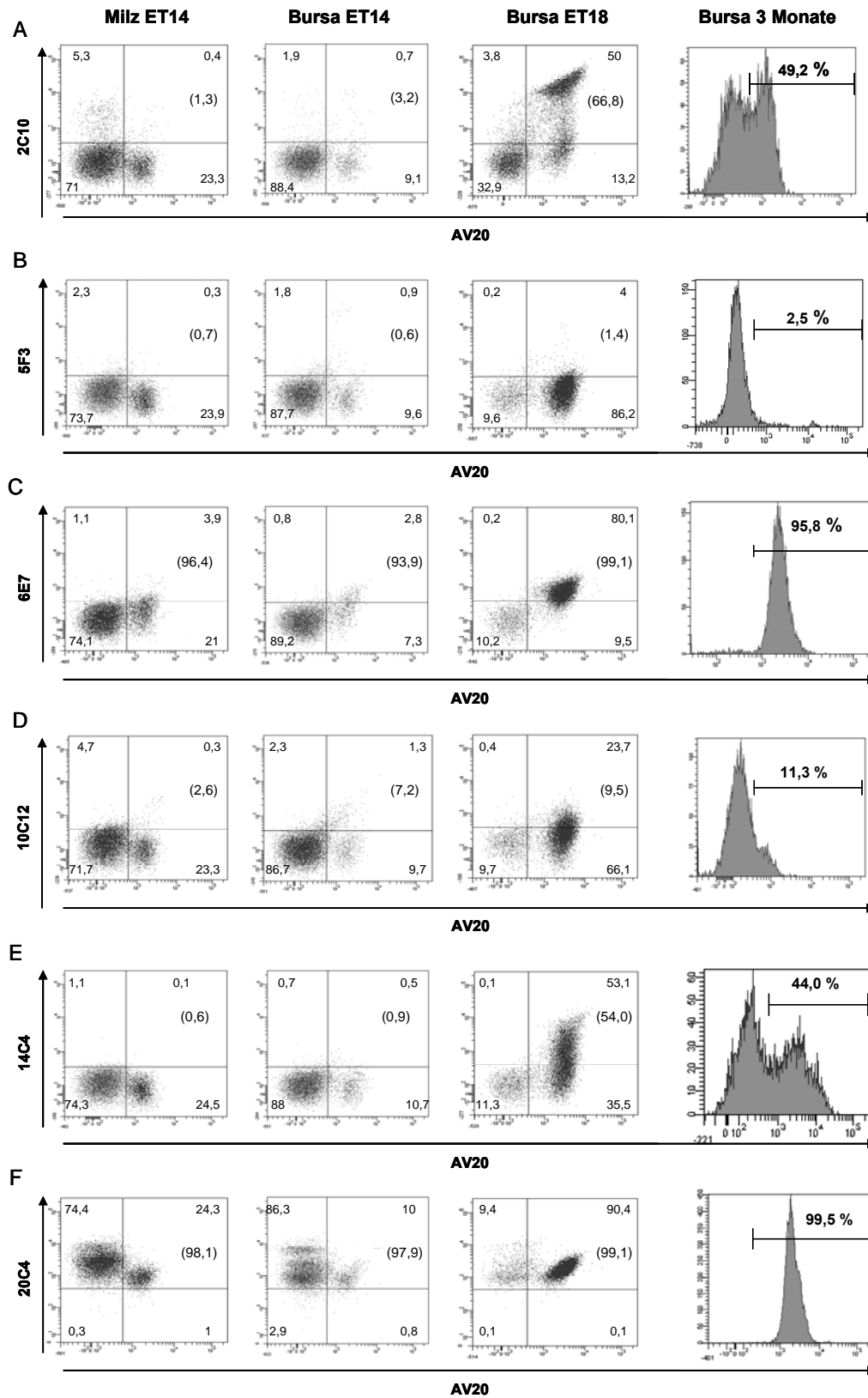
### 5.2.7 Charakterisierung auf embryonalen Organen

Im Weiteren sollte charakterisiert werden, ob die einzelnen Antikörper ein Antigen auf den B-Zellen erkennen, das bereits auf prä-bursalen bzw. frühen bursalen B-Zellen vorhanden ist. Dazu wurden durchflusszytometrische Färbungen auf embryonalen Bursazellen von ET14 und ET18 und auf embryonalen Milzzellen von ET14 durchgeführt. Da in den embryonalen Organen im Vergleich zu den adulten Tieren relativ wenige Zellen vorhanden sind, wurden die Organe von mehreren Embryonen zusammen in einem Ansatz präpariert wie unter 4.2.4 beschrieben. Bei diesen Färbungen wurde sowohl bei den Bursazellen, als auch bei den Milzzellen eine Doppelfärbung gegen chB6 (AV20) durchgeführt (siehe 4.8.4). Die Darstellung der Zellen erfolgte wie unter 5.2.2 beschrieben.

Der Antikörper 2C10 erkannte auf den Milzzellen von ET14 lediglich 1,3% der B-Zellen (Abbildung 19A). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Bursazellen von ET14. Auf der Bursa von ET18 erkannte der Antikörper wie in der ausgereiften Bursa über 50% der B-Zellen. Wie in Abbildung 19B zu sehen ist, erkannte der Antikörper 5F3 sowohl auf embryonaler Milz und Bursa zu allen Zeitpunkten weniger als 1% der B-Zellen. Der Antikörper 6E7 reagierte auf embryonaler Milz und Bursa von Tag 14 bereits mit über 95% der B-Zellen. Die B-Zellen in der Bursa von ET18 waren für diesen Antikörper jedoch stärker positiv als an ET 14 (Abbildung 19C). In Abbildung 19D ist zu sehen, dass sowohl auf embryonalen Milzzellen als auch auf Zellen aus der Bursa von Tag 14 und Tag 18 von dem Antikörper 10C12 jeweils weniger als 10% der B-Zellen erkannt wurden. Dies entspricht dem Färbeverhalten dieses Antikörpers auf Bursazellen eines 3 Monate alten Tieres.

Der Antikörper 14C4 erkannte auf ET14 Zellen aus Milz und Bursa weniger als 1% der B-Zellen. Auf der Bursa von ET18 waren dagegen mehr als 50% der B-Zellen positiv. Auf Bursazellen eines 3 Monate alten Tieres zeigte dieser Antikörper ein ähnliches Färbeverhalten.

Der Antikörper 20C4 erkannte auf Milz und Bursa zu beiden Zeitpunkten über 98% aller Zellen, und zeigte damit auf den embryonalen Organen das gleiche Färbemuster wie auf adulter Milz und Bursa (Abbildung 19F). Bei diesem Antikörper handelt es sich demnach um einen Pan-Leukozytenmarker, der schon sehr früh exprimiert wird.



**Abbildung 19: Test der generierten Antikörper auf embryonaler Bursa und Milz.**

Aus Milz von ET14 und Bursa von ET14 und ET18 wurden die Leukozyten isoliert und mit den generierten Antikörpern gefärbt. Um die Population der positiven B-Zellen darstellen zu können, wurde eine Doppelfärbung gegen einen anti-chB6-Antikörper (AV20) durchgeführt. Die Zahlen geben die Prozent der positiven Zellen in den jeweiligen Quadranten an. In Klammern ist der Anteil der B-Zellen angegeben, die positiv für den getesteten Antikörper waren.

### 5.2.8 Doppelfärbungen auf Bursa

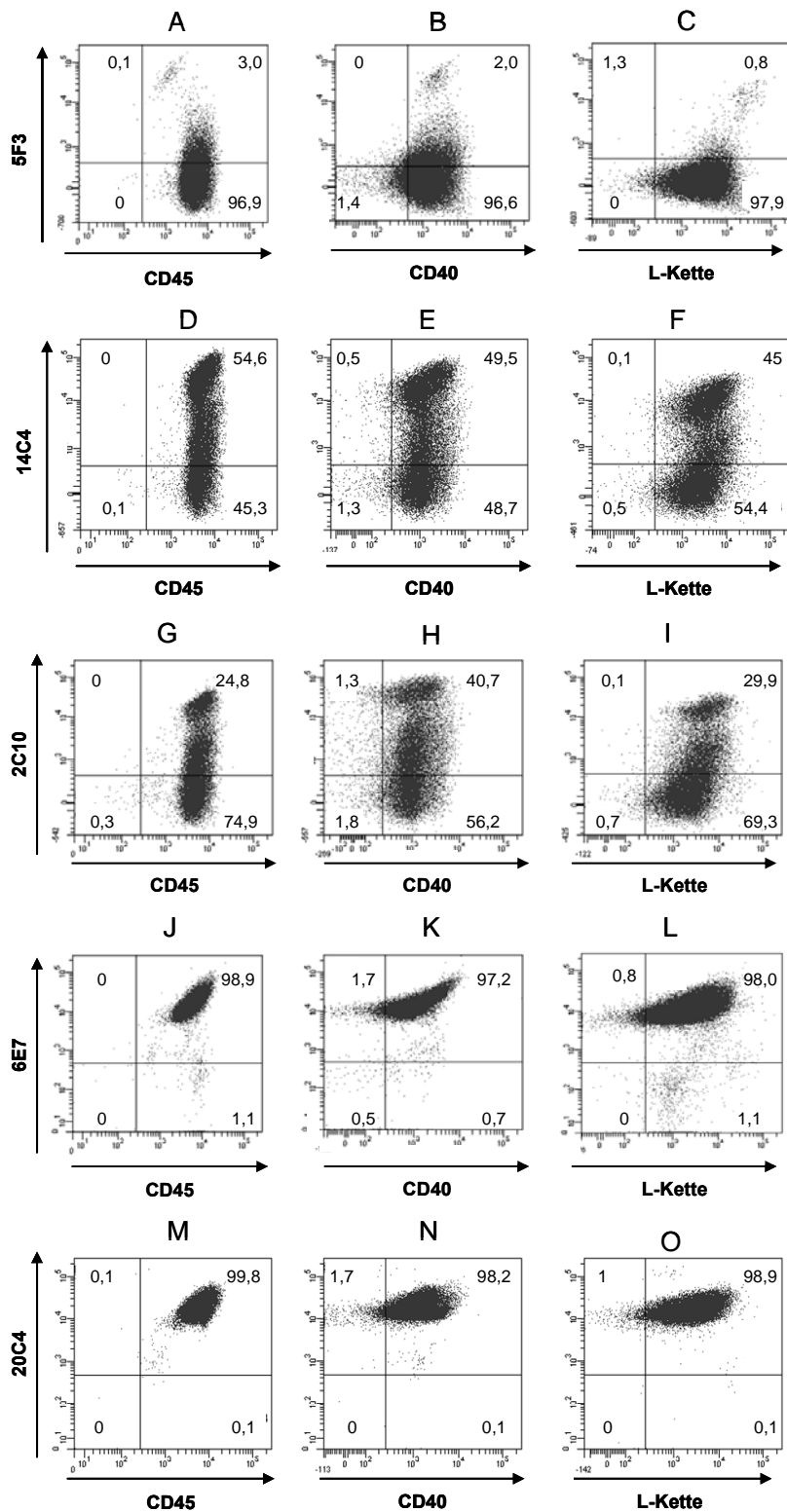
Im Weiteren wurden die reklonierten Antikörper deren Isotyp bekannt war in durchflusszyometrischen Doppelfärbungen auf Bursazellen gegen verschiedene andere B-Zellmarker getestet (siehe 4.8.5). Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, waren die 5F3 positiven Zellen zwar alle positiv für CD45, allerdings wurden sie von dem anti-CD45 Antikörper nur schwächer angefärbt als die übrigen Zellen (Abbildung 20A). In der Doppelfärbung gegen CD40 und gegen die leichte Kette, waren die 5F3 positiven Zellen hoch positiv für CD40 und wiesen von allen Zellen die stärkste Färbung für die leichte Kette auf (Abbildung 20B, C).

Die 14C4 positiven Zellen wiesen in ihrer Expression von CD45, CD40 und L-Kette keine Unterschiede zu allen anderen Zellen auf (Abbildung 20D-F).

Wie in Abbildung 20G und H zu sehen ist, zeigten die Zellen, die von 2C10 erkannt wurden, in ihrer Expression von CD40 und CD45 keine Unterschiede zu allen anderen Zellen. Im Gegensatz dazu waren die 2C10 positiven Zellen aber hoch positiv für den Antikörper gegen die leichte Kette (Abbildung 20I).

Die 6E7 positiven Zellen waren alle hoch positiv für CD45. Es gab neben der CD45<sup>++</sup>6E7<sup>++</sup> Population auch eine kleine CD45<sup>++</sup>6E7<sup>+-</sup> Population (Abbildung 21J). Auch in den Färbungen gegen CD40 und L-Kette gab es jeweils eine Subpopulation von Zellen die nur schwach 6E7 positiv waren. Diese waren schwach positiv für CD40 und hoch positiv für die L-Kette (Abbildung 20K, L).

Zellen die 20C4 positiv waren, wiesen eine hohe Expression von CD45 auf. Von den 20C4 positiven Zellen zeigte ein Teil eine hohe Expression von CD40 ein Teil der 20C4 positiven Zellen war weniger stark positiv für CD40. Das gleiche Bild zeigte sich auch in Doppelfärbungen gegen einen anti-L-Ketten-Antikörper (Abbildung 20M-O).



**Abbildung 20: Doppelfärbungen der Antikörper gegen CD45, CD40 und L-Kette.**

Die generierten monoklonalen Antikörper wurden auf Bursazellen gegen verschiedene andere Antikörper getestet. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Isotyp-spezifischen sekundären Antikörpern, die entweder mit FITC oder PE konjugiert waren. Wenn die verwendeten Antikörper den gleichen Isotyp hatten, wurde als Zwischenschritt eine Blockierung mit normal-Maus Serum durchgeführt. Die Zahlen geben die Prozent der Zellen in den jeweiligen Quadranten an.

## 5.2.9 Immunhistologie

Im Weiteren wurden die generierten monoklonalen Antikörper in immunhistologischen Färbungen auf Bursa- und Milzschnitten getestet (siehe 4.9.5).

### 5.2.9.1 Immunhistologie auf Bursaschnitten

Wie in Abbildung 21A zu erkennen ist färbte der Antikörper 5F3 vereinzelt Zellen im Mark der Bursafollikel und auch sehr wenige Zellen in der Follikelrinde. Damit reagierte der Antikörper 5F3 in der Histologie ähnlich wie bei den durchflusszytometrischen Messungen, wo auch nur ein sehr kleiner Teil der Bursazellen erkannt wurde (Abbildung 13).

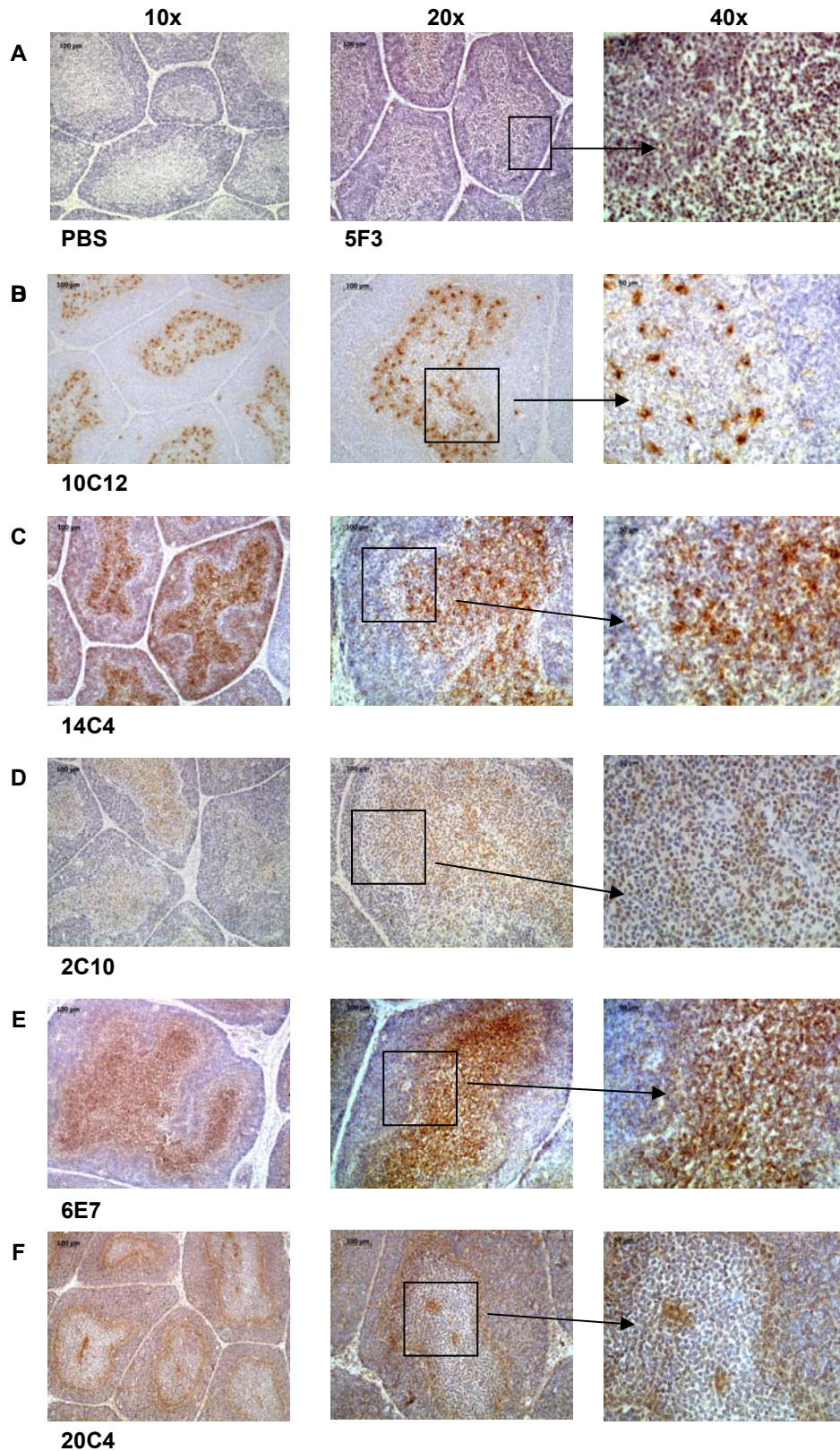
Der Antikörper 10C12 färbte ausschließlich eine kleine Subpopulation von Zellen im Mark der Follikel (Abbildung 21B). Die angefärbten Zellen zeigten eine starke zentrale Färbung mit einem weniger stark angefärbten Bereich außen herum. Vom Phänotyp zeigten diese Zellen keine starke Ähnlichkeit mit Lymphozyten. Auch in den durchflusszytometrischen Messungen erkannte dieser Antikörper lediglich 10 % der Bursazellen (Abbildung 13).

Der Antikörper 14C4 zeigte eine starke Färbung auf den Bursaschnitten (siehe Abbildung 21C). Er erkannte sowohl Zellen im Mark, als auch in der Rinde, wobei die Färbung im Mark stärker war. In den durchflusszytometrischen Messungen erkannte dieser Antikörper etwa 45% der Bursazellen (Abbildung 13).

Der Antikörper 2C10, der in den durchflusszytometrischen Messungen knapp 50% der Bursazellen erkannte (Abbildung 13), färbte in der Histologie viele Zellen im Mark und nur vereinzelt Zellen in der Rinde der Bursafollikel (Abbildung 21D).

Wie in Abbildung 21E sehen ist, färbte der Antikörper 6E7 alle Zellen im Mark, aber kaum Zellen in der Rinde der Bursafollikel, obwohl er in den durchflusszytometrischen Messungen nahezu alle Bursazellen erkannte (Abbildung 13).

Der Antikörper 20C4 der in den durchflusszytometrischen Messungen alle Bursazellen erkannte (Abbildung 13), erkannte auch in der Histologie Zellen im Mark und in der Rinde der Follikel. Zusätzlich färbte er deutlich die Mark-Rinden-Grenze und interessanterweise markierte er eine Struktur, die zentral im Mark der Follikel gelegen ist (Abbildung 21F).



**Abbildung 21: Test der generierten Antikörper in immunhistologischen Färbungen auf Bursaschnitten**

Gefrierschnitte einer maturen Bursa wurden mit den angegebenen Antikörpern immunhistologisch gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit PBS. Die Bereiche die im nächsten Bild im Detail dargestellt sind, sind umrandet.

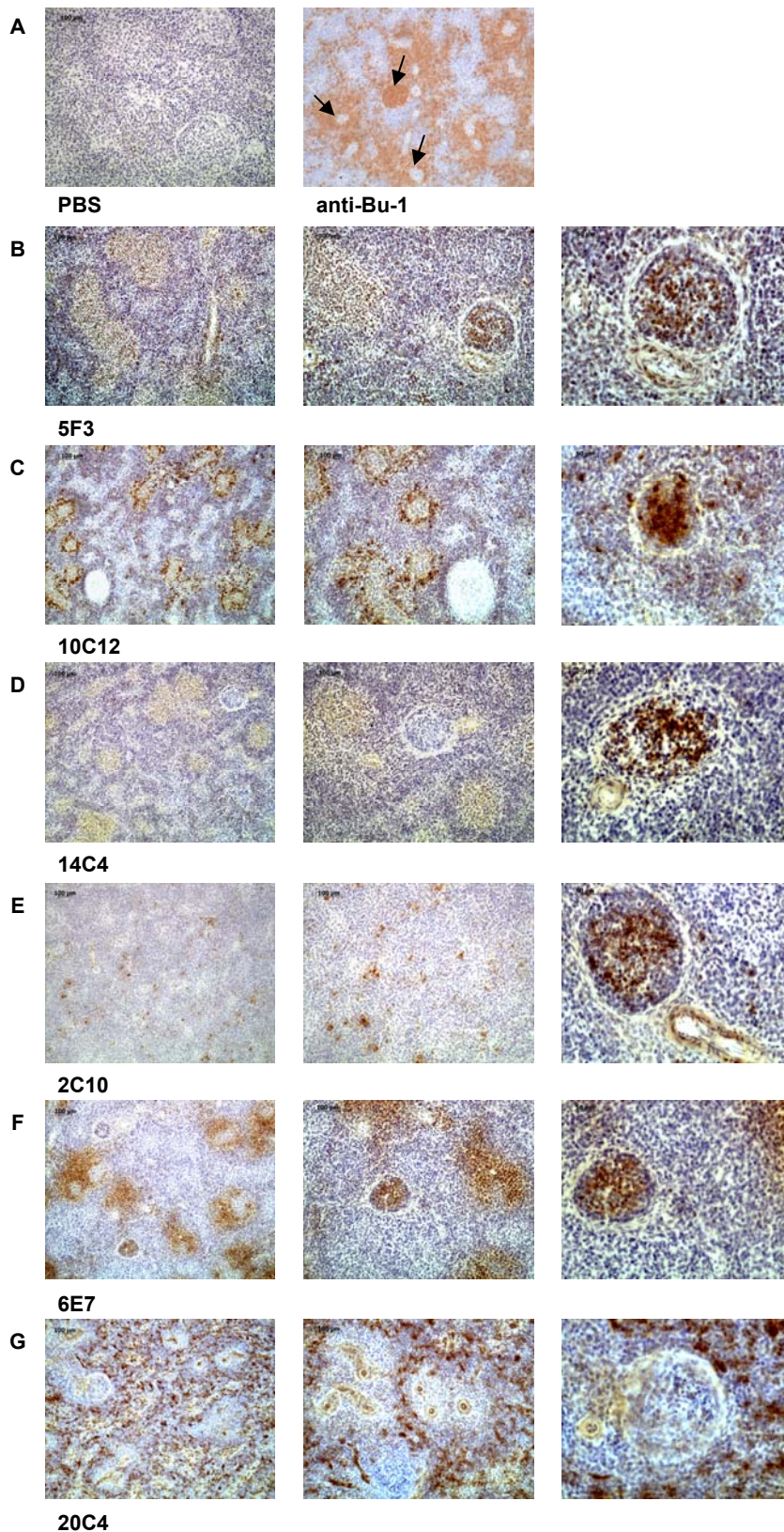
### 5.2.9.2 Immunhistologie auf Milzschnitten

Bei einem weiteren Test der Antikörper auf Milzschnitten zeigt sich, dass die Zellen, die positiv waren für den Antikörper 5F3 zusammenhängend in bestimmten Bereichen der Milz lagen und auch in den germinalen Zentren eine größere Zahl 5F3-positiver Zellen zu finden war (siehe Abbildung 22B). Die Zellen im germinalen Zentrum wurden von diesem Antikörper sehr deutlich angefärbt und lagen eher im Zentrum des germinalen Zentrums, die Färbung der anderen Zellen war im Vergleich dazu sehr schwach. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen erkannte dieser Antikörper knapp 10% der B-Zellen in der Milz (siehe Abbildung 15).

Die 10C12 positiven Zellen waren ringförmig um eine Lage nicht angefärbter Zellen um die Kapillaren herum angeordnet. Auch Zellen in den germinalen Zentren wurden deutlich angefärbt. Einzelne 10C12 positive Zellen waren auch in der roten Pulpa und in der PALS-Region der Milz zu finden (Abbildung 22C). In den durchflusszytometrischen Färbungen erkannte dieser Antikörper in der Milz ausschließlich B-Zellen und davon ca. 10% (siehe Abbildung 15).

Die Zellen, die positiv waren für den Antikörper 14C4 zeigten eine ähnliche Verteilung, wie die 5F3-positiven Zellen. Auch dieser Antikörper färbte deutlich Zellen in den germinalen Zentren, im Gegensatz zu 5F3 gab es aber auch germinale Zentren, die von 14C4 nicht angefärbt wurden, außerdem war eine Anzahl schwach gefärbter Zellen zu erkennen (Abbildung 22D). Dies entsprach den durchflusszytometrischen Messungen in denen beide Antikörper ausschließlich einen Teil der Milz-B-Zellen erkannten (siehe Abbildung 15).

Wie in Abbildung 22E zu sehen ist, erkannte der Antikörper 2C10 nur wenige Zellen in der Milz. Diese schienen über die ganze Fläche der Milz verteilt zu sein und waren deutlich positiv. Auch Zellen in den germinalen Zentren wurden deutlich angefärbt, der Rand des germinalen Zentrums wurde nicht angefärbt. In den durchflusszytometrischen Messungen erkannte dieser Antikörper etwa 15% der B-Zellen in der Milz (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 22: Test der generierten Antikörper in immunhistologischen Färbungen auf Milzschnitten**

Gefrierschnitte einer Milz wurden mit den angegebenen Antikörpern immunhistologisch gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit PBS. Zum Vergleich wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen Bu-1 (chB6) durchgeführt. Dieser färbt B-Zellen in den germinalen Zentren und in den B-Zellarealen um die Kapillaren (PELS). Diese Bereiche sind mit Pfeilen markiert.



Der Antikörper 6E7 färbte Zellen in der Milz stark an, und die Verteilung der 6E7-positiven Zellen war ähnlich dem Bild wie es nach einer Färbung mit einem anti-chB6-Antikörper zu sehen ist (Abbildung 22A und F). Die Zellen in den germinalen Zentren waren größtenteils positiv für 6E7, die Zellen am Rand des germinalen Zentrums wurden allerdings nicht angefärbt. Außerdem färbte dieser Antikörper Zellen in der periellipsoidalen weißen Pulpa, die ringförmig um Kapillaren angeordnet waren, was den B-Zellarealen der Milz entspricht. Zellen um die größeren Arterien herum wurden nicht angefärbt. In durchflusszytometrischen Messungen färbte der Antikörper 6E7 in der Milz alle B-Zellen (siehe Abbildung 15).

Auch der Antikörper 20C4 zeigte eine charakteristische Färbung auf den Milzschnitten. Die stark positiven Zellen waren in bestimmten Bereichen der Milz zu finden, während die periellipsoide weiße Pulpa um die Kapillaren und die germinalen Zentren nur sehr schwach angefärbte Zellen enthielten. Außerdem färbte dieser Antikörper die Kapillarendothelien selbst an (Abbildung 22G). In durchflusszytometrischen Messungen erkannte dieser Antikörper alle Milz-Leukozyten (siehe Abbildung 15).

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen der Antikörper auf Gefrierschnitten von Milz und Bursa zusammengefasst.

	Bursa		Milz
	Mark	Rinde	
<b>5F3</b>	+	+	GC einzelne Zellen, andere Bereiche
<b>10C12</b>	++	-	GC, PELS, vereinzelt Zellen in PALS
<b>14C4</b>	++	+	GC zT, andere Bereiche
<b>2C10</b>	++	+	GC, vereinzelt andere Zellen
<b>6E7</b>	+++	+	GC, PELS
<b>20C4</b>	+ Struktur im Zentrum	++	GC zT, vereinzelt Zellen in PALS

**Tabelle 10: Übersicht über das Färbemuster der Antikörper auf Gefrierschnitten von adulter Bursa und Milz.**

GC: germinales Zentrum, PELS: periellipsoide Lymphozyten Scheide, PALS: periarterielle Lymphozyten Scheide.

## 5.3 Antikörper gegen chCD138

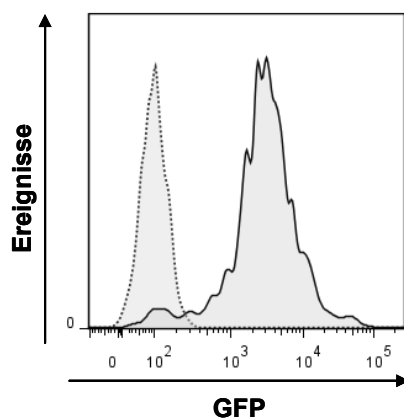
Um Antikörper gegen chCD138 zu generieren wurde zunächst ein chCD138-Konstrukt erstellt, mit dem dann HEK 293-Zellen stabil transfiziert wurden. Diese stabil transfizierten Zellen wurden im Folgenden dazu verwendet Balb/c Mäuse zu immunisieren.

### 5.3.1 Erstellung des Immunisierungskonstrukts

Auf Grundlage der Genomsequenz von chCD138 (Ensembl:ENSGALG00000016480) wurden Primer erstellt (siehe 4.5.1), mit welchen eine PCR auf einer cDNA aus der Haderschen Drüse eines 7 Monate alten Huhnes der Linie M11 durchgeführt wurde. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert (siehe 4.5.6). Mit diesem Konstrukt wurden im nächsten Schritt HEK 293-Zellen stabil transfiziert.

### 5.3.2 Eukaryotische Expression von chCD138 in HEK 293-Zellen

Die stabile Transfektion der HEK 293-Zellen erfolgte wie unter 4.6.2 beschrieben. Da für die Klonierung der Vektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup> verwendet worden war, exprimierten die stabil transfizierten HEK 293-Zellen auf ihrer Zelloberfläche chCD138, das an seinem zytoplasmatischen C-terminalen Ende zusätzlich ein GFP-Protein aufwies und zur Detektion verwendet wurde. Nach wiederholten Tests der stabil transfizierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Messungen (siehe Abbildung 23) wurde ein Klon mit besonders hoher Expression von chCD138 ausgewählt und weiter kultiviert. Diese Zellen wurden im Folgenden zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt (siehe 4.4.1).

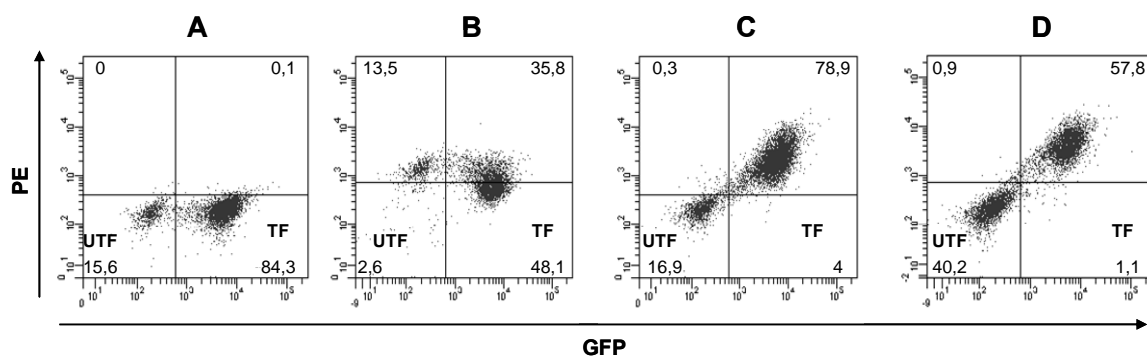


**Abbildung 23: Test der stabil transfizierten 293-HEK-Zellen**

HEK-293T-Zellen wurden mit einem chCD138GFP-Konstrukt stabil transfiziert. Die transfizierten Zellen konnten mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Gepunktete Linie: untransfizierte 293-HEK-Zellen, durchgezogene Linie: 293chCD138GFP-Zellen

### 5.3.3 Screening auf stabil transfizierten 293chCD138GFP-Zellen

Milzzellen einer immunisierten Maus wurden mit Sp2/0-Ag14-Zellen fusioniert (siehe 4.4.2). Zehn Tage nach der Fusion wurde ein erstes Screening der Klone auf einer Mischung aus stabil transfizierten 293chCD138GFP-Zellen und untransfizierten 293-Zellen durchgeführt (siehe 4.4.3). Dadurch war es möglich zu unterscheiden, ob die produzierten Antikörper wirklich gegen chCD138 gerichtet waren, oder gegen die 293-Zellen selbst (siehe Abbildung 24). Nach mehreren Tests wurden aufgrund ihres Wachstums und der deutlichen Färbung die Klone 1B4 und 7B10 für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.



**Abbildung 24: Test der Klone auf 293chCD138GFP-Zellen.**

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Klone wurden untransfizierte (UTF) 293-Zellen und stabil transfizierte 293chCD138GFP-Zellen (TF) gemischt. So konnte zwischen Antikörpern gegen 293-Zellen und Antikörpern gegen chCD138 unterschieden werden. A: Negativ-Kontrolle; B: Antikörper gegen 293-Zellen; C: 1B4; D: 7G10.

### 5.3.4 Isotypbestimmung

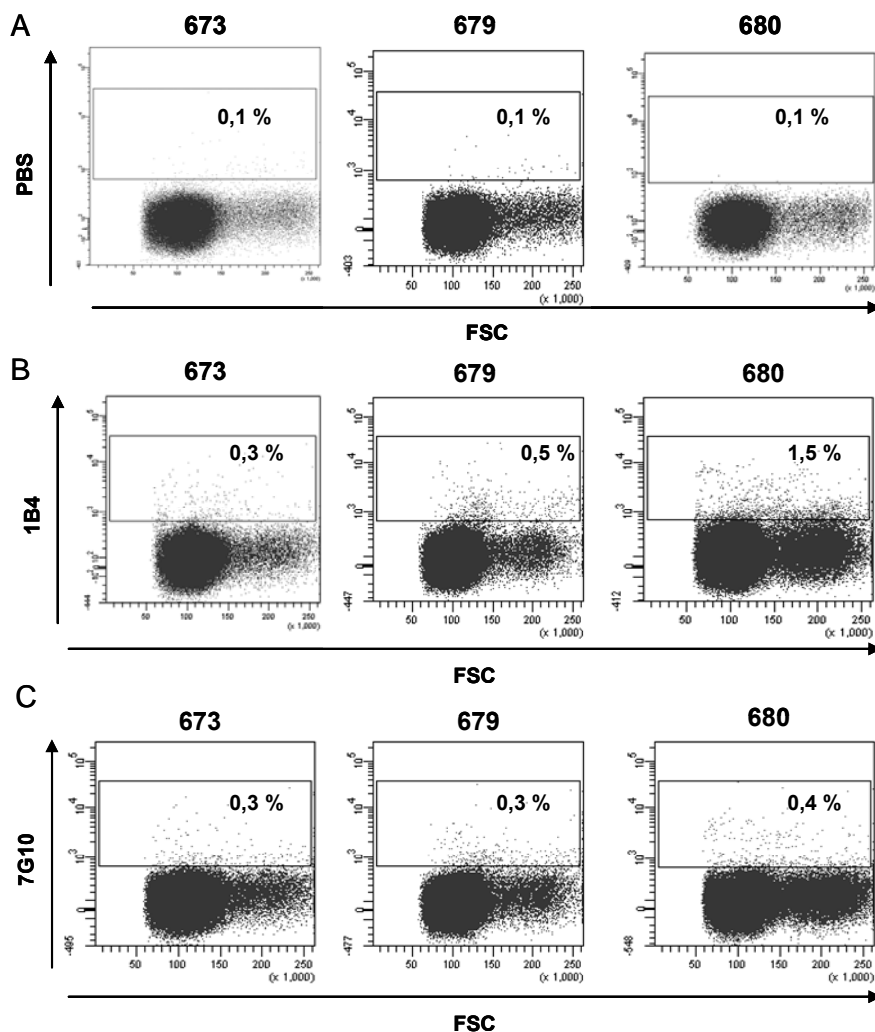
Die Isotypbestimmung der Antikörper erfolgte auf den stabil transfizierten 293chCD138GFP-Zellen. Es zeigte sich, dass beide Klone vom Isotyp IgG1 waren.

### 5.3.5 Test auf verschiedenen Organen

Wie unter 2.3.8 beschrieben wird CD138 beim Mensch als Marker für Plasmazellen verwendet. Um zu prüfen, auf welchen Zellen CD138 beim Huhn exprimiert wird, wurden zunächst durchflusszytometrische Färbungen auf Leukozyten aus verschiedenen Organen von denen bekannt war, dass sie Plasmazellen enthalten, durchgeführt.

### 5.3.5.1 Test auf peripheren Blutleukozyten

Die Antikörper wurden auf peripheren Blutleukozyten von drei verschiedenen Tieren getestet. Die Färbung wurde durchgeführt wie unter 4.8 beschrieben. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass beide Antikörper auf den peripheren Blutleukozyten jeweils eine sehr kleine Zellpopulation (0,3-1,5%) erkannten. Die Zellgröße der positiven Zellen war jedoch nicht einheitlich und es war schwierig, eine eindeutige Zellpopulation abzugrenzen. Falls es sich bei den erkannten Zellen um Plasmazellen handelte, wäre zu erwarten, dass die positiven Zellen unter den großen Zellen zu finden sind. Zudem gab es erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren.

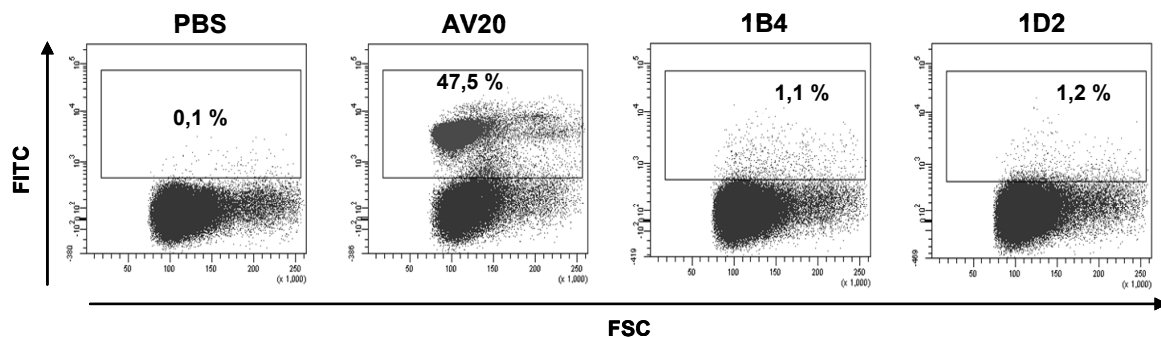


**Abbildung 25: Test der anti-chCD138 Antikörper auf peripheren Blutleukozyten.**

Periphere Blutleukozyten von drei verschiedenen Tieren wurden gewonnen und mit den generierten Antikörpern gefärbt. In der Abbildung ist die Zellgröße (FSC) gegen die Fluoreszenz der Antikörper dargestellt. A: Negativkontrolle, B: 1B4, C: 7G10. Die Zahlen über den einzelnen Bildern geben die Tiernummern an.

### 5.3.5.2 Test auf Milzzellen

Die Färbung auf Milzzellen wurde durchgeführt wie unter 4.8 beschrieben. In Abbildung 26 ist zu sehen, dass die generierten anti-chCD138 Antikörper auch auf der Milz jeweils nur eine sehr kleine Zellpopulation (1,1 bzw. 1,2 % der Zellen) erkannten. Auch bei dieser Färbung war es schwierig eine eindeutige Zellpopulation anzusprechen, da die Zellen, die positiv für den jeweiligen Antikörper waren, keine einheitliche Zellgröße aufwiesen.

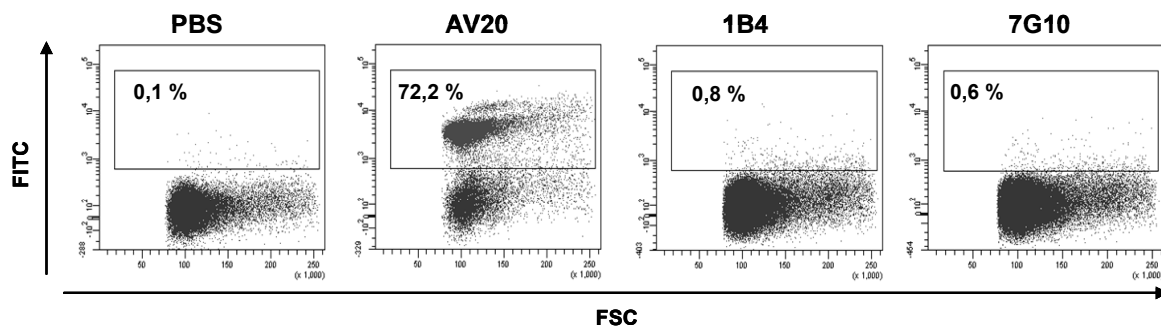


**Abbildung 26: Test der anti-chCD138 Antikörper auf Milzzellen.**

Milzzellen wurden mit den generierten Antikörpern gefärbt, die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Als Positivkontrolle wurde eine Färbung mit einem anti-chB6 Antikörper (AV20) durchgeführt. Die Zellgröße (FSC) wurde gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Angegeben sind jeweils die Prozent der positiven Zellen.

### 5.3.5.3 Test auf Caecaltonsillen

Bei Färbung der Antikörper auf Leukozyten aus den Caecaltonsillen zeigte sich, dass auch hier nur wenige Zellen (0,6 bzw. 0,8%) von den generierten anti-chCD138 Antikörpern erkannt wurden (siehe Abbildung 27). Auch hier hatten die positiven Zellen keine einheitliche Zellgröße.

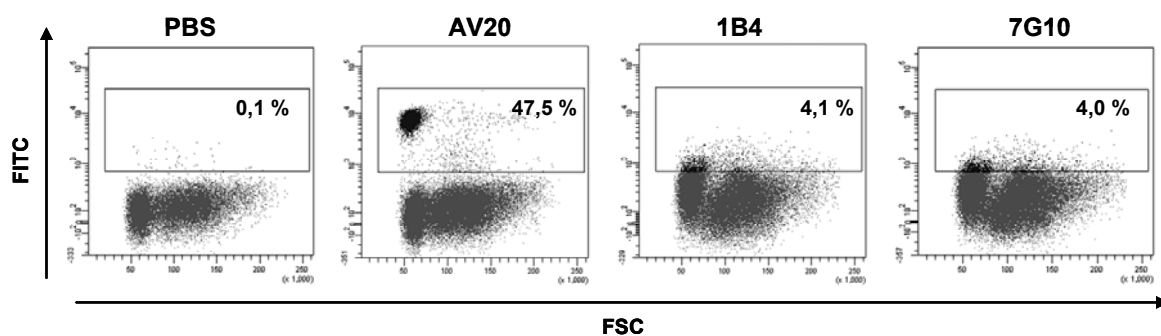


**Abbildung 27: Test der anti-chCD138 Antikörper auf Zellen aus Caecaltonsillen.**

Zellen aus Caecaltonsillen wurden mit den generierten Antikörpern gefärbt, die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Als Positivkontrolle wurde eine Färbung mit einem anti-chB6 Antikörper (AV20) durchgeführt. Die Zellgröße (FSC) wurde gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Angegeben sind jeweils die Prozent der positiven Zellen.

### 5.3.5.4 Test auf Knochenmark

Beim Test auf Leukozyten aus dem Knochenmark wurde eine Doppelfärbung gegen CD45 (siehe 4.8.4) und eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt. Damit war es möglich zu untersuchen, welche der lebenden, CD45-positiven Zellen von den anti-chCD138-Antikörpern erkannt wurden. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, war die Zahl der positiven Zellen mit 4 bzw. 4,1% höher, als bei PBL, Milz und Caecaltonsillen. Eine eindeutige Abgrenzung einer positiven Population war aber dennoch schwierig, da die positiven Zellen auch hier keine einheitliche Zellgröße aufwiesen.

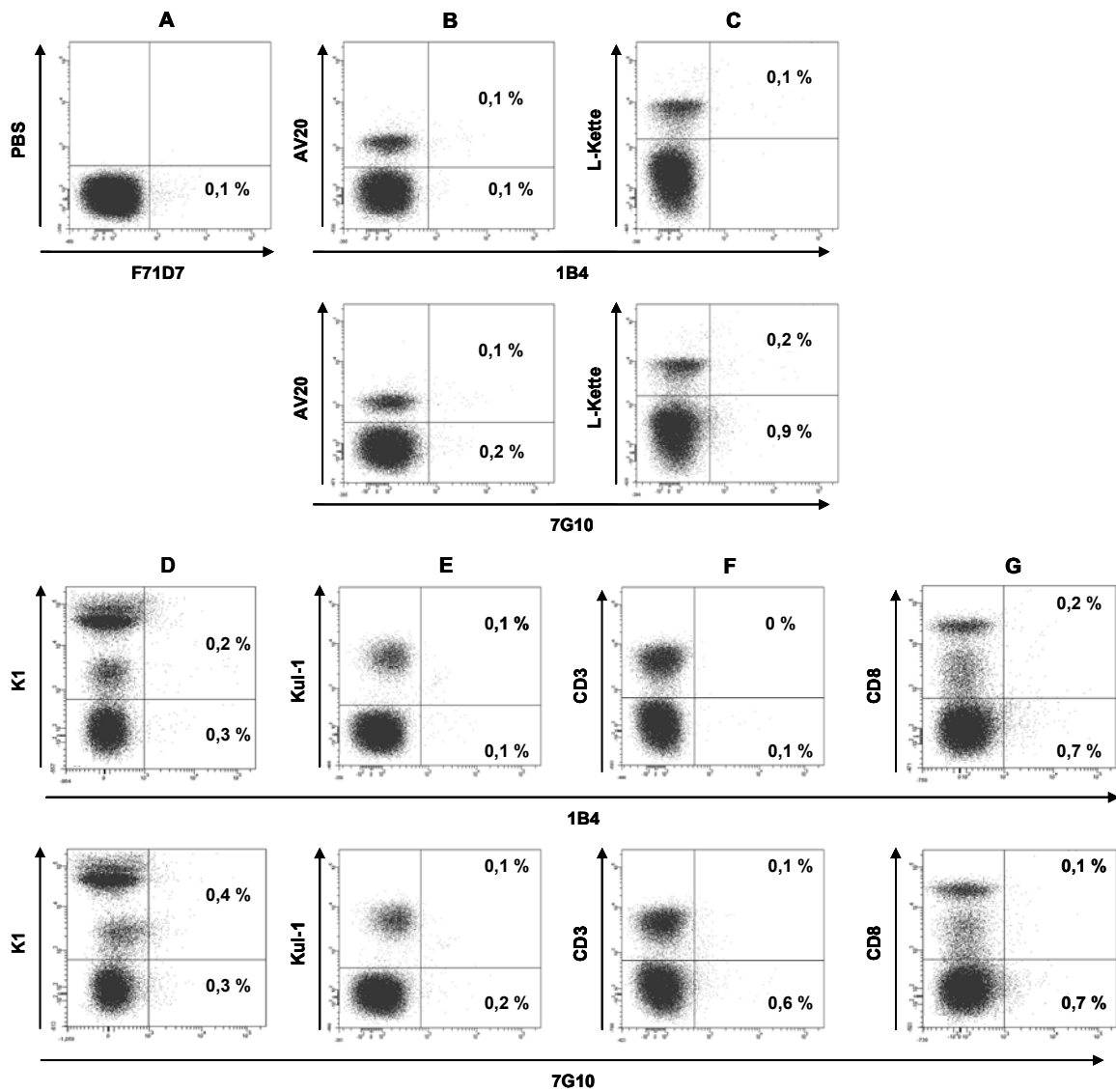


**Abbildung 28: Test der anti-chCD138 Antikörper auf Zellen aus dem Knochenmark.**

Zellen aus dem Knochenmark wurden mit den generierten Antikörpern gefärbt, die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Als Positivkontrolle wurde eine Färbung mit einem anti-chB6 Antikörper (AV20) durchgeführt. Es wurden die lebenden, CD45 positiven Zellen dargestellt. Die Zellgröße (FSC) wurde gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Angegeben sind jeweils die Prozent der CD45 positiven Zellen, die auch für die getesteten Antikörper positiv waren.

### 5.3.6 Doppelfärbungen auf peripheren Blutleukozyten

Zur näheren Charakterisierung der kleinen chCD138 positiven Zellpopulation wurden noch Doppelfärbungen mit Markern für verschiedene Leukozytenpopulationen auf peripheren Blutleukozyten (PBLs) durchgeführt. Falls es sich bei der kleinen Population von chCD138 positiven Zellen um Plasmazellen handelt, so sind diese wie in Abbildung 29B dargestellt nur teilweise positiv für AV20. Auch exprimiert nur ein Teil der CD138 positiven Zellen die leichte Kette des Immunglobulins (Abbildung 29C). Ein Teil der chCD138 positiven Zellen wurde von dem Antikörper K1, der ein Marker für Monozyten und Thromozyten ist, erkannt (Abbildung 29D). Von der kleinen Population der CD138 positiven Zellen schienen kaum Zellen von dem Antikörper Kul-1- einem Makrophagen-Marker erkannt zu werden (Abbildung 29E). Auch die Antikörper gegen CD3 und CD8, die T-Zellen erkennen, schienen nicht mit den wenigen chCD138 positiven Zellen zu reagieren (Abbildung 29E und F).

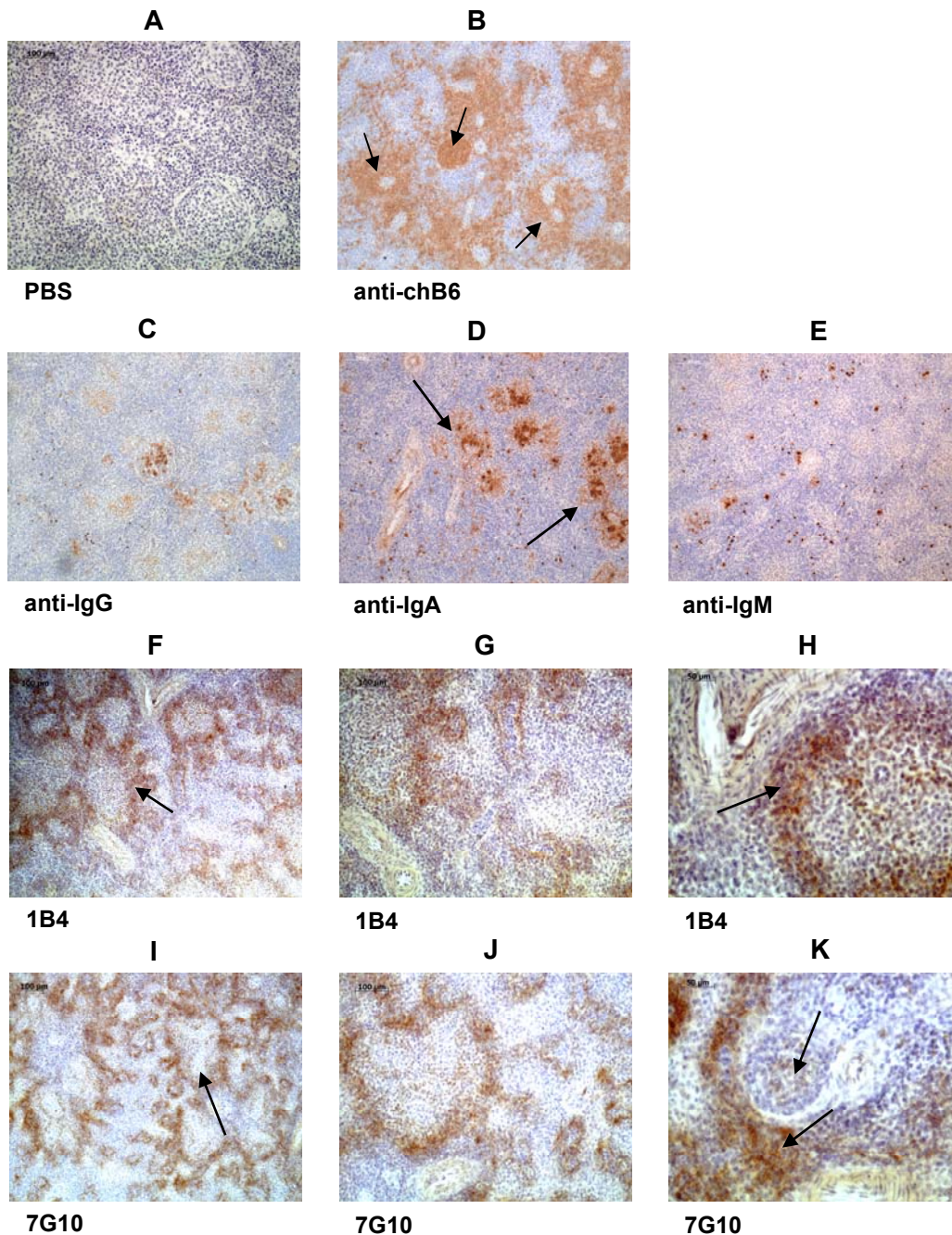


**Abbildung 29: Doppelfärbungen der anti-chCD138-Antikörper auf peripheren Blutleukozyten**  
 Es wurden Doppelfärbungen der anti-chCD138-Antikörper (1B4 und 7G10) gegen verschiedene andere Antikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils mit FITC- oder PE-markierten sekundären Antikörpern. Angegeben sind die Prozent der positiven Zellen. Als Isotypkontrolle diente der Antikörper F71D7 (A).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der Durchflusszytometrie weder auf peripheren Blutleukozyten noch auf Milz, Caecaltonsillen und Knochenmark eine eindeutige CD138 positive Zellpopulation anfärbbar war.

### 5.3.7 Immunhistologie auf Milzschnitten

Da eine CD138-positive Zellpopulation durchflusszytometrisch nicht sicher anzusprechen war, wurden die generierten anti-chCD138-Antikörper im Weiteren in immunhistologischen Färbungen auf Milzschnitten getestet.



**Abbildung 30: Immunhistologische Färbung der generierten Antikörper auf Milz-Schnitten.**

Gefrierschnitte einer Milz wurden mit den anti-chCD138-Antikörpern immunhistologisch gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit PBS. Die Pfeile markieren jeweils sie Bereiche, die von den jeweiligen Antikörpern angefärbt wurden und auf die im Text näher eingegangen wird. Dargestellt sind jeweils Bilder in den Vergrößerungen 10x (F,I), 20x (G,J) und 40x (H,K).

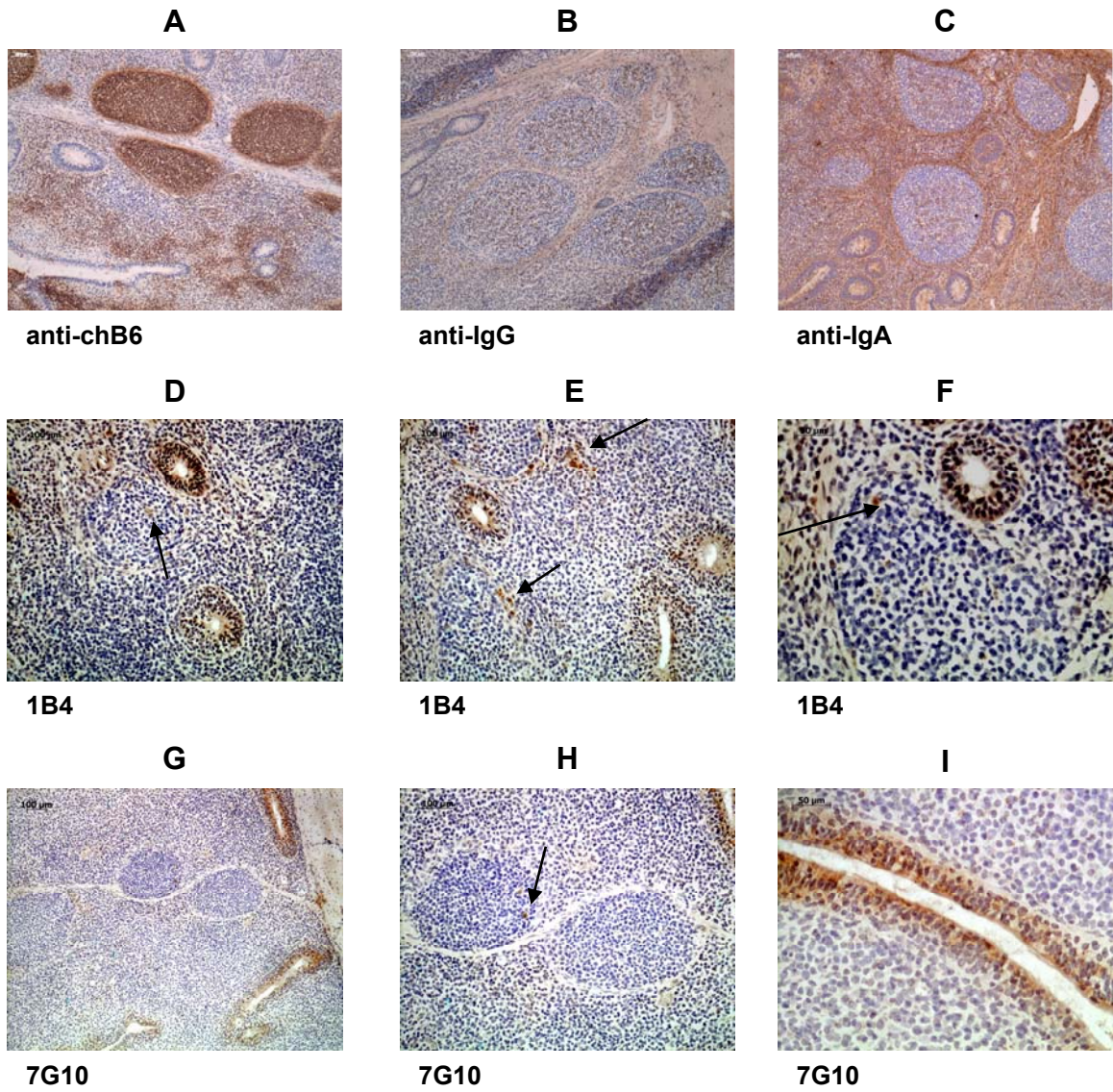


In der Färbung mit einem Antikörper gegen Bu-1 (chB6), der B-Zellen anfärbt, ist zu sehen, dass die B-Zellbereiche um die Kapillaren (PELS) und die germinalen Zentren (Abbildung 30B) angefärbt wurden. Wie in Abbildung 30C zu sehen ist, wurden mit einem Antikörper gegen IgY sowohl Zellen im germinalen Zentrum, als auch in der roten Pulpa der Milz angefärbt. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die Färbung mit einem Antikörper gegen IgM (Abbildung 30E). Der Antikörper gegen IgA erkannte sowohl einzelne Zellen, die über die gesamte Fläche der Milz verteilt lagen, als auch Ansammlungen von Zellen, die ringförmig um nicht angefärbte Bereiche lagen (Abbildung 30D).

Die Antikörper gegen chCD138 zeigten beide auf den Milzschnitten ein ähnliches, charakteristisches Färbemuster. So färbten sie jeweils stark Zellen, die ringförmig um nicht angefärbte Bereiche lagen (Abbildung 30F und I Pfeile). Diese Bereiche lagen teilweise in der Nähe größerer Gefäße (Abbildung 30H Pfeil). Dieses Bild war ähnlich der Färbung mit dem anti-IgA-Antikörper. In den germinalen Zentren wurden vereinzelt positive Zellen gefunden (Abbildung 30K Pfeil). Die Zellen in den Bereichen um größere Gefäße wurden von den Antikörpern dagegen nicht angefärbt. Insgesamt wurden von den anti-chCD138 Antikörpern deutlich mehr Zellen angefärbt, als von den Antikörpern gegen Immunglobuline.

### 5.3.8 Immunhistologie auf Schnitten von Caecaltonsillen

Schließlich wurden die generierten Antikörper noch in immunhistologischen Färbungen auf Caecaltonsillen getestet. In Abbildung 31A ist eine Färbung mit einem Antikörper gegen Bu-1 dargestellt. Dieser färbt die B-Zellen in den germinalen Zentren und in der lamina propria und dem Epithel. Wie in Abbildung 31 B und C zu sehen ist, färben Antikörper gegen die Immunglobuline einzelne Zellen in den germinalen Zentren. Beide Antikörper gegen chCD138 färbten dagegen die Epithelzellen stark an (Abbildung 31I). Dies ist auch für Antikörper gegen humanes CD138 beschrieben (siehe 2.3.8). Zusätzlich färbten beide Antikörper vereinzelt Zellen in den germinalen Zentren (Pfeile in Abbildung 31D, F und H) und auch Strukturen, die sich in der Nähe der germinalen Zentren befanden (Pfeil in Abbildung 31E).



**Abbildung 31: Immunhistologische Färbungen auf Schnitten von Caecaltonsillen.**

Gefrierschnitte einer Caecaltonsille wurden mit den generierten Antikörpern (1B4, 7G10) immunhistologisch gefärbt. Die Pfeile markieren die Bereiche, die von den anti-chCD138 Antikörpern angefärbt wurden und auf die im Text näher eingegangen wird. Dargestellt sind jeweils Abbildungen in den Vergrößerungen 10x (D,H), 20x(E,H) und 40x (F,I).

## 6 Diskussion

Als Modeltier für immunologische Untersuchungen ist das Huhn schon lange Zeit von großer Bedeutung. So wurde beispielsweise die Dichotomie der Zellen der adaptiven Immunantwort, also das Vorhandensein von T- und B-Zellen beim Huhn entdeckt [221]. Da das Huhn zu den GALT-Spezies gehört, und somit sein Immunsystem einige wesentliche Unterschiede zu dem des Säugers aufweist, ist das Huhn als Tiermodell für Mensch und Maus nur eingeschränkt nutzbar. Mit der Entdeckung, dass viele unserer Haussäugetiere wie das Rind [222], Schaf [223] und Kaninchen [224] auch zu den GALT-Spezies gehören, also das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe eine wichtige Rolle bei der B-Zellentwicklung spielt, hat das Huhn als Modeltier für immunologische Untersuchungen wieder an Bedeutung gewonnen.

B-Zellen spielen sowohl beim Huhn, als auch beim Säuger eine entscheidende Rolle in der humoralen Immunantwort. Leider fehlen derzeit noch Marker mit deren Hilfe Subpopulationen von B-Zellen unterschieden werden können. So ist es auch nicht möglich, die funktionelle Bedeutung solcher Subpopulationen zu analysieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits vorhandene Marker auf ihre Reaktivität mit Hühner-B-Zellen getestet, und es wurden neue Marker für Hühner-B-Zellen generiert.

### 6.1 Charakterisierung bereits vorhandener Marker

Von den Antikörpern 3H7, 8D12, 28-4 und 4A5 und Antikörpern gegen Sialyl-Lewis-X und Lewis-X war bereits bekannt, dass sie zum Teil an B-Zellen binden. Daher sollte näher untersucht werden, ob mit diesen eine Unterscheidung von B-Zellsubpopulationen möglich ist.

#### 6.1.1 3H7 und 8D12

Der Antikörper 3H7 erkennt CHIR-B2, einen inhibitorischen Rezeptor der zur Familie der Ig-like Rezeptoren gehört [218]. Vom Antikörper 8D12 wird der Rezeptor CHIR-AB1 mit sowohl inhibierenden, als auch aktivierenden Eigenschaften, der zum Leukozyten-Rezeptor-Komplex gehört erkannt. Von Viertlböck et al. wurde beschrieben, dass dieser

Antikörper B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen, nicht aber T-Zellen erkennt [219].

In durchflusszytometrischen Färbungen auf peripheren Blutleukozyten, Milz, Bursa, Caecaltonsillen und Knochenmark wurden von 3H7 und 8D12 jeweils alle AV20 positiven Zellen erkannt. 3H7 reagierte dabei ausschließlich mit AV20<sup>+</sup> Zellen, während 8D12 auch einen kleinen Teil der anderen Zellen erkannte. Für 8D12 zeigte sich das gleiche Bild auch für die B-Zellen in der embryonalen Tag 14 Bursa, die bereits auch alle in hohem Maße CHIR-AB1 exprimierten. Zum gleichen Zeitpunkt exprimierten auch alle B-Zellen in der Bursa CHIR-B2, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß, als in der adulten Bursa.

*In vitro* Stimulation von Milz-Zellen mit CD40L führte sowohl in den proliferierenden B-Zell-Blasten, als auch in den sich nicht teilenden B-Lymphozyten zu einer starken Herunterregulation von CHIR-B2 und CHIR-AB1. Dieser Effekt ist gegensätzlich zu der Hochregulation von CD80, die bei einer derartigen Stimulation von Milz-B-Zellen beobachtet wurde [206]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass CHIR-B2 und CHIR-AB1 schon früh homogen auf B-Zellen exprimiert werden, daher kann mit 3H7 und 8D12 keine Subpopulation von naiven B-Zellen detektiert werden. Allerdings wird durch Aktivierung der B-Zellen die Expression der von diesen Antikörpern erkannten Oberflächenmoleküle herunterreguliert, sodass 3H7 und 8D12 geeignet sind den Aktivierungszustand einer B-Zelle anzuzeigen.

### 6.1.2 28-4

Der Antikörper 28-4 stammt aus einer Fusion gegen gesortete CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> intraepitheliale Leukozyten (IEL). Von Göbel et al. wurde berichtet, dass er spezifisch mit einem Glykoprotein auf der Zelloberfläche von CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> intraepithelialen Leukozyten reagiert [220]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen auf PBL, Milz, Caecaltonsillen und Knochenmark war bei der Färbung mit diesem Antikörper eine leichte Verschiebung der gesamten B-Zellpopulation zu erkennen. Das heißt alle B-Zellen in diesen Organen zeigten eine schwache Expression des 28-4 Antigens, wobei manche der B-Zellen dieses Antigen schwächer exprimieren als andere.

In der adulten Bursa exprimierten dagegen nur knapp 10% der AV20<sup>+</sup> Zellen das von 28-4 erkannte Antigen. Auch in der embryonalen Tag 14 Bursa waren weniger als 10% der AV20<sup>+</sup> Zellen 28-4 positiv. Die Stimulation mit CD40L führte sowohl auf den nicht

proliferierenden B-Zellen als auch auf den B-Zell-Blasten zu einer deutlichen Hochregulation des 28-4 Antigens.

Der Antikörper 28-4 erkennt also ein Antigen, das neben den  $CD8^+CD3^-$  intraepithelialen Leukozyten auch auf einem Teil der B-Zellen exprimiert wird. Von den unreifen B-Zellen in den Bursa wird von diesem Antikörper ein wesentlich geringerer Teil erkannt, als von den B-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen. Da das 28-4 Antigen auf B-Zellen durch Stimulation hochreguliert wird, ist davon auszugehen, dass 28-4 aktivierte B-Zellen erkennt. Dies würde bedeuten, dass in PBL, Caecaltonsille und Milz aktivierte B-Zellen vorhanden sind, da in diesen Organen B-Zellen von 28-4 angefärbt werden. Wenn aber 3H7 und 8D12 auf aktivierten B-Zellen nicht mehr exprimiert werden, dann stellt sich die Frage, warum alle B-Zellen in PBL, Caecaltonsille und Milz 3H7 und 8D12 positiv sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die unterschiedliche Situation *in vitro*, bei der nur ein Stimulus auf die B-Zelle einwirkt, und *in vivo* wo ein komplex reguliertes System mit unterschiedlicher Gegenregulation vorliegt und daher die Reaktion auf Stimulation mit CD40L *in vitro* möglicherweise nicht die Situation *in vivo* widerspiegelt. Die durch CD40L-Stimulation aktivierten B-Zellen konnten bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden, daher wäre es ein Ziel, diese auch *in vivo* nachzuweisen. Da der Antikörper 28-4 wie oben beschrieben *in vitro* aktivierte B-Zellen erkennt, wäre eine Möglichkeit hierfür Milz-Gefrierschnitte mit 28-4 zu färben um darzustellen, welche Zellen dieser Antikörper *in vivo* in der Milz anfärbt.

### 6.1.3 4A5

4A5 war aus einer Fusion gegen gesortete  $CD3^-CD8^+$  periphere Blutleukozyten entstanden. In durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich, dass dieser Antikörper in allen untersuchten Organen alle B-Zellen erkannte.

An Embryonaltag 14 waren in der Bursa dagegen erst 20% der  $AV20^+$  Zellen  $4A5^+$ . Das erkannte Antigen wird demnach erst im Laufe der Embryonalentwicklung auf allen B-Zellen exprimiert. Bei Milz-Zellen, die mit CD40L stimuliert worden waren, waren an Tag 3 98% der kleinen Lymphozyten und auch der proliferierenden B-Zell-Blasten genauso stark positiv für 4A5, wie bei unstimulierten Milz-Zellen.

Das Färbeverhalten von 4A5 auf embryonaler Tag 14 Bursa korreliert mit der Expression von sIg, da an ET14 auch erst wenige B-Zellen in der Bursa  $sIg^+$  sind [213]. Daher könnte

das 4A5 Antigen mit dem B-Zellrezeptor assoziiert sein. Allerdings wird sIg auf proliferierenden Blasten im Laufe der Zeit herunter reguliert [199]. Das heißt die hohe Expression von 4A5 auf mit CD40L stimulierten B-Zellen spricht gegen eine Verbindung des 4A5 Antigens mit dem B-Zellrezeptor.

Da 4A5 in allen untersuchten Organen über 95% der B-Zellen erkannte, kann dieser Antikörper als Pan-B-Zellmarker verwendet werden.

#### 6.1.4 CD15/CD15s

Mit Hilfe von Antikörpern gegen Sialyl-Lewis-X (CD15s) und Lewis-X (CD15) konnte bereits von Masteller et al. gezeigt werden, dass diese Kohlenhydrate nicht nur als Blutgruppenantigene, sondern auch bei der Migration der B-Zellen in die und aus der Bursa eine Rolle spielen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Sialyl-Lewis-X ein Ligand für die Adhäsionsmoleküle der Selektin-Familie darstellt, und an der Migration und Rezirkulation von reifen Leukozyten im Säuger beteiligt ist [194]. Daher wurde vermutet, dass derartige Interaktionen auch für bestimmte Entwicklungsstadien der Hühner-B-Zellen eine Rolle spielen. In in-vitro Untersuchungen mit der Tumorzelllinie DT40, deren Zellen im Stadium der bursalen B-Zellen arretiert sind und hohe Mengen an Sialyl-Lewis-X exprimieren, konnte gezeigt werden, dass diese an Bursagewebe binden [196].

In durchflusszytometrischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Bursa bereits ab Embryonaltag 12 Sialyl-Lewis-X positive Zellen vorhanden waren. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 25% der AV20<sup>+</sup> Zellen Sialyl-Lewis-X positiv. Bei den Sialyl-Lewis-X positiven, AV20 negativen Zellen handelte es sich vermutlich wie von Masteller et al. beschrieben um myeloide Vorläuferzellen [198]. Bis ET14 nahm die Zahl der Sialyl-Lewis-X positiven, AV20 positiven Zellen zu. In der weiteren bursalen Entwicklung nahm die Zahl der AV20<sup>+</sup>S-Lewis-X<sup>+</sup> Zellen kontinuierlich ab. So waren an ET 18 zwar noch knapp 20% der bursalen B-Zellen S-Lewis-X positiv, im Alter von 3 Monaten waren es aber nur mehr knapp 3%.

Bis einschließlich ET 14 konnten in der Bursa keine Lewis-X positiven Zellen nachgewiesen werden. An ET 18 waren dagegen knapp 90% der B-Zellen Lewis-X positiv, und auch kurz nach dem Schlupf und in der adulten Bursa exprimierten noch über 90% der B-Zellen Lewis-X auf ihrer Oberfläche.

In peripheren Blutleukozyten und in der Milz eines adulten Tieres waren etwa 10% der B-Zellen Sialyl-Lewis-X positiv. Als eine mögliche Erklärung für die vermehrte Expression von Sialyl-Lewis-X auf B-Zellen im peripheren Blut wurde von Palojoki et al. angeführt, dass die Expression von Sialyl-Lewis-X möglicherweise dazu nötig ist, damit die B-Zellen die Gefäße verlassen und in sekundär lymphatische Organe einwandern können [197].

Von den B-Zellen im peripheren Blut waren knapp 4% Lewis-X positiv, in der Milz waren es etwa 8%. Masteller et al. konnten nachweisen, dass in der Bursa die Zellen, die Lewis-X auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, begonnen haben Genkonversion zu durchlaufen [198]. Möglicherweise kennzeichnet die Expression von Lewis-X in der Milz B-Zellen, die einen weiteren Entwicklungsschritt durchlaufen haben, indem sie durch Antigenkontakt aktiviert wurden und eine germinale Zentrumsreaktion durchlaufen haben. Eine Möglichkeit um die Lewis-X<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz weiter zu charakterisieren wäre es, immunhistologische Färbungen von Milzschnitten mit einem Antikörper gegen Lewis-X durchzuführen und so die Verteilung der Lewis-X positiven Zellen darzustellen.

Neben B-Zellen wurden von Antikörpern gegen Sialyl-Lewis-X in allen untersuchten Organen auch teilweise andere Zellen angefärbt. Antikörper gegen Lewis-X reagierten dagegen ausschließlich mit B-Zellen.

Übereinstimmend mit Masteller et al. konnte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen demnach gezeigt werden, dass B-Zellvorläufer in der frühen bursalen Entwicklungsphase auf ihrer Zelloberfläche Sialyl-Lewis-X exprimieren und diese Expression im Laufe der Embryonalentwicklung herunterreguliert wird, sodass zum Zeitpunkt des Schlupfes und auch in der adulten Bursa nur noch sehr wenige AV20<sup>+</sup>S-Lewis-X<sup>+</sup> Zellen vorhanden sind. Auch die fehlende Expression von Lewis-X auf AV20<sup>+</sup> Zellen in der frühen bursalen Entwicklung und die Hochregulation dieses Antigens ab Embryonaltag 15 stimmte mit den von Masteller et al. gewonnenen Erkenntnissen überein [196]. Allerdings konnte die von Masteller et al. nachgewiesene Herunterregulation von Lewis-X auf bursalen B-Zellen zum Zeitpunkt des Schlupfes und die geringgradige Expression auf B-Zellen in der adulten Bursa [198] in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Wie von Masteller et al. beschrieben wurde, können mit Antikörpern gegen Lewis-X während der Embryonalentwicklung die B-Zellen angesprochen werden, die begonnen haben Genkonversion zu durchlaufen [198]. Mit Antikörpern gegen Sialyl-Lewis-X ist es

dagegen möglich, die B-Zellen anzusprechen, die neu in die Bursa immigriert sind. Da ab ET 18 alle B-Zellen in der Bursa Lewis-X<sup>+</sup> sind, ist dieser Antikörper nicht geeignet um Subpopulationen von naiven B-Zellen in der adulten Bursa zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu erkannte der Antikörper gegen Lewis-X in Milz und PBL jedoch nur einen kleinen Teil der B-Zellen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Lewis-X<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut daher um die B-Zellen, die gerade aus der Bursa ausgewandert sind und in ihrer weiteren Entwicklung dann die Expression des Lewis-X-Antigens verlieren. In der Milz könnte es sich bei den Lewis-X<sup>+</sup> Zellen wie oben beschrieben um aktivierte B-Zellen handeln.

Auch der Antikörper gegen Sialyl-Lewis-X erkannte in PBL und Milz nur eine Subpopulation der B-Zellen. Wie weiter oben beschrieben, könnte es sich bei den Sialyl-Lewis-X<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut um die B-Zellen handeln, die nachfolgend in sekundär lymphatische Organe auswandern. In diesem Falle könnte es sich bei den Sialyl-Lewis-X positiven B-Zellen in der Milz um die B-Zellen handeln, die gerade in die Milz eingewandert sind. Die Antikörper gegen Sialyl-Lewis-X könnten wie für den Antikörper gegen Lewis-X beschrieben histologisch weiter charakterisiert werden.

## **6.2 Antikörper gegen Hühner Bursa-Zellen**

Neben der Charakterisierung bereits vorhandener Marker wurden im Rahmen dieser Arbeit auch neue Marker für Hühner B-Zellen generiert. Im ersten Ansatz wurde dazu eine Fusion gegen Hühner B-Zellen durchgeführt. In dieser wurde eine Vielzahl von Antikörpern generiert, die zunächst auf Bursa-Zellen getestet wurden. Hier zeigten die Klone ein sehr unterschiedliches Färbemuster im Hinblick auf die Anzahl der Bursa-Zellen, die erkannt wurde. Nach weiteren Untersuchungen auf verschiedenen Organen wurden sechs Klone ausgewählt, die dann weiter charakterisiert wurden.

### **6.2.1 2C10**

2C10 ist ein Antikörper, der in allen untersuchten Organen jeweils nur einen Teil der B-Zellen erkennt. Auf B-Zellen ist das Antigen, das von 2C10 erkannt wird, bereits auf embryonalen Vorläuferzellen in der Milz auf einem kleinen Teil der Zellen vorhanden, und wird auch auf wenigen B-Zellen in der embryonalen Tag 14 Bursa exprimiert. Zwischen



ET14 und ET18 wird dieses Antigen dann vermehrt exprimiert, sodass an ET18 bereits wie in der adulten Bursa über die Hälfte der B-Zellen positiv für diesen Antikörper sind.

In immunhistologischen Färbungen erkannte 2C10 auf Bursaschnitten vor allem Zellen in der Medulla der Follikel und auch vereinzelt Zellen im Cortex. Über 90% der aus der Bursa emigrierenden B-Zellen stammt aus dem Cortex der Follikel [126]. Da im Follikelcortex nur sehr wenige 2C10<sup>+</sup> Zellen vorhanden waren, liegt die Vermutung nahe, dass die 2C10<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut aus der Medulla der Follikel stammen könnten. Möglicherweise entspricht die 2C10<sup>+</sup> B-Zellpopulation die 25% der B-Zellen im peripheren Blut umfasst der von Paramithiotis et al. beschriebenen Population 2 von peripheren B-Zellen, die etwa 30% der B-Zellen im peripheren Blut ausmacht, und von der angenommen wurde, dass sie aus der Medulla der Bursafollikel stammt [127].

Auf Milzschnitten erkannte dieser Antikörper Zellen in germinalen Zentren, darüberhinaus waren auf der ganzen Fläche der Milz vereinzelt positive Zellen zu finden. Bei diesen in der Milz angefärbten Zellen könnte es sich um Plasmazellen handeln. Von Jeurissen et al. wurde beschrieben, dass diese beim Huhn sowohl in der roten Pulpa, als auch in germinalen Zentren zu finden sind [225]. Dies würde aber bedeuten, dass das Antigen das von 2C10 erkannt wird nicht spezifisch auf Plasmazellen vorhanden ist, sondern auch von anderen B-Zellen exprimiert wird.

### 6.2.2 5F3

Der Antikörper 5F3 erkennt ein Antigen, das auf embryonalen Zellen in Milz und Bursa nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird, und bei adulten Tieren dann auf einem kleinen Teil der B-Zellen vorhanden ist. In der Bursa waren die 5F3<sup>+</sup> Zellen außerdem hoch positiv für CD40 und für die L-Kette, was dafür spricht, dass von diesem Antikörper tatsächlich eine spezielle Subpopulation an Zellen erkannt wird.

In den immunhistologischen Färbungen färbte der Antikörper in der Bursa Zellen im Mark und vereinzelt auch in der Rinde der Follikel. Damit zeigte sich in der Histologie ein anderes Bild, als bei den durchflusszytometrischen Messungen, bei denen nur etwa 3% der Bursazellen 5F3<sup>+</sup> waren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Antikörper 5F3 ein Antigen erkennt das bei vielen Zellen nur zytoplasmatisch vorkommt. Damit wären diese Zellen histologisch mit 5F3 anfärbbar, nicht aber in der Durchflusszytometrie.

Auf Milzschnitten erkannte 5F3 auch Zellen im germinalen Zentrum, d.h. das von 5F3 erkannte Antigen wird auch auf aktivierten B-Zellen exprimiert.

Dieser Antikörper stellt einen sehr interessanten Marker für eine kleine Subpopulation von B-Zellen dar, bei der es sich möglicherweise um aktivierte B-Zellen handeln könnte. Um dem nachzugehen, könnten mit CD40L stimulierte Milzzellen mit 5F3 durchflusszytometrisch gefärbt werden, um herauszufinden, in welchem Maße die kleinen, nicht proliferierenden B-Zellen und die B-Zell-Blasten von diesem Antikörper angefärbt werden.

### 6.2.3 6E7

6E7 ist ein Antikörper, der ein Antigen erkennt, das ausschließlich von B-Zellen exprimiert wird, schon ab der frühen Embryonalentwicklung auf den B-Zellvorläufern in der Milz vorhanden ist und kontinuierlich von den B-Zellen exprimiert wird. Der Antikörper 6E7 erkannte in durchflusszytometrischen Färbungen 95% der Bursazellen. Bei der Analyse von Milzzellen und peripheren Blutleukozyten reagierte dieser Antikörper mit allen B-Zellen. Die B-Zellen waren für diesen Antikörper jeweils stark positiv. Bei den Färbungen auf embryonalen Organen zeigte sich, dass bereits an ET14 in der Milz alle B-Zellen schwach positiv für 6E7 waren. Auch in der Bursa waren zu diesem Zeitpunkt und an ET18 alle B-Zellen positiv für diesen Antikörper. In den Dot Plots der durchflusszytometrischen Färbungen von embryonaler Milz und Bursa war zu sehen, dass die B-Zellen das von 6E7 erkannte Antigen während der Entwicklung hochregulieren.

In immunhistologischen Färbungen erkannte der Antikörper 6E7 auf Bursaschnitten Zellen in der Medulla der Follikel, welche sehr stark angefärbt wurden. Zellen im Cortex der Bursafollikel wurden dagegen nicht erkannt. Auf Milzschnitten war die Verteilung der 6E7 positiven Zellen ähnlich wie bei einer Färbung mit einem Antikörper gegen chB6 (AV20). Die Tatsache, dass die Frequenz der 6E7 positiven Zellen in allen untersuchten Organen und zu allen Zeitpunkten mit der Frequenz der AV20<sup>+</sup> Zellen übereinstimmt, legte die Vermutung nahe, dass 6E7 wie AV20 das chB6-Antigen erkennt. Allerdings ist in embryonaler Tag 14 Bursen bereits eine deutlich AV20<sup>+</sup> Zellpopulation zu sehen, die zu diesem Zeitpunkt aber erst schwach positiv für 6E7 ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Antikörper 6E7 eine geringere Affinität zu dem erkannten Antigen hat, oder aber, dass 6E7 nicht das gleiche Antigen erkennt, wie AV20 und das von 6E7 erkannte Antigen erst später in der Embryonalentwicklung von den B-Zellen exprimiert

wird. Die leicht diagonale Lage der AV20<sup>+</sup>6E7<sup>+</sup> Zellpopulation lässt vermuten, dass von den beiden Antikörpern verschiedene Epitope des gleichen Antigens erkannt werden könnten. Bei der kleinen CD45<sup>+</sup>6E7<sup>-</sup> Zellpopulation in der Bursa könnte es sich möglicherweise um T-Zellen handeln. Da 6E7 in allen untersuchten Organen über 95% der B-Zellen erkannte, war es auch möglich, dass er mit Immunglobulin auf der Oberfläche von B-Zellen reagiert. Daher wurde im ELISA die Bindung von 6E7 an eine mit Hühnerserum beschichtete Platte überprüft. Hierbei war der gemessene Wert für 6E7 jedoch nicht höher, als der der Negativ-Kontrolle. Damit konnte ausgeschlossen werden, es sich bei dem von 6E7 erkannten Antigen um ein Immunglobulin handelt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Antikörper 6E7 aufgrund seines Färbemusters genau wie der anti-chB6-Antikörper (AV20) als Pan-B-Zellmarker verwendet werden kann.

#### **6.2.4 10C12**

Der Antikörper 10C12 erkannte in den durchflusszytometrischen Messungen in Bursa und Milz ca. 10% der B-Zellen. Im peripheren Blut war eine kleine 10C12 hoch positive Zellpopulation vorhanden, am Gegensatz zu Milz und Bursa zeigten hier aber auch alle anderen B-Zellen eine geringgradige Expression von 10C12. Dieser Antikörper erkannte in der Milz und in der Bursa außer B-Zellen keine anderen Zellen. Von den peripheren Blutleukozyten war aber auch ein kleiner Teil der AV20<sup>-</sup> Zellen positiv für 10C12.

Das Antigen, das von 10C12 erkannt wird, ist bereits an Embryonaltag 14 auf einem kleinen Teil der B-Zellen in Milz und Bursa vorhanden, und wird im Laufe der Embryonalentwicklung auf einem zunehmenden Teil der B-Zellen exprimiert.

Eine Ursache dafür, dass ein so großer Teil der B-Zellen im Blut 10C12<sup>+</sup> ist, könnte sein, dass die B-Zellen das von 10C12 erkannte Antigen hochregulieren, wenn sie aus der Bursa ins Blut emigrieren, im Blut eine hohe Expression dieses Antigens aufweisen und es wieder herunter regulieren, wenn sie aus dem Blut in die Milz gelangen. Auf immunhistologisch gefärbten Milzschnitten waren Zellen in den germinalen Zentren und den B-Zellarealen der periellipsoidalen weißen Pulpa mit 10C12 deutlich anfärbbar. Das heißt die 10C12<sup>+</sup> Zellen lagen in den typischen B-Zellarealen der Milz. Es konnte gezeigt werden, dass Antigene, die über die Kloake aufgenommen werden aktiv in das Lumen der Bursa transportiert, und von dort aus über das Epithel in die Follikel aufgenommen

werden. Diese Antigene sind dann in der Medulla der Bursafollikel nachweisbar [226]. Daher ist die Medulla der Bursafollikel der Ort, an dem die B-Zellen in Kontakt mit Antigen kommen können. Da in den immunhistologischen Färbungen mit 10C12 auf Bursaschnitten ausschließlich einzelne Zellen in der Medulla der Follikel erkannt wurden, die sehr deutlich angefärbt waren, wäre es denkbar, dass es sich hierbei um Zellen handelt die durch Antigenkontakt aktiviert wurden und infolge dessen andere Zelloberflächenmoleküle exprimieren.

Allerdings ist zu bemerken, dass die histologisch in der Bursa angefärbten Zellen morphologisch anders aussahen, als die von den anderen Antikörpern angefärbten Zellen. Daher stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Zellen tatsächlich um B-Zellen handelt oder ob von 10C12 histologisch in der Bursa andere Zellen wie beispielsweise follikulär dendritische Zellen erkannt wurden. Die Färbung dieser Zellen sieht aus, als ob 10C12 hier ein zytoplasmatisches Antigen erkennt. Wenn dies der Fall ist, dann würde das die Diskrepanz zwischen dem Färbemuster des Antikörpers in der Durchflusszytometrie und der Histologie erklären, da durchflusszytometrisch nur membranständige Antigene erkannt werden können. Auf der anderen Seite sind durchflusszytometrische Färbungen im Vergleich zu histologischen Färbungen sehr sensitiv, daher wäre es durchaus möglich, dass die B-Zellen, die in der Durchflusszytometrie von 10C12 erkannt werden, in der Histologie nicht angefärbt wurden. Möglicherweise erkennt der Antikörper 10C12 daher in der Histologie andere Zellen, als in den durchflusszytometrischen Analysen.

### 6.2.5 14C4

Der Antikörper 14C4 erkannte in der Bursa etwa die Hälfte der Zellen, in Milz und peripheren Blutleukozyten war die Zahl der erkannten B-Zellen mit 4% bzw. 16% deutlich geringer. An Embryonaltag 14 waren in Milz und Bursa so gut wie keine Zellen 14C4 positiv, an Embryonaltag 18 ergab sich dagegen das gleiche Bild wie auf der maturen Bursa. Dem zufolge beginnen sich entwickelnde B-Zellen das Antigen, das von 14C4 erkannt wird, während der Embryonalentwicklung in der Bursa zwischen ET 14 und 18 hochzuregulieren. Da Zellen in der Bursa zu einem wesentlich höheren Prozentsatz von dem Antikörper 14C4 erkannt werden, als B-Zellen in Milz oder peripheren Blutleukozyten, könnte es sein, dass das von 14C4 erkannte Antigen bereits vor der Auswanderung der B-Zellen aus der Bursa herunterreguliert wird. Möglicherweise ist das Antigen während der frühen B-Zellentwicklung in der Bursa von Bedeutung, nach

Abschluss dieser Reifungsvorgänge wird es herunter reguliert. Alternativ könnten die B-Zellen die Expression dieses Antigens aufgrund von Reifungsprozessen die sie nach Verlassen der Bursa durchlaufen, verlieren. Eine Möglichkeit um dem nachzugehen, wäre die aus der Bursa auswandernden B-Zellen durch *in situ labelling* mit kolloidalem FITC zu markieren wie von Paramithiotis et al. beschrieben [127]. Mit dieser Methode kann zwar nicht unterschieden werden, ob die emigrierenden Zellen aus dem Cortex oder der Medulla der Bursafollikel stammen, aber es könnte überprüft werden, ob die Zellen, die direkt aus der Bursa auswandern 14C4 positiv sind.

In der Milz erkannte 14C4 in immunhistologischen Färbungen einen Teil der Zellen in den germinalen Zentren. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Antikörper ein Antigen erkennt, das auch von aktivierten B-Zellen exprimiert wird.

Von Paramithiotis et al. wurden verschiedene Populationen von peripheren B-Zellen beschrieben [127]. Sie vermuteten, dass die langlebige Population 2 die etwa 30% der peripheren Blutleukozyten ausmacht aus der Medulla der Bursafollikel stammt, und hier durch Kontakt mit Antigenen ihre längere Lebensdauer induziert wurde [126]. Da in immunhistologischen Färbungen auf Bursaschnitten vor allem Zellen in der Medulla der Follikel angefärbt wurden, könnte ein anderer Grund für die geringe Anzahl an 14C4 positiver B-Zellen im peripheren Blut sein, dass diese medullären B-Zellen die Expression des von 14C4 erkannten Antigens beibehalten, aber nur ein kleiner Teil dieser Zellen aus der Bursa in die Peripherie auswandert. Demnach könnte es sich bei den von 14C4 erkannten B-Zellen um medulläre B-Zellen handeln. Die Diskrepanz zwischen den von Paramithiotis et al. beschriebenen 30% der peripheren Blutleukozyten und den für 10C12 gemessenen 16% könnte möglicherweise durch unterschiedliche Kinetiken der B-Zellen bei verschiedenen Hühnerlinien bedingt sein.

### 6.2.6 20C4

Der Antikörper 20C4 erkannte bereits auf Embryonaltag 14 Milzen über 98% aller Leukozyten, das gleiche Bild ergab sich für embryonale Tag 14 und Tag 18 Bursa. Auch in adulten Bursen, Milz und peripheren Blutleukozyten lag der Prozentsatz der positiven Zellen bei über 98%. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem erkannten Antigen um chCD45 handeln könnte. Der Test auf 293T-Zellen, die mit einem chCD45-Konstrukt transfiziert worden waren, brachte jedoch kein positives Ergebnis. Dies könnte zum einen daran liegen, dass 20C4 tatsächlich nicht CD45 erkennt. Da CD45 in

verschiedenen Splicevarianten vorkommt, bei dem zur Transfektion verwendeten Konstrukt aber nicht alle Exons vorhanden waren, ist es jedoch nicht völlig auszuschließen, dass 20C4 eine alternative Splicevariante erkennt.

In histologischen Färbungen auf Milzschnitten erkannte 20C4 zwar eine Vielzahl von Zellen, allerdings waren nicht wie in den durchflusszytometrischen Messungen alle Milzzellen positiv für diesen Antikörper. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei durchflusszytometrischen Färbungen aufgrund der Präparation der Leukozyten letztlich nicht alle Milzzellen für die Analyse zur Verfügung stehen, so können beispielsweise germinale Zentrumszellen durchflusszytometrisch nicht angesprochen werden. Zusätzlich ist es durch die hohe Sensitivität der durchflusszytometrischen Untersuchungen möglich Zellen anzufärben, die histologisch von dem Antikörper nicht erkannt werden.

In immunhistologischen Färbungen auf Bursen erkannte dieser Antikörper wie erwartet alle Zellen im Cortex und weniger deutlich auch in der Medulla. Besonders interessant war eine bislang völlig unbeschriebene Struktur, die im Zentrum eines jeden Follikels von 20C4 angefärbt wurde. Hierbei könnte es sich möglicherweise um Blut- oder Lymphgefäße handeln. Von Ekino et al. wurde beschrieben, dass Lymphgefäße die Bursafollikel umgeben, ohne in sie einzutreten. Außerdem wurde von diesen Autoren beschrieben, dass ein Netzwerk von feinen Blutkapillaren an der cortikomedullären Grenze zu finden ist [227]. Paramithiotis et al. konnten zeigen, dass cortikale Lymphozyten direkt aus dem Cortex der Bursa auswandern, ohne vorher in die Medulla zu wandern. Sie vermuteten, dass die cortikalen Lymphozyten die Bursa entweder über die oben genannten Lymphgefäße die die Bursafollikel umgeben, oder über die Blutkapillaren an der corticomedullären Grenze verlassen [126]. Wie die medullären Lymphozyten die Bursa verlassen ist bisher unklar. Es wurde diskutiert, dass B-Zellen in der Medulla durch Antigen-Kontakt aktiviert werden und daraufhin zum Cortex wandern und dort proliferieren, bevor sie in die Peripherie auswandern [228-230]. Der Antikörper 20C4 färbte auf histologischen Milzschnitten deutlich erkennbar Gefäßstrukturen an. Falls es sich bei den von 20C4 erkannten Strukturen im Zentrum der Bursafollikel um Blut- oder Lymphgefäße handelt, könnten diese möglicherweise einen Weg für die medullären Lymphozyten darstellen aus der Bursa zu emigrieren. Dies könnte durch weiterführende Färbungen mit Antikörpern für Lymphgefäße und Endothelzellen abgeklärt werden.

### 6.3 Antikörper gegen chCD138

Beim Mensch ist CD138 ein häufig verwendeter Plasmazellmarker, der auch in der Tumordiagnostik von großer Bedeutung ist [231]. Da beim Huhn bisher kein spezifischer Plasmazellmarker zur Verfügung steht, ist dort bislang die einzige Möglichkeit Plasmazellen anzusprechen die Färbung mit Antikörpern gegen Immunglobuline. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Antikörper gegen chCD138 generiert und diese in durchflusszytometrischen und immunhistologischen Färbungen auf verschiedenen Organen getestet um zu klären, ob CD138 auch beim Huhn als Plasmazellmarker eingesetzt werden kann.

Nach Klonierung von chCD138 und Erstellung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden Balb/c Mäuse mit diesen Zellen für die Fusion immunsiiert. Die in der Fusion generierten anti-chCD138 Antikörper wurden zunächst auf den stabil transfizierten 293chCD138GFP-Zellen getestet und es wurden Klone ausgewählt, die spezifisch das chCD138-Antigen erkannten.

In allen untersuchten Organen (Milz, Caecaltonsille, peripheren Blutleukozyten und Knochenmark) konnte in durchflusszytometrischen Analysen nur eine sehr kleine positive Zellpopulation nachgewiesen werden, die nicht eindeutig abgegrenzt werden konnte, und die zudem keine einheitliche Zellgröße aufwies. Auch gab es große tierartliche Unterschiede. Falls es sich bei den positiven Zellen um Plasmazellen handeln würde, wäre eher zu erwarten, dass diese große Zellen wären. In adulten Mäusen sind 1-5% der Zellen im Knochenmark CD138<sup>+</sup> Plasmazellen [232]. Damit würden die von uns bestimmten Frequenzen von 4% der chCD138<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark der Hühner gut übereinstimmen. In den Doppelfärbungen auf peripheren Blutleukozyten zeigte sich, dass die CD138<sup>+</sup> Zellen keine T-Zellen und Makrophagen waren. Ein kleiner Teil der CD138<sup>+</sup> Zellen reagierte zwar mit K1- einem Marker für Thrombozyten und Monozyten, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Färbung handelt.

Auch von Wijdenes et al., die einen Antikörper gegen humanes CD138 (B-B4) generiert hatten, wurde beschrieben, dass in durchflusszytometrischen Färbungen auf peripheren Blutleukozyten und Knochenmark nahezu keine Zellen mit dem anti-CD138 Antikörper angefärbt werden konnten. Die Reaktivität von B-B4 mit Plasmazellen wurde hier unter anderem auf Proben von Patienten mit einem multiplen Myelom nachgewiesen [183].

Da es in den durchflusszytometrischen Untersuchungen insgesamt schwierig war, eine eindeutige chCD138 positive Zellpopulation anzusprechen, wurden die generierten Antikörper im Weiteren auf immunhistologischen Schnitten von Milz und Caecaltonsille getestet. Es ist bekannt, dass Plasmazellen beim Huhn in der Milz sowohl in der roten Pulpa, den PALS-Regionen und auch in den germinalen Zentren liegen [225]. Die Antikörper gegen chCD138 zeigten auf den Milzschnitten ein charakteristisches Färbemuster von stark angefärbten Zellen die ringförmig um kaum angefärbte Bereiche lagen. In den germinalen Zentren waren vereinzelt schwach positive Zellen zu finden. Da die Verteilung der chCD138<sup>+</sup> Zellen nicht den typischen B-Zellarealen in der Milz entspricht, könnte es sich bei den angefärbten Zellen um Plasmazellen handeln. Allerdings wurden mit den anti-chCD138 Antikörpern deutlich mehr Zellen angefärbt, als mit den Antikörpern gegen Immunglobuline. Daher ist es wahrscheinlich, dass neben den Plasmazellen in der Milz auch noch andere Zellen angefärbt werden.

In Caecaltonsillen liegen Plasmazellen in den interfollikulären Bereichen und in den germinalen Zentren [233]. Auf immunhistologischen Schnitten von Caecaltonsillen, die mit den anti-chCD138 Antikörpern gefärbt worden waren, waren vereinzelt positive Zellen in den germinalen Zentren und auch zwischen diesen zu finden. Im Hinblick auf ihre Lage könnte es sich bei den angefärbten Zellen tatsächlich um Plasmazellen handeln, allerdings war ihre Zahl eigentlich zu gering. Auf immunhistologischen Schnitten von Caecaltonsillen war auffällig, dass von den anti-chCD138-Antikörpern die Darmepithelzellen sehr stark angefärbt wurden. Dies ist auch für Antikörper gegen humanes CD138 beschrieben [181].

## 6.4 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit den Antikörpern 3H7, 8D12 und 28-4 aktivierte und nicht aktivierte B-Zellen unterschieden werden können. Mit den Antikörpern gegen Sialyl-Lewis-X und Lewis-X können in der Bursa gerade immigrierte B-Zellen von B-Zellen unterschieden werden, die bereits Genkonversion durchlaufen [198]. In der Milz können mit einem Antikörper gegen Sialyl-Lewis-X möglicherweise die B-Zellen angesprochen werden, die gerade in die Milz eingewandert sind, während der Antikörper gegen Lewis-X mit aktivierten B-Zellen reagieren könnte. Im peripheren Blut erkennt der Antikörper gegen Sialyl-Lewis-X möglicherweise die B-Zellen, die dabei sind



in sekundär lymphatische Organe auszuwandern, der Antikörper gegen Lewis-X könnte dagegen mit den B-Zellen reagieren, die gerade aus der Bursa emigriert sind.

Mit Hilfe der in der Fusion gegen Bursa-Zellen generierten Antikörper ist es nun möglich verschiedene Subpopulationen von B-Zellen anzusprechen. So erkennt der Antikörper 5F3 in allen Organen eine kleine B-Zellsubpopulation bei der es sich möglicherweise um aktivierte B-Zellen handelt. 14C4 und 2C10 färben dagegen histologisch vor allem medulläre B-Zellen in der Bursa, 2C10 erkennt zudem Zellen in der Milz, bei denen es sich um Plasmazellen handeln könnte. Eine Möglichkeit die B-Zellen, die von diesen Antikörpern erkannt werden näher zu charakterisieren wäre die B-Zellen zu sortieren und ihre RNA zu isolieren. Die RNA könnte dann nachfolgend in einem Micro-Array-Experiment vergleichend zu einer RNA aus B-Zellen die nicht von diesem Marker erkannt werden auf Transkriptomebene untersucht werden, um Genexpressionsunterschiede zwischen den verschiedenen B-Zellen zu finden. Mit dem Antikörper 6E7 steht nun ein weiterer Pan-B-Zellmarker zur Verfügung. Der Antikörper 20C4 erkennt alle Leukozyten, zudem färbt er histologisch eine sehr interessante, bisher noch nicht beschriebene Struktur im Zentrum der Bursafollikel bei der es sich um Blut- oder Lymphgefäße handeln könnte.

Da im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Antikörper gegen chCD138 Plasmazellen erkennen ist eine weitere Charakterisierung der von diesen Antikörpern erkannten Zellen nötig. Eine Möglichkeit hierfür wäre Zytozentrifugenpräparate anzufertigen und diese mit den anti-chCD138 Antikörpern zu färben um darstellen zu können, ob die angefärbten Zellen die Morphologie von Plasmazellen aufweisen. Eine andere Möglichkeit wäre noch von anderen Organen von denen beim Huhn bekannt ist, dass sie Plasmazellen enthalten, wie dem Darm oder der Haderschen Drüse immunhistologische Schnitte mit diesen Antikörpern zu färben, um zu sehen welche Zellen die anti-chD138 Antikörper in diesen Organen erkennen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten und neu generierten Markern nun verschiedene Subpopulationen von Hühner B-Zellen angesprochen werden können. Dies ermöglicht eine weiterführende Untersuchung der B-Zellen beim Huhn, die essentiell ist um die Abläufe im aviären Immunsystem von Grund auf zu verstehen.

## 7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Marker für Hühner B-Zellen zu finden, mit denen es möglich ist, verschiedene B-Zellsubpopulationen anzusprechen. Hierzu wurden zum einen bereits vorhandene Marker (anti-CHIR-B2, anti-CHIR-AB1, 4A5, 28-4 und Antikörper gegen CD15 und CD15s) auf ihre Expression auf B-Zellen hin untersucht, zum anderen wurden neue Antikörper generiert.

Bei der Charakterisierung der bereits vorhandenen Marker zeigte sich, dass die Expression des von 4A5 erkannten Antigens zeitlich mit der Expression des B-Zell-Rezeptors übereinstimmt. Dagegen erlaubt der Einsatz von anti-CHIR-B2, anti-CHIR-AB1, und 28-4 Antikörpern, aktivierte und nicht aktivierte B-Zellen zu unterscheiden. Mit Hilfe der Antikörper gegen CD15 und CD15s konnte die sich verändernde Expression dieser Antigene auf sich entwickelnden B-Zellen in embryonaler Milz und Bursa verfolgt werden. So sind neu in die Bursa immigrierte B-Zellen CD15s<sup>+</sup>, während B-Zellen, die begonnen haben den Prozess der Genkonversion zu durchlaufen CD15<sup>+</sup> sind. Nach Emigration aus der Bursa exprimiert nur eine sehr kleine Subpopulation der B-Zellen CD15 oder CD15s. Möglicherweise handelt es sich bei den CD15<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut um die B-Zellen, die gerade aus der Bursa ausgewandert sind, während die CD15<sup>+</sup> Zellen in der Milz aktivierte B-Zellen sein könnten.

Für die Generierung neuer Antikörper gegen Hühner B-Zellen wurden zwei Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden Antikörper gegen Bursa-Lymphozyten generiert. Nach umfangreichen Tests von einer Vielzahl erhaltener Klone wurden letztendlich sechs interessante Klone ausgewählt, die auf embryonalen Organen und in immunhistologischen Färbungen auf Bursa- und Milzschnitten weiter charakterisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass es sich bei dem monoklonalen Antikörper 6E7 um einen Pan-B-Zell-Marker handelt, der schon ab dem präbursalen B-Zellstadium alle B-Zellen erkennt. Ein weiterer Klon (20C4) reagierte zwar mit allen Leukozyten, färbte aber in der Histologie bislang unbekannte gefäßähnliche Strukturen in der Medulla der Bursafollikel an. Die vier anderen Antikörper (2C10, 5F3, 10C12 und 14C4) erkannten jeweils eine mehr oder weniger große Subpopulation der B-Zellen in den verschiedenen Organen. Bei den von 5F3 erkannten B-Zellen handelt es sich dabei möglicherweise um aktivierte B-Zellen. Während sich die von

2C10 erkannten B-Zellen auf Follikelcortex und -medulla verteilen, zeigte die Histologie interessanterweise, dass mit 14C4 in der Bursa nur B-Zellen in der Medulla angefärbt wurden, womit dieser Antikörper eine Unterscheidung zwischen medullären und cortikalen B-Zellen ermöglicht.

Da CD138 beim Mensch ein viel verwendeter Plasmazellmarker ist, wurden in einem zweiten Ansatz Antikörper gegen das CD138 Molekül des Huhns generiert und durchflusszytometrisch sowie histologisch charakterisiert. Dabei war in der Durchflusszytometrie in allen untersuchten Organen nur ein sehr kleiner Prozentsatz der Zellen positiv, wobei es nicht möglich war eine definierte Zellpopulation anzusprechen. Die in der Immunhistologie auf Milz und Caecaltonsillen beobachteten Färbemuster der anti-chCD138 Antikörper weisen darauf hin, dass CD138 neben epithelialen Strukturen auch beim Huhn auf Plasmazellen exprimiert wird. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um die Eignung von CD138 als Plasmazellmarker beim Huhn endgültig zu bewerten.

Die im Rahmen in dieser Arbeit generierten und charakterisierten Marker für Hühner B-Zellen ermöglichen es nun, verschiedene Subpopulationen von B-Zellen anzusprechen, und damit weiterführende Untersuchungen von B-Zellsubpopulationen durchzuführen.

## 8 Summary

### Generation and characterization of new chicken B-cell markers

The aim of this study was to develop and characterize new markers for chicken B-cells in order to identify different B-cell subpopulations. Therefore, available antibodies (anti-CHIR-B2, anti-CHIR-AB1, 4A5, 28-4, anti-CD15 and anti-CD15s) were tested for their staining patterns on B-cells and new antibodies were generated and characterized.

Detailed examination of the available antibodies showed that positive staining for 4A5 parallels B cell receptor expression, while anti-CHIR-B2, anti-CHIR-AB1 and mab 28-4 allow for the discrimination of activated and not activated cells. Staining with antibodies against CD15 and CD15s revealed a changing expression pattern of these antigens on developing B-cells. Shortly after immigration into the Bursa, B-cells are CD15s<sup>+</sup>, while cells which undergo gene conversion do express CD15. After emigration from the Bursa only a small subpopulation of B-cells expresses CD15 or CD15s, possibly representing recent bursal emigrants or activated cells.

To obtain new markers for chicken B-cells two approaches were applied. First we generated antibodies against bursal lymphocytes. After extensive screening, six hybridomas were selected for further characterization by flow cytometry and immunohistology. These studies revealed that 6E7 is a pan-B-cell marker, already reacting with prebursal B-cells from the embryonic spleen. Clone 20C4 stains all leukocytes, but in addition recognizes so far unknown vessel-like structures in the medulla of bursal B-cell follicles. 2C10, 5F3, 10C12 and 14C4 each recognize a larger or smaller subpopulation of B-cells from different organs, where the small population of cells which is stained by 5F3 could possibly represent activated B-cells. 2C10 positive cells are distributed in the follicle cortex and medulla, while 10C12 and 14C4 positive cells are solely located in the medulla and hence allow the discrimination between cortical and medullary bursal B-cells.

Since CD138 is a frequently used marker for plasma cells in humans, we also generated antibodies against the chicken CD138 molecule. Flow cytometric evaluation of the hybridomas on leukocytes from different tissues revealed indeed a small number of positive cells, but it was not possible to identify a defined CD138 positive subpopulation. The immunohistological staining pattern on sections from spleen and caecal tonsil

suggested that in chickens like in mice CD138 is expressed on plasma cells but also on additional cell populations like epithelial cells. Hence further investigations are necessary to finally decide whether CD138 qualifies as a chicken plasma cell marker.

In summary, this study characterized new markers for chicken B-cells, which now allow addressing different B-cell subpopulations and facilitates a more specific examination of these cells.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production*. *Poult Sci*, 1956. **35**(1): p. 224-225.
2. Edelman, G.M., *ANTIBODY STRUCTURE AND MOLECULAR IMMUNOLOGY\**. *Ann N Y Acad Sci*, 1971. **190**(1): p. 5-25.
3. Han, W., et al., *Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution*. *Biochemistry*, 1995. **34**(26): p. 8215-8220.
4. Davies, D.R. and H. Metzger, *Structural basis of antibody function*. *Annu Rev Immunol*, 1983. **1**(1): p. 87-115.
5. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *Early events in B cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 185-210.
6. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, *Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation*. *Immunologic research*, 2001. **24**(2): p. 97-109.
7. Baumgarth, N., *A two-phase model of B-cell activation*. *Immunol Rev*, 2000. **176**: p. 171-80.
8. Parker, D.C., *T cell-dependent B cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**(1): p. 331-360.
9. Fagarasan, S. and T. Honjo, *T-Independent immune response: new aspects of B cell biology*. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 89.
10. Liu, Y.J., et al., *Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2*. *Immunity*, 1995. **2**(3): p. 239-48.
11. Brandtzaeg, P., *Role of secretory antibodies in the defence against infections*. *International journal of medical microbiology*, 2003. **293**(1): p. 3-15.
12. Cooper, N.R., *The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component*. *Advances in immunology*, 1985. **37**: p. 151-216.
13. Flanagan, J. and T. Rabbitts, *Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing  $\gamma$ , &epsi; and  $\alpha$  genes*. 1982.
14. Shimizu, A., et al., *Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain*. *Cell*, 1982. **28**(3): p. 499-506.
15. Karakawa, W., et al., *Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes*. *Infect Immun*, 1988. **56**(5): p. 1090.

16. Mostov, K.E., *Transepithelial transport of immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**(1): p. 63-84.
17. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. 1996.
18. Nunez, C., et al., *B cells are generated throughout life in humans*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 866-72.
19. Alt, F.W., T.K. Blackwell, and G.D. Yancopoulos, *Development of the primary antibody repertoire*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1079.
20. Akashi, K., et al. *Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors*. 1999. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. Jacobsen, K., et al., *Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice*. Blood, 1996. **87**(1): p. 73.
22. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-638.
23. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements*. Cell, 1994. **79**(5): p. 885-92.
24. Lin, H. and R. Grosschedl, *Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 263-267.
25. Barberis, A., et al., *A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation*. Genes Dev, 1990. **4**(5): p. 849.
26. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's immunobiology*. Vol. 7. 2008: Garland Science.
27. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V (D) J recombination*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1517.
28. McBlane, J.F., et al., *Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps*. Cell, 1995. **83**(3): p. 387-95.
29. Roth, D.B., T. Lindahl, and M. Gellert, *Repair and recombination. How to make ends meet*. Curr Biol, 1995. **5**(5): p. 496-9.
30. Ehlich, A., et al., *Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development*. Cell, 1993. **72**(5): p. 695-704.
31. Karasuyama, H., A. Kudo, and F. Melchers, *The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 969.
32. Wienands, J. and N. Engels, *Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(6): p. 679-96.

33. Ehlich, A., et al., *Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells*. Current Biology, 1994. **4**(7): p. 573-583.
34. Karasuyama, H., A. Rolink, and F. Melchers, *Surrogate light chain in B cell development*. Advances in immunology, 1996. **63**: p. 1-41.
35. Grawunder, U., et al., *Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 601-608.
36. Hardy, R., et al., *Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1213-1225.
37. Osmond, D.G., *Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(2): p. 179-85.
38. Allman, D.M., et al., *Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4431-44.
39. Forster, I. and K. Rajewsky, *The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4781-4.
40. Buckton, K.E. and M.C. Pike, *TIME CULTURE. AN IMPORTANT VARIABLE IN STUDYING IN VIVO RADIATION-INDUCED CHROMOSOME DAMAGE IN MAN*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1964. **8**: p. 439-52.
41. Cornall, R.J., C.C. Goodnow, and J.G. Cyster, *The regulation of self-reactive B cells*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(6): p. 804-811.
42. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, *Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1009-1020.
43. Nossal, G.J.V., *B-cell selection and tolerance*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(2): p. 193-198.
44. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe, *Transitional B cells: step by step towards immune competence*. Trends in immunology, 2003. **24**(6): p. 342-348.
45. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu. Rev. Immunol., 2005. **23**: p. 161-196.
46. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
47. 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. 413-419.
48. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-620.



49. Kraal, G., *Cells in the marginal zone of the spleen*. Int Rev Cytol, 1992. **132**: p. 31-74.
50. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
51. Snapper, C.M., et al., *Comparative in vitro analysis of proliferation, Ig secretion, and Ig class switching by murine marginal zone and follicular B cells*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2737-45.
52. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, *Maturation of the immune response in germinal centers*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1121-9.
53. Tew, J.G., et al., *Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells*. Immunol Rev, 1997. **156**(1): p. 39-52.
54. Kalled, S.L., C. Ambrose, and Y.M. Hsu, *The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors*. Curr Dir Autoimmun, 2005. **8**: p. 206-42.
55. Monroe, J.G., *ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 283-94.
56. Förster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
57. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-99.
58. Gatto, D., et al., *Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EB12 shapes humoral immune responses*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 259-269.
59. Pereira, J.P., et al., *EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1122-1126.
60. 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.
61. MacLennan, I.C.M., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**(1): p. 117-139.
62. 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.
63. Allen, C.D.C., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-952.
64. Gordon, J. and J. Pound, *Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues*. Immunology, 2000. **100**(3): p. 269-280.
65. Manser, T., *Textbook germinal centers?* The Journal of Immunology, 2004. **172**(6): p. 3369.

66. Kim, C.H., et al., *Unique gene expression program of human germinal center T helper cells*. Blood, 2004. **104**(7): p. 1952-1960.
67. Spolski, R. and W.J. Leonard, *IL-21 and T follicular helper cells*. Int Immunol, 2010. **22**(1): p. 7.
68. Barrington, R.A., et al., *B Lymphocyte Memory*. J Exp Med, 2002. **196**(9): p. 1189.
69. Pech, M., et al., *Differences between germ-line and rearranged immunoglobulin V kappa coding sequences suggest a localized mutation mechanism*. Nature, 1981. **291**(5817): p. 668-70.
70. Lebecque, S.G. and P.J. Gearhart, *Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1717-27.
71. Weiss, U., R. Zobelein, and K. Rajewsky, *Accumulation of somatic mutants in the B cell compartment after primary immunization with a T cell-dependent antigen*. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 511-7.
72. Pascual, V., et al., *Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 329-39.
73. Liu, Y.J., et al., *Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis*. Eur J Immunol, 1991. **21**(8): p. 1905-10.
74. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
75. Feuillard, J., et al., *Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching*. Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 121-30.
76. Rabbitts, T., et al., *The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch*. 1980.
77. Abney, E.R., et al., *Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity*. The Journal of Immunology, 1978. **120**(6): p. 2041.
78. Goding, J.W., D.W. Scott, and J.E. Layton, *Genetics, cellular expression and function of IgD and IgM receptors*. Immunol Rev, 1977. **37**(1): p. 152-180.
79. Esser, C. and A. Radbruch, *Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 717-35.
80. Hocart, M.J., J.S. Mackenzie, and G.A. Stewart, *The IgG subclass responses to influenza virus haemagglutinin in the mouse: effect of route of inoculation*. Journal of general virology, 1989. **70**(4): p. 809.
81. Coutelier, J.P., et al., *IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 64-69.

82. Jarrett, E. and H. Miller, *Production and activities of IgE in helminth infection*. Progress in allergy, 1982. **31**: p. 178.
83. Schittek, B. and K. Rajewsky, *Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors*. Nature, 1990. **346**(6286): p. 749-51.
84. Hayakawa, K., et al., *Isolation of high-affinity memory B cells: phycoerythrin as a probe for antigen-binding cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1379-83.
85. Siekevitz, M., et al., *Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses*. Cell, 1987. **48**(5): p. 757-70.
86. Berek, C. and C. Milstein, *The dynamic nature of the antibody repertoire*. Immunol Rev, 1988. **105**: p. 5-26.
87. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 140-59.
88. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. Immunol Rev, 2004. **197**(1): p. 192-205.
89. Oliver, A.M., et al., *Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2366-2374.
90. 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.
91. Smith, K.G.C., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-448.
92. 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.
93. Macpherson, A.J., et al., *IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms*. Microbes and infection, 2001. **3**(12): p. 1021-1035.
94. Ciriaco, E., et al., *Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. Microsc Res Tech, 2003. **62**(6): p. 482-7.
95. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. Eur J Immunol, 1973. **3**(9): p. 585-95.
96. Sayegh, C.E., et al., *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 187-200.
97. Moore, M.A. and J.J. Owen, *Experimental studies on the development of the bursa of Fabricius*. Dev Biol, 1966. **14**(1): p. 40-51.

98. Masteller, E.L., et al., *Avian B cell development*. International reviews of immunology, 1997. **15**(3-4): p. 185-206.
99. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. Dev Biol, 1976. **53**(2): p. 250-64.
100. Pink, J.R., O. Vainio, and A.M. Rijnbeek, *Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1985. **15**(1): p. 83-7.
101. Olah, I. and B. Glick, *The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius*. Poult Sci, 1978. **57**(5): p. 1445-50.
102. Grossi, C.E., P.M. Lydyard, and M.D. Cooper, *B-cell ontogeny in the chicken*. Ann Immunol (Paris), 1976. **127**(6): p. 931-41.
103. 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. 304-312.
104. Glick, B., *The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis*. International review of cytology, 1977. **48**: p. 345-402.
105. Dieterlen-Lievre, F. and C. Martin, *Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development*. Dev Biol, 1981. **88**(1): p. 180-191.
106. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio, *Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo*. J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 397-406.
107. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
108. Mansikka, A., et al., *Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9416-20.
109. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-847.
110. Benatar, T., L. Tkalec, and M. Ratcliffe, *Stochastic rearrangement of immunoglobulin variable-region genes in chicken B-cell development*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(16): p. 7615.
111. Ratcliffe, M.J.H., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Developmental & Comparative Immunology, 2006. **30**(1-2): p. 101-118.
112. Pike, K.A. and M.J.H. Ratcliffe. *Cell surface immunoglobulin receptors in B cell development*. 2002. Elsevier.
113. Kohonen, P., K.P. Nera, and O. Lassila, *Avian model for B-cell immunology--new genomes and phylotranscriptomics*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 113-21.

114. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
115. Reynaud, C.A., A. Dahan, and J.C. Weill, *Complete sequence of a chicken lambda light chain immunoglobulin derived from the nucleotide sequence of its mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(13): p. 4099-103.
116. 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.
117. 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. 2661-2670.
118. Le Douarin, N.M., et al., *Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(7): p. 2701-5.
119. Ratcliffe, M.J., et al., *Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 129-33.
120. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
121. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
122. Sayegh, C.E., G. Drury, and M.J. Ratcliffe, *Efficient antibody diversification by gene conversion in vivo in the absence of selection for V(D)J-encoded determinants*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6319-28.
123. Motyka, B. and J.D. Reynolds, *Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection*. Eur J Immunol, 1991. **21**(8): p. 1951-1958.
124. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-958.
125. Paramithiotis, E., K.A. Jacobsen, and M.J. Ratcliffe, *Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 105-13.
126. 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.
127. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
128. Pink, J.R., M.J. Ratcliffe, and O. Vainio, *Immunoglobulin-bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes*. Eur J Immunol, 1985. **15**(6): p. 617-20.

129. Vainio, O., M.K. Viljanen, and A. Toivanen, *Early ontogeny of germinal center formation in the chicken I*. *Developmental & Comparative Immunology*, 1978. **2**(3): p. 493-504.
130. 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.
131. Durkin, H., G. Theis, and G. Thorbecke, *Bursa of Fabricius as site of origin of germinal centre cells*. *Nature*, 1972. **235**(56): p. 118-119.
132. 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*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003. **27**(2): p. 159-166.
133. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. *EMBO J*, 1996. **15**(10): p. 2540.
134. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. *The Journal of Immunology*, 1998. **160**(9): p. 4232.
135. Jeurissen, S., E. Claassen, and E. Janse, *Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen*. *Immunology*, 1992. **77**(1): p. 75.
136. Jeurissen, S.H.M., et al., *Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens*. *Cell Tissue Res*, 1989. **258**(1): p. 119-124.
137. Hudson, L., *Immunoglobulin-bearing lymphocytes of the chicken. I. Heavy chain immunoglobulin commitment and organ distribution*. *Eur J Immunol*, 1975. **5**(10): p. 694-8.
138. Nutt, S.L., et al., *Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus*. *Genes Dev*, 1997. **11**(4): p. 476.
139. Oliver, A.M., F. Martin, and J.F. Kearney, *Mouse CD38 is down-regulated on germinal center B cells and mature plasma cells*. *J Immunol*, 1997. **158**(3): p. 1108-15.
140. Tedder, T.F., L.J. Zhou, and P. Engel, *The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes*. *Immunology Today*, 1994. **15**(9): p. 437-442.
141. Tedder, T.F., L.T. Clement, and M. Cooper, *Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody*. *The Journal of Immunology*, 1984. **133**(2): p. 678.
142. Matsumoto, A., et al., *Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes*. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1407.
143. Dempsey, P.W., et al., *C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity*. *Science*, 1996. **271**(5247): p. 348.

144. Tedder, T.F. and C.M. Isaacs, *Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily*. The Journal of Immunology, 1989. **143**(2): p. 712.
145. Wolf, M., et al., *Functional effect of IL-7-enhanced CD19 expression on human B cell precursors*. The Journal of Immunology, 1993. **151**(1): p. 138.
146. Krop, I., et al., *The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(1): p. 48.
147. Otero, D.C. and R.C. Rickert, *CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(11): p. 5921.
148. Del Nagro, C.J., et al., *CD19 function in central and peripheral B-cell development*. Immunol Res, 2005. **31**(2): p. 119-31.
149. Fischer, E., C. Delibrias, and M.D. Kazatchkine, *Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes*. J Immunol, 1991. **146**(3): p. 865-9.
150. Carroll, M.C., *CD21/CD35 in B cell activation*. Semin Immunol, 1998. **10**(4): p. 279-86.
151. Camerini, D., et al., *The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family*. The Journal of Immunology, 1991. **147**(9): p. 3165.
152. Agematsu, K., et al., *CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2825-2829.
153. Jacquot, S., et al., *CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling*. The Journal of Immunology, 1997. **159**(6): p. 2652.
154. Maurer, D., et al., *CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1990. **20**(12): p. 2679-84.
155. Agematsu, K., et al., *CD27: a memory B-cell marker*. Immunology Today, 2000. **21**(5): p. 204-206.
156. Maurer, D., et al., *IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset*. The Journal of Immunology, 1992. **148**(12): p. 3700.
157. Black, S.J., et al., *Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells*. J Exp Med, 1978. **147**(4): p. 984-96.
158. Monroe, J.G., W.L. Havran, and J.C. Cambier, *B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD but not IgM*. Eur J Immunol, 1983. **13**(3): p. 208-13.

159. Vitetta, E.S. and J.W. Uhr, *Cell surface immunoglobulin. XV. The presence of IgM and an IgD-like molecule on the same cell in murine lymphoid tissue.* Eur J Immunol, 1976. **6**(2): p. 140-3.
160. Gordon, J., *CD23 and B cell activation.* Clin Exp Allergy, 1992. **22**(2): p. 199-204.
161. Bonnefoy, J.Y., et al., *CD23 and B-cell activation.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 355-9.
162. Punnonen, J., et al., *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(8): p. 3730.
163. Lee, C., S. Yoon, and K. Pyun, *Mechanism of interferon-gamma down-regulation of the interleukin 4-induced CD23/Fc epsilon RII expression in human B cells: post-transcriptional modulation by interferon-gamma.* Mol Immunol, 1993. **30**(3): p. 301.
164. Aubry, J.P., et al., *CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production.* 1992.
165. Björck, P., et al., *CD23 and CD21 function as adhesion molecules in homotypic aggregation of human B lymphocytes.* Eur J Immunol, 1993. **23**(8): p. 1771-1775.
166. Jackson, D.G. and J.I. Bell, *Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation.* J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2811-5.
167. Funaro, A., et al., *Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids.* Int Immunol, 1996. **8**(11): p. 1643-50.
168. Howard, M., et al., *Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38.* Science, 1993. **262**(5136): p. 1056-9.
169. Yamashita, Y., et al., *A monoclonal antibody against a murine CD38 homologue delivers a signal to B cells for prolongation of survival and protection against apoptosis in vitro: unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells.* Immunology, 1995. **85**(2): p. 248-55.
170. Funaro, A., et al., *Schematic portrait of human CD38 and related molecules.* 2000.
171. Funaro, A., et al., *Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation.* J Immunol, 1990. **145**(8): p. 2390-6.
172. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**(1): p. 111-135.
173. Mach, F., et al., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(5): p. 1931.



174. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
175. Spriggs, M., et al., *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1543-1550.
176. Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Advances in immunology, 1996. **61**: p. 1-77.
177. Randall, T.D., et al., *Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 733-742.
178. Koda, J.E., A. Rapraeger, and M. Bernfield, *Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens*. Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(13): p. 8157.
179. Elenius, K., et al., *Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(29): p. 17837-17843.
180. Sun, X., D. Mosher, and A. Rapraeger, *Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(5): p. 2885.
181. Hayashi, K., et al., *Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1987. **35**(10): p. 1079.
182. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. Cell regulation, 1989. **1**(1): p. 27.
183. Wijdenes, J., et al., *A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1*. British journal of haematology, 1996. **94**(2): p. 318-323.
184. Costes, V., et al., *The Mi15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens*. Human pathology, 1999. **30**(12): p. 1405-1411.
185. Gilmour, D.G., et al., *Bu-1 and Th-1, two loci determining surface antigens of B or T lymphocytes in the chicken*. Immunogenetics, 1976. **3**(1): p. 549-563.
186. 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.
187. Houssaint, E., E. Diez, and J.R. Pink, *Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen*. Immunology, 1987. **62**(3): p. 463-70.
188. VEROMAA, T., et al., *Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens*. Hybridoma, 1988. **7**(1): p. 41-48.

189. Funk, P.E., et al., *The avian chB6 (Bu-1) alloantigen can mediate rapid cell death.* J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1695-702.
190. Tregaskes, C.A., et al., *Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure.* Immunogenetics, 1996. **44**(3): p. 212-7.
191. Pink, J.R. and A.M. RIJNBEEK, *Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens.* Hybridoma, 1983. **2**(3): p. 287-296.
192. Houssaint, E., O. Lassila, and O. Vainio, *Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos.* Eur J Immunol, 1989. **19**(2): p. 239-43.
193. Veromaa, T., et al., *Expression of B-L and Bu-1 antigens in chickens bursectomized at 60 h of incubation.* Eur J Immunol, 1988. **18**(2): p. 225-30.
194. Varki, A., *Selectin ligands.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7390.
195. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell, 1994. **76**(2): p. 301.
196. Masteller, E.L., et al., *Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis.* Development, 1995. **121**(6): p. 1657-67.
197. Palojoki, E., S. Jalkanen, and P. Toivanen, *Sialyl LewisX carbohydrate is expressed differentially during avian lymphoid cell development.* Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2544-50.
198. Masteller, E.L., et al., *Expression of sialyl Lewis (x) and Lewis (x) defines distinct stages of chicken B cell maturation.* The Journal of Immunology, 1995. **155**(12): p. 5550.
199. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture.* Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1015-26.
200. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate.* Developmental & Comparative Immunology, 2005. **29**(4): p. 361-374.
201. Vainio, O., et al., *Characterization of two monoclonal antibodies against chicken T lymphocyte surface antigens.* Prog Clin Biol Res, 1987. **238**: p. 99-108.
202. Lampisuo, M., et al., *Intraembryonic haemopoietic cells and early T cell development.* Scand J Immunol, 1995. **41**(1): p. 65-9.
203. Lampisuo, M., et al., *Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius.* Scand J Immunol, 1998. **47**(3): p. 223-228.
204. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**(1): p. 233-258.

205. Lee, S.H., et al., *Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD80*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2011. **34**(3): p. 273-9.
206. Schumacher, M., *Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L, IL-6 und IL-10 auf die terminale Differenzierung der B-Lymphozyten des Haushuhns*, 2010, Ludwig-Maximilians-Universität München.
207. Peault, B., et al., *Phylogenetically conserved antigen on nerve cells and lymphocytes resembles myelin-associated glycoprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(3): p. 814.
208. Schuller-Petrovic, S., et al., *A shared antigenic determinant between natural killer cells and nervous tissue*. 1983.
209. Postigo, A., et al., *B lymphocyte binding to E-and P-selectins is mediated through the de novo expression of carbohydrates on in vitro and in vivo activated human B cells*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(4): p. 1585.
210. Hennig, A.K., D. Mangoura, and N.B. Schwartz, *Large chondroitin sulfate proteoglycans of developing chick CNS are expressed in cerebral hemisphere neuronal cultures*. Brain Res Dev Brain Res, 1993. **73**(2): p. 261-72.
211. 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.
212. Erhard, M., 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. 302-310.
213. Lydyard, P.M., C.E. Grossi, and M.D. Cooper, *Ontogeny of B cells in the chicken. I. Sequential development of clonal diversity in the bursa*. J Exp Med, 1976. **144**(1): p. 79-97.
214. Chen, C.L., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper, *Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes*. J Immunol, 1982. **129**(6): p. 2580-5.
215. Graham, F., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of general virology, 1977. **36**(1): p. 59.
216. DuBridg, R., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379.
217. Shulman, M., C. Wilde, and G. Köhler, *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. 1978.
218. Viertlboeck, B.C., et al., *Chicken Ig-like receptor B2, a member of a multigene family, is mainly expressed on B lymphocytes, recruits both Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and inhibits proliferation*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7385-93.

219. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11718-23.
220. Gobel, T.W., B. Kaspers, and M. Stangassinger, *NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken*. Int Immunol, 2001. **13**(6): p. 757-62.
221. Glick, B., *The ontogeny and microenvironment of the avian thymus and bursa of Fabricius: contribution of specialized cells to the avian immune response*. Adv Vet Sci Comp Med, 1985. **30**: p. 67-90.
222. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
223. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. Cell, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
224. Becker, R.S. and K.L. Knight, *Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits*. Cell, 1990. **63**(5): p. 987-997.
225. 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.
226. Sorvari, R. and T. Sorvari, *Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ: Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological*. Immunology, 1977. **32**(4): p. 499.
227. Ekino, S., K. Matsuno, and M. Kotani, *Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii*. Lymphology, 1979. **12**(4): p. 247.
228. Ekino, S., *Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage*. Eur J Immunol, 1993. **23**(3): p. 772-775.
229. Houssaint, E., A. Torano, and J. Ivanyi, *Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1983. **13**(7): p. 590-5.
230. Reynolds, J.D., *Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo*. Eur J Immunol, 1987. **17**(4): p. 503-507.
231. O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus, *CD138 (Syndecan-1), a plasma cell marker*. American Journal of Clinical Pathology, 2004. **121**(2): p. 254-263.
232. Minges Wols, H.A. and P.L. Witte, *Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach*. J Immunol Methods, 2008. **329**(1-2): p. 219-224.
233. Jeurissen, S., L. Vervelde, and M. Janse, *Structure and function of lymphoid tissues of the chicken*. Poultry science reviews, 1993. **5**(3): p. 183-207.

## 10 Anhang

### Verwendete Chemikalien und Reagenzien

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

- 1 Applichem, Darmstadt
- 2 Biochrom, Berlin
- 3 Ratiopharm, Ulm
- 4 Invitrogen, Karlsruhe
- 5 Bio&Sell, Nürnberg
- 6 Sigma, Deisenhofen
- 7 ThermoFisher Scientific, St. Leon-Rot
- 8 Biotrend, Köln
- 9 Solis BioDyne, Tartur, Estland
- 10 MWG Biotech, Ebersberg
- 11 Roth, Karlsruhe
- 12 Promega, Mannheim
- 13 Roche, Grenzach-Wyhlen
- 14 Southern Biotechnology Association, Inc., Birmingham/USA
- 15 Jackson, Baltimore, USA
- 16 Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
- 17 Polysciences, Eppelheim
- 18 Air Liquide, Düsseldorf
- 19 Neolab, Heidelberg
- 20 Linaris, Wertheim-Bettingen
- 21 CLN, Freising
- 22 Medite, Burgdorf
- 23 Macherey-Nagel, Düren
- 24 BD, Heidelberg
- 25 Nunc, Wiesbaden

**Geräte in alphabetischer Reihenfolge:**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Abzug	Airflow Control	Arge
Brutschrank	TV-300	Memmert,Schwabach
Brutschrank für Zellkultur	SNW300 TVBB	Nunc, Wiesbaden
Durchflusszytometer	FACS CantoII Software: FACS Diva, Flow Jo	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA Washer	Atlantis 2	Asys, Dornstadt
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, München
Gel Dokumentation	Image Quant 300 Software:Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Kryotom	HM500 OM	Thermo Scientific, Walldorf
Mikroskop	Axiovert 25 HBO-50/AC	Zeiss, Jena
Mikroskop	Axioskop Kamera: AxioCam MRc5 Software: Axiovision Rel.4.8	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac Basic	BioRad, München
Sicherheitswerkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	MJ Mini	BioRad, München
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Köln
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	GS-6GR	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	5810R	Eppendorf, Köln

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stets freundliche und hervorragende fachliche Betreuung. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Sonja Haertle für ihre ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und dafür, dass sie sich für Fragen aller Art stets Zeit nahm. Ihnen beiden ist das Gelingen dieser Arbeit durch ihre kollegiale Zusammenarbeit und die fachliche Kompetenz zu verdanken.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangssinger möchte ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Sinowatz und Silvia Mitterer danke ich für die Möglichkeit im Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie Gefrierschnitteschnitte für die Histologie anfertigen zu können.

Bei Marina Kohn, Beatrice Schaerer und Ingrid Riel möchte ich mich ganz herzlich für die große Hilfsbereitschaft, die technische Unterstützung und für das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Frau Crass, Frau Mayer und Frau Summer danke ich für ihre Unterstützung in allen Verwaltungsangelegenheiten.

Auch bei der Rechnerbetriebsgruppe möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass ich bei allen auftretenden Computerproblemen stets auf ihre Hilfe zählen konnte.

Bei Florian Busalt, Julia Schermuly und Susanne Röhl möchte ich mich an dieser Stelle für die gemeinsamen Kaffee-Pausen, Bootsfahrten und die immer wieder auf's Neue spannenden Gesprächsthemen bedanken. Außerdem danke ich euch für die stete Hilfsbereitschaft in allen Laborangelegenheiten. Auch den anderen Doktoranden am Institut danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Meiner Familie danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung während des Studiums und während der Promotionszeit und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vorallem bei meiner Schwester Anna möchte ich mich bedanken, ohne dich wäre ich heute nicht da, wo ich bin.

Brigitte Schlammer danke ich für ihre Freundschaft und für ihre Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Kathrin Busch, Janis Beer und Birke Steinbach bedanken, danke dass ihr immer für mich da seid, und immer ein offenes Ohr für alle größeren und kleineren Probleme habt.

Ganz besonders danken möchte auch Ursula Brunthaller für das Verständnis, die Unterstützung und die Aufmunterung.