

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

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

**Charakterisierung des Zytokins BAFF  
als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion  
beim Haushuhn**

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

von

**Sonja Kothlow**

aus Wasserburg am Inn

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

1. Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

2. Referent: Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbel

1. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. P. Kölle

2. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Maierl

3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Mansfeld

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Das B-Zellsystem des Haushuhns .....	3
2.1.1	Präbursale B-Zellentwicklung .....	4
2.1.2	Bursale B-Zellentwicklung .....	5
2.1.2.1	Struktur der Bursa .....	5
2.1.2.2	Einwanderung und Expansion der B-Zellen .....	6
2.1.2.3	Generierung des Antikörper-Repertoires durch „gene conversion“ .....	8
2.1.2.4	Perinatale Veränderungen in der Bursa .....	10
2.1.2.5	Apoptose in der Bursa .....	11
2.1.2.6	Emigration von B-Zellen aus der Bursa .....	12
2.1.3	Postbursale B-Zellentwicklung .....	14
2.1.3.1	Periphere lymphatische Organe .....	14
2.1.3.2	Postbursale Diversifizierung .....	15
2.1.4	Immunglobulinklassen .....	16
2.1.5	Zytokine .....	16
2.2	BAFF – B cell activating factor belonging to the TNF family .....	18
2.2.1	Die TNF-Familie .....	18
2.2.2	BAFF-Struktur .....	19
2.2.3	BAFF-Rezeptoren .....	21
2.2.4	BAFF-R Signaltransduktion .....	22
2.2.5	BAFF als B-Zell Überlebensfaktor .....	24
2.2.5.1	Stadien der B-Zellreifung bei Mensch und Maus .....	24
2.2.5.2	BAFF in der B-Zellentwicklung .....	26
2.2.5.3	BAFF in der Immunantwort .....	27
2.2.6	BAFF und BAFF-R-Expression .....	29
2.2.7	BAFF und periphere Toleranz .....	31
2.2.8	TACI als inhibitorischer BAFF-Rezeptor .....	33
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
4.1	Tiere und Tierhaltung .....	35
4.1.1	Hühner .....	35
4.1.2	Kaninchen .....	35
4.2	Gewinnung von primären Hühnerleukozyten .....	35
4.2.1	Material .....	35
4.2.2	Gewinnung von peripheren Blutleukozyten ( <i>PBL</i> ) .....	36
4.2.3	Gewinnung von Leukozyten aus Organen .....	36
4.3	Kultivierung von Zellen .....	37
4.3.1	Zellkulturmedien und Zusätze .....	37
4.3.2	Verwendete Zelllinien .....	38
4.3.3	Kultivierung von Zellen .....	38
4.3.4	Einfrieren von Zellen .....	38

---

4.3.5	Auftauen von Zellen.....	38
4.3.6	Herstellung von ConA stimulierten Leukozyten (ConA-Blasten).....	39
4.4	Klonierung von chBAFF cDNA .....	39
4.5	RNA-Präparation.....	39
4.5.1	Material .....	39
4.5.2	Durchführung .....	40
4.6	Northern Blot.....	41
4.6.1	Herstellung radioaktiv markierter Sonden mittels „Random-Priming“ .....	41
4.6.1.1	Material .....	41
4.6.1.2	Durchführung .....	41
4.6.2	Elektrophorese und Transfer der RNA.....	41
4.6.2.1	Material .....	41
4.6.2.2	Durchführung .....	43
4.6.3	Hybridisierung.....	43
4.6.3.1	Material .....	43
4.6.3.2	Durchführung .....	44
4.7	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	45
4.7.1	Synthese der <sup>33</sup> P markierten RNA-Sonde .....	45
4.7.1.1	Material .....	45
4.7.1.2	Durchführung .....	45
4.7.2	Hybridisierung und Entwicklung.....	46
4.7.2.1	Material .....	46
4.7.2.2	Durchführung .....	48
4.8	Immunhistologie.....	49
4.8.1	Material .....	49
4.8.2	Durchführung .....	50
4.9	Aufreinigung von His-chBAFF über Affinitätschromatographie .....	51
4.9.1	Material .....	51
4.9.2	Reinigung .....	54
4.10	Herstellung von Flag-chBAFF .....	54
4.11	Gewinnung und Reinigung eines polyklonalen Antiserums gegen chBAFF.....	55
4.11.1	Material .....	55
4.11.2	Herstellung eines polyklonalen Antiserums.....	56
4.11.3	Affinitätschromatographie zur Reinigung des Antiserums.....	56
4.12	SDS-PAGE.....	57
4.12.1	Material .....	57
4.12.2	Durchführung .....	58
4.13	Coomassie-Färbung.....	59
4.13.1	Material .....	59
4.13.2	Durchführung .....	59

---

4.14	Western Blot.....	59
4.14.1	Material .....	59
4.14.2	Durchführung .....	60
4.15	ELISA.....	61
4.15.1	Material .....	61
4.15.2	Flag-chBAFF ELISA .....	62
4.15.3	Hühner-Immunglobulin ELISA .....	63
4.16	Durchflusszytometrie .....	63
4.16.1	Material .....	63
4.16.2	Einfachfärbung .....	64
4.16.3	Doppelfärbung.....	66
4.16.4	BCMA-Inhibition .....	66
4.16.5	Lebend/Tot-Färbung.....	66
4.16.6	Fixierung .....	67
4.17	B-Zell-Separation mittels MACS®.....	67
4.17.1	Material .....	67
4.17.2	Durchführung .....	68
4.18	<i>In vitro</i> Funktionstest: Bestimmung der Überlebensrate.....	69
4.18.1	Material .....	69
4.18.2	Durchführung .....	69
4.19	<i>In vitro</i> Funktionstest: Bestimmung der Proliferation.....	70
4.19.1	Material .....	70
4.19.2	Durchführung .....	71
4.20	Nachweis der <i>in vivo</i> Aktivität von chBAFF .....	72
4.20.1	Material .....	72
4.20.2	chBAFF-Substitution .....	72
4.20.3	chBAFF-Neutralisation .....	72
4.21	Statistische Auswertung .....	73
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
5.1	Identifizierung und Klonierung von chBAFF .....	74
5.2	Untersuchung der chBAFF-Expression in verschiedenen Organen.....	75
5.3	Herstellung und Nachweis von rekombinantem chBAFF.....	77
5.3.1	Prokaryotische Expression in <i>E.coli</i> .....	77
5.3.2	Gewinnung eines Kaninchenserums gegen chBAFF .....	78
5.3.3	Eukaryotische Expression in 293T-Zellen .....	79
5.4	Selektive Bindung von chBAFF an B-Zellen .....	81
5.5	Inhibition der chBAFF-Bindung durch humanes BCMA .....	84
5.6	chBAFF-Rezeptoren auf Hühner-Zelllinien.....	85

---

5.7	Ontogenese der chBAFF-Rezeptor(en)-Expression.....	85
5.8	Biologische Aktivität von chBAFF: <i>in vitro</i> Studien.....	89
5.8.1	Wirkung von chBAFF auf B-Zellen der Milz.....	89
5.8.2	Wirkung von chBAFF auf periphere B-Zellen .....	90
5.8.3	Wirkung von chBAFF auf Bursalymphozyten.....	91
5.8.4	Wirkung von chBAFF auf reine B-Zellpräparationen .....	92
5.8.5	ChBAFF induziert keine B-Zellproliferation.....	94
5.9	Biologische Wirkung von chBAFF: <i>in vivo</i> Studien.....	96
5.9.1	Erhöhung der B-Zellzahl in chBAFF behandelten Hühnern.....	96
5.9.2	Erhöhung der IgM-Serumspiegel durch chBAFF .....	99
5.10	<i>in vivo</i> Neutralisation von chBAFF durch huBCMA-Fc .....	100
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
6.1	Charakterisierung von chBAFF .....	108
6.1.1	Identifizierung und Analyse der chBAFF-Sequenz .....	108
6.1.2	Herstellung von rekombinantem chBAFF .....	108
6.1.3	Rezeptoren für chBAFF finden sich exklusiv auf B-Zellen.....	109
6.1.4	ChBAFF-Rezeptor-Ontogenese .....	110
6.1.5	ChBAFF-Expression .....	111
6.2	Untersuchungen zur Funktion von chBAFF .....	112
6.2.1	ChBAFF als Überlebensfaktor für kultivierte B-Zellen.....	113
6.2.2	Beeinflussung der B-Zell-Homöostase durch chBAFF .....	115
6.2.3	Einfluss von chBAFF auf die B-Zellzahl.....	117
6.2.4	Einfluss von chBAFF auf die Antikörperspiegel .....	119
6.2.5	ChBAFF als mögliches Adjuvans .....	121
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Summary.....</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>142</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Aufbau eines Bursafollikels .....	6
Abb. 2.2 Zeitliches Schema der B-Zellentwicklung beim Huhn .....	13
Abb. 2.3 Die Interaktion zwischen BAFF und seinen verschiedenen Rezeptoren .....	22
Abb. 2.4 BAFF-Signaltransduktion über den alternativen Weg der NF $\kappa$ B-Aktivierung.....	23
Abb. 2.5 Stadien der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus .....	25
Abb. 2.6 Die Rolle von BAFF in der peripheren Toleranz und bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.....	32
Abb. 5.1 Vergleich der BAFF-Proteinsequenzen von Huhn, Mensch und Maus. ....	74
Abb. 5.2 chBAFF-Genexpressions-Profil .....	75
Abb. 5.3 in situ Hybridisierung.....	76
Abb. 5.4 SDS-Gel zur Überprüfung der His-chBAFF Aufreinigung .....	77
Abb. 5.5 Western Blot mit gereinigtem Kaninchen anti-chBAFF IgG.....	78
Abb. 5.6 Nachweis von Flag-chBAFF im Western Blot.....	79
Abb. 5.7 Bestimmung des Flag-chBAFF-Gehalts im ELISA.....	80
Abb. 5.8 Bindung von chBAFF an Lymphozyten .....	81
Abb. 5.9 Bindung von chBAFF an B-Zellen .....	82
Abb. 5.10 Vergleich der Bindung von huBAFF, muBAFF und chBAFF .....	83
Abb. 5.11 Inhibition der Flag-chBAFF-Bindung durch huBCMA-Fc.....	84
Abb. 5.12 chBAFF-Bindung an Hühner-B-Zelllinien .....	85
Abb. 5.13 Ontogenese der chBAFF-Rezeptor Expression.....	87
Abb. 5.14 chBAFF erhöht die Frequenz lebender B-Zellen .....	89
Abb. 5.15 Dosis-Abhängigkeit der chBAFF-Wirkung .....	90
Abb. 5.16 chBAFF-Wirkung auf periphere B-Zellpopulationen .....	91
Abb. 5.17 Wirkung von chBAFF auf Lymphozyten der Bursa .....	92
Abb. 5.18 Durchflusszytometrische Überprüfung einer MACS-Präparation .....	93
Abb. 5.19 Kinetik der Wirkung von chBAFF auf positiv sortierte B-Zellen.....	93
Abb. 5.20 CFSE-Färbung von 2D8-Zellen .....	94
Abb. 5.21 ConA-Stimulation von CFSE gefärbten Milzlymphozyten .....	95
Abb. 5.22 Wirkung von chBAFF auf CFSE gefärbte Milzlymphozyten.....	96
Abb. 5.23 Erhöhung der B-Zellfrequenz in chBAFF behandelten Tieren.....	98
Abb. 5.24 Einfluss von chBAFF auf die Immunglobulin-Serumspiegel .....	99

---

Abb. 5.25 Auswirkungen der huBCMA-Fc-Behandlung auf den Immunglobulingehalt des Plasmas.....	102
Abb. 5.26 Reduktion der B-Zellfrequenz durch huBCMA-Fc.....	105
Abb. 5.27 Auswirkungen der huBCMA-Behandlung auf den Immunglobulingehalt des Plasmas.....	106

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 4.1 Im ELISA verwendete Antikörper.....	62
Tab. 4.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie.....	64
Tab. 4.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	65
Tab. 5.1 chBAFF abhängige Erhöhung des Milzgewichts.....	97
Tab. 5.2 Selektive Expansion der B-Zellpopulation von chBAFF behandelten Tieren.....	97
Tab. 5.3 Einfluss der BCMA-Behandlung auf das Gewicht von Milz und Bursa.....	100
Tab. 5.4 Einfluss der BCMA-Behandlung auf die Frequenz von B- und T-Zellen in Milz und Caecaltonsillen.....	101
Tab. 5.5 Einfluss der huBCMA-Fc-Behandlung auf das Gewicht von Milz und Bursa.....	103
Tab. 5.6 Einfluss der BCMA-Behandlung auf die Frequenz von B- und T-Zellen in Milz und Caecaltonsillen.....	104



## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i> )
APRIL	A proliferation inducing ligand
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
BCMA	B cell maturation antigen
BCR	B-Zellrezeptor (engl. <i>B cell receptor</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
CAML	Calcium modulator and cyclophilin ligand
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidy-Ester
ch	chicken
CHS	Hühner Serum (engl. <i>chicken serum</i> )
ConA	ConcanavalinA
CT	Caecaltonsillen
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleid Acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ELISA	Enzym Linked Immunosorbant Assay
EST	Expressed Sequence Tag
ET	Embryonaltag
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FAE	Follikel assoziiertes Epithel
FasL	Fas-Ligand
Fc	Fragment crystallizable
FCA	Freund'sches Komplettes Adjuvans (engl. <i>Freund's Complete Adjuvans</i> )
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FIA	Freund'sches Inkomplettes Adjuvans (engl. <i>Freund's Incomplete Adjuvans</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GALT	Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
GC	Germinales Zentrum (engl. <i>germinal center</i> )
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GPDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
huBAFF	humanes BAFF

---

i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactose
ISC	Ig sezernierende Zelle (engl. <i>Ig secreting cell</i> )
KG	Körpergewicht
LB	Luria Broth Base
LT	Lymphotoxin
MACS	Magnetic Cell Sorting
MALT	Mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> )
MOPS	Morphlinopropansulfonsäure
M <sub>R</sub>	relatives Molekulargewicht
mRNA	Messenger RNA
muBAFF	murines BAFF
MW	Mittelwert
MZ	Marginalzone
NIK	NF $\kappa$ B inducing kinase
NMS	Normal-Mausserum
PBL	Periphere Blut Leukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PIPES	1,4 Piperazindiethansulfonsäure
PMA	Phorbol Myristat Acetat
POD	Meerrettich-Peroxidase
RNA	Ribonucleinsäure (engl. <i>Ribonucleid Acid</i> )
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SA-PE	Streptavidin-PE
SD	Standardabweichung (engl. <i>Standard deviation</i> )
SDS	Natriumduodecylsulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sIgM	surface IgM
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
TACI	transmembran activator and CAML interactor
TCR	T-Zellrezeptor (engl. <i>T cell receptor</i> )

---

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
THD	TNF homology domain
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TNFRSF	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor-Superfamilie
TNFSF	Tumor Nekrose Faktor-Superfamilie
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
ZKÜ	Zellkulturüberstand

## 1 Einleitung

B- und T-Lymphozyten stellen, eingebunden in ein komplexes regulatorisches Netzwerk, die Effektorzellen der spezifischen Abwehr dar. Diese Dichotomie von Antikörper bildenden B-Zellen und zytotoxischen T-Zellen bzw. T-Helferzellen wurde zuerst bei den Vögeln beschrieben, findet sich aber ebenso bei den Säugetieren. Während die Reifungsvorgänge der T-Zellen bei Vertretern beider Klassen identisch sind, weist der Ablauf der B-Zellentwicklung grundlegende Unterschiede auf. So erfolgt die B-Zellreifung bei den Säugern im Knochenmark, bei den Vögeln stellt dagegen die Bursa Fabricii das charakteristische primärlymphatische Differenzierungsorgan der B-Zellen dar. Präbursale Stammzellen besiedeln die Bursaanlage um den zehnten Embryonaltag und verlassen diese zum Zeitpunkt des Schlupfes als reife postbursale B-Zellen. Sie wandern daraufhin in die peripheren lymphatischen Organe, in denen der Speicher reifer, aber naiver B-Zellen auch nach Involution der Bursa lebenslang aufrechterhalten wird. Aus diesen Zellen rekrutieren sich schließlich auch jene Antikörper bildenden Zellen, die in Folge einer Infektion oder Vakzinierung aktiviert werden und einen entscheidenden Einfluß auf den Gesundheitsstatus der Tiere haben.

Die Antigenerkennung durch B-Zellen erfolgt über membranständiges Immunglobulin, das auch als B-Zellrezeptor bezeichnet wird. Um eine effektive Immunantwort gegen die große Bandbreite an Antigenen zu gewährleisten, exprimiert jede B-Zelle einen individuellen Rezeptor, sodass das von naiven B-Zellen exprimierte Rezeptor-Repertoire annähernd  $10^{11}$  verschiedene Moleküle umfasst. Die molekularen Vorgänge der Diversifizierung des B-Zellrepertoires in der Bursa Fabricii sind heute gut verstanden. Weit weniger gut untersucht sind dagegen jene regulatorischen Komponenten, die die Besiedelung der Bursa, die bursale B-Zellreifung und die Aufrechterhaltung des peripheren B-Zellpools sowie die Bildung antigenspezifischer Antikörper regulieren.

Ein Grund hierfür ist die große phylogenetische Distanz zwischen Säugern und Vögeln, die eine Übertragung von Erkenntnissen aus dem Maussystem oftmals unmöglich macht. Klassische Homologieansätze zur Klonierung wichtiger regulatorischer Komponenten waren daher auch meist erfolglos. Neue Erkenntnisse ermöglichte in den letzten Jahren die Etablierung sogenannter EST-Datenbanken von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, die sich als reiche Quelle wichtiger Sequenzinformationen erwiesen haben. Einen weiteren entscheidenden Fortschritt für alle Grundlagenarbeiten und die anwendungsorientierte Forschung wird sicherlich die Veröffentlichung der ersten vorläufigen Sequenz des Hühnergenoms vom März 2004 bringen.

---

Bis heute konnte beim Huhn lediglich Interleukin-6 als möglicher B-Zell-Wachstumsfaktor kloniert werden. Ältere Arbeiten zeigten zudem, dass in der Bursa ein als Bursin bezeichnetes Zytokin gebildet wird, dem eine regulatorische Funktion zugesprochen wird. Bei der Durchsicht von Hühner-EST-Datenbanken fanden sich zahlreiche Sequenzen für Zytokine, darunter auch solche, die große Homologie mit einem als „B cell activating factor belonging to the TNF family“ (*BAFF*) bezeichneten Zytokin aufwiesen. BAFF wurde im Säugersystem erstmals 1998 als B-Zell spezifisches Zytokin beschrieben und gilt als essentieller Überlebensfaktor für periphere B-Zellen. Gegenstand dieser Arbeit sollte es sein, das aviäre BAFF-Homolog zu klonieren und funktionell zu charakterisieren.

## 2 Literaturübersicht

Entwicklungsimmunologen haben sich seit langem sehr intensiv mit dem Huhn beschäftigt. Denn anders als andere Vertebraten besitzen Vögel zwei separate und leicht zu manipulierende primäre lymphatische Organe: den Thymus, in dem sich die T-Zellen entwickeln und die Bursa Fabricii, die der Differenzierung der B-Zellen dient. So wurde auch die Funktion der B-Zellen nicht beim Säuger, sondern beim Huhn entdeckt. 1954 gab Bruce Glick einem Kollegen, der für einen Kurs Hühner zur Demonstration der Antikörperproduktion nach einer Salmonellenimpfung benötigte, einige seiner Versuchstiere. Bei einigen der Tiere unterblieb jedoch die Antikörperbildung vollständig. Bei genauerer Untersuchung stellten Glick und sein Kollege fest, dass es sich hierbei um bursektomierte Hühner handelte [1]. Dies war der erste stichhaltige Hinweis darauf, dass die Bursa eine wichtige Rolle für die Funktion der B-Zellen und damit der Antikörperproduktion spielt [2]. Aufgrund dieser Entdeckung erhielten die B-Zellen schließlich ihren Namen – „B“ für „Bursa-derived“. Aber auch das Konzept der Dichotomie des erworbenen Immunsystems, d.h. für die zelluläre Immunantwort verantwortliche T-Zellen und die humorale Immunantwort vermittelnde B-Zellen, wurde hieraus entwickelt [3] und konnte letztendlich nach Zuordnung des Knochenmarks als „Bursa-Equivalent“ vom Vogel auf den Säuger übertragen werden [4, 5].

### 2.1 Das B-Zellsystem des Haushuhns

Wie bei allen Vertebraten besteht das Immunsystem des Huhnes aus einem angeborenen und einem erworbenen Anteil, von denen jeder sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten besitzt, die in ihrer Funktion eng miteinander verzahnt sind. Die Struktur und Verteilung der lymphatischen Gewebe der Vögel unterscheiden sich jedoch deutlich von denen der Säuger. So besitzen Hühner wie die meisten Vögel keine Lymphknoten. Andererseits hat sich bei den Aves ein spezialisiertes Organ zur B-Zelldifferenzierung entwickelt, die Bursa Fabricii. Trotz der strukturellen Unterschiede ist die Funktion der Lymphozyten und der peripheren lymphatischen Organe jedoch sehr ähnlich [6].

Im ausgereiften Immunsystem bilden die B-Zellen Antikörper (= Immunglobuline), die gegen eine Vielzahl verschiedener Pathogene gerichtet sind. Dazu müssen sie eine Fülle verschiedener Antigene von Viren, Bakterien und anderen krankheitserregenden Organismen erkennen und von körpereigenen Molekülen unterscheiden können. Zur Erkennung der Antigene dient den B-Zellen membrangebundenes Immunglobulin, das auch als B-Zell-Rezeptor (*BCR*) bezeichnet wird. Jede B-Zelle exprimiert in ihrer Zellmembran einen anderen BCR und erkennt

damit nur ein bestimmtes, spezifisches Antigen. Nach Bindung dieses spezifischen Antigens in einem peripheren lymphatischen Organ und zusätzlicher Interaktion mit T-Helferzellen kann sich diese B-Zelle zur Plasmazelle differenzieren und das spezifische Immunglobulin in löslicher Form als Antikörper sezernieren [7]. Während beim Säuger die B-Zellen lebenslang aus Progenitorzellen im Knochenmark gebildet werden und von dort in die Peripherie auswandern, lassen sich beim Huhn aufgrund der speziellen Anatomie eine präbursale, eine bursale und eine postbursale Phase der B-Zellentwicklung unterscheiden [8].

### 2.1.1 Präbursale B-Zellentwicklung

Am Tag 5 der Embryonalentwicklung finden sich beim Hühnerembryo pluripotente hämatopoetische Vorläuferzellen in den paraaortischen Foci [9]. Diese Progenitorzellen verteilen sich in den Blutinseln von Dottersack, Leber, Knochenmark und Milz. Identifiziert werden konnten sie erst durch den Nachweis der für die B-Lymphozyten charakteristischen molekularen Vorgänge der Immunglobulinbildung [10]. Immunglobuline bestehen stets aus einem variablen (V), für die Antigenerkennung verantwortlichen und einem konstanten (C), Rezeptorinteraktion oder Signalfunktion vermittelnden Anteil. Diese Teile sind im Genom in Form von Gen-Segmenten codiert. Sie werden in sich entwickelnden Lymphozyten durch einen „gene rearrangement“ genannten Prozess zu einer funktionellen DNA-Sequenz verbunden. Dabei werden vor der Verbindung von variablem und konstantem Teil die V-Segmente noch mit einem Joining (J)-Segment und für die schwere (H) Kette zusätzlich noch einem Diversity (D)-Segment verknüpft [7]. Da in T-Zellen kein Rearrangement des Immunglobulin (*Ig*)-Locus stattfindet, kann der Nachweis dieses Rearrangements in Zellen als Marker für die Zugehörigkeit zur B-Zell-Entwicklungslinie verwendet werden. Erste DJ<sub>H</sub>-Rearrangements finden sich zwischen dem fünften und sechsten Embryonaltag im Dottersack, das Rearrangement für die Gene des variablen Anteils („V gene rearrangement“) 2-3 Tage später v.a. in der Milz [11]. Neben diesen molekularen Merkmalen, kann auch die Expression von Zelllinien spezifischen Oberflächenmolekülen wie ChB6 (= Bu1) genutzt werden, um bereits zu diesem Zeitpunkt frühe B-Zellen (ChB6<sup>+</sup>) von T-Zellen (ChB6<sup>-</sup>) zu unterscheiden [12]. Zwischen Embryonaltag 10 und 15 ist es dann auch möglich, Ig auf der Oberfläche der Zellen (surface Ig, *sIg*) nachzuweisen [13]. Diese Studien zeigten, dass die Bursa zur Festlegung der Vorläuferzellen auf die B-Zelllinie, zur Induktion des Ig-Rearrangements und zur *sIg*-Expression nicht erforderlich ist. Im Gegensatz zu Mensch und Maus, bei denen das Ig-Rearrangement zeitlebens im Knochenmark stattfindet, existiert beim Huhn dafür nur ein enges Zeitfenster von ca.

10 Tagen während der embryonalen Entwicklung. Damit stammen alle B-Zellen des adulten Huhnes von Zellen ab, die schon während der Embryonalzeit sIg exprimiert haben [11]. Vom zehnten bis zum fünfzehnten Embryonaltag wandern die präbursalen Stammzellen mit einem Maximum am zwölften Tag aus der Peripherie in die Bursa ein, wo sie weiteren Reifungsprozessen unterliegen [14].

## **2.1.2 Bursale B-Zellentwicklung**

Die Bursa Fabricii übernimmt in der Entwicklung der B-Zellen zwei unterschiedliche Aufgaben. In ihr finden sowohl die selektive Expansion von Zellen mit funktionellem Ig-Rearrangement als auch die somatische Diversifizierung der Ig-Gene durch „gene conversion“ statt.

### **2.1.2.1 Struktur der Bursa**

Die Anlage der Bursa Fabricii entsteht am 4. Embryonaltag als endodermale, von mesenchy-malem Gewebe umgebene Ausstülpung am dorsalen Ende der Kloake. Während der Embryo-genese wächst das Bursastroma zu einer sackartigen Struktur mit charakteristischen Gewebe-falten heran, die einen, mit dem hinteren Enddarm über einen Gang in Verbindung stehenden, Hohlraum umgeben [15]. Die Gewebefalten werden von Säulenepithel bedeckt, welches pro-liferiert und mit kleinen epithelialen Knospen in die darunter liegende Lamina propria vor-dringt, wodurch die Ausbildung von sog. Bursafollikeln induziert wird. In diesen Follikeln findet die selektive Vermehrung der B-Zellen statt. In jedem Follikel bildet sich eine Medulla mit lymphoiden Zellen, Makrophagen, einem Netz aus bursalen sekretorischen Dendritischen Zellen und einer geringen Zahl an T-Zellen. Die Medulla wird von einer Lage epithelialer Zellen umgeben, um die ein Netzwerk aus Kapillaren liegt [16].

Kurz vor dem Schlupf [17] bildet sich außerhalb dieser Epithellage ein Cortex aus einer dichten Lymphozytenpopulation, welche die Bursa über das Kapillarnetzwerk verlassen [18]. Das Epithel über den Follikeln differenziert sich zum sog. Follikel assoziierten Epithel (*FAE*), das auf die Absorption von Partikeln aus dem Bursalumen spezialisiert ist.

Die Bursa wächst bis zu einer Plateauphase im Alter von 2 bis 4 Wochen kontinuierlich und bleibt ein funktionelles lymphatisches Organ bis zur Bursainvolution mit Beginn der sexuel-len Reife der Hühner im Alter von 4 bis 6 Monaten [18]. Diesen Zusammenhang zwischen Testosteronkonzentration und Bursainvolution macht man sich bei der hormonellen Bursek-tomie durch Tauchen der Eier in eine Testosteronpropionat-Lösung zunutze [19].



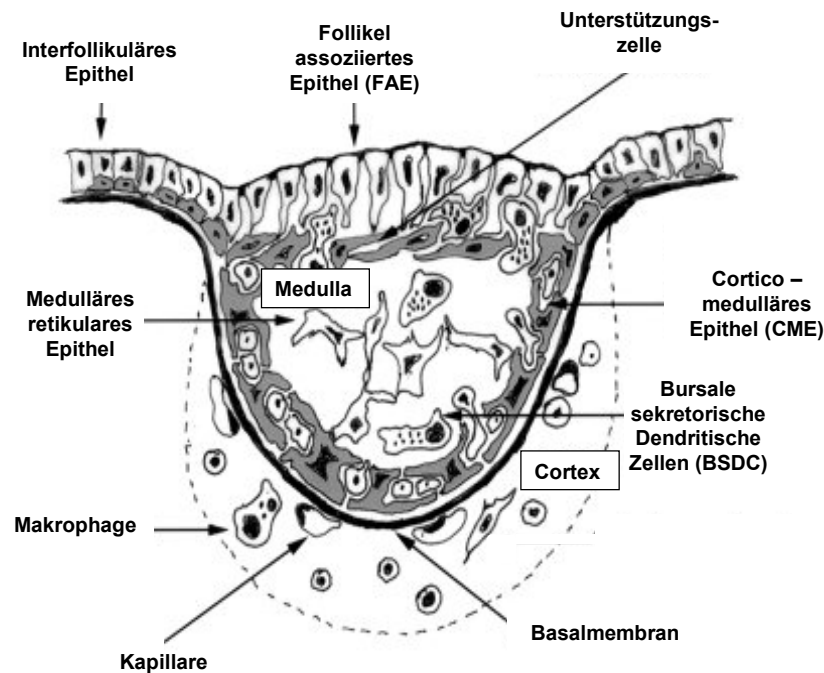


Abb. 2.1 Aufbau eines Bursafollikels (nach Nagy et al. [20])

Studien mit burssektomierten Tieren haben gezeigt, dass zur normalen B-Zellentwicklung sowohl die lymphoiden als auch die epithelialen Anteile der Bursa nötig sind. Wird die Bursa bereits 60 Stunden nach Beginn der Embryogenese chirurgisch entfernt [21, 22] oder die Differenzierung der Epithelkomponente durch eine Testosteronbehandlung zwischen dem 6. und 8. Embryonaltag verhindert [23], erhält man hochgradig immundefiziente Tiere. Diese weisen zwar annähernd normale Zahlen an B-Zellen und Ig-Serumwerte auf, sind jedoch zu keiner primären oder sekundären Immunantwort in der Lage. Wird nur der lymphoide Anteil der Bursafollikel zwischen 15. und 17. Embryonaltag durch Behandlung mit Cyclophosphamid zerstört, zeigen die Tiere neben einer starken Immundefizienz zusätzlich noch eine extrem niedrige B-Zellzahl [24]. Der verbleibende epitheliale Anteil der Bursa kann durch Transplantation von  $Ig^+$ -Zellen aus embryonalen Bursen wiederbesiedelt werden, was zur vollständigen Rekonstituierung des B-Zellsystems führt. Zellen, die in der Lage sind, das Bursaepithel zu besiedeln und das B-Zellsystem zu rekonstituieren nennt man bursale Stammzellen. Sie finden sich zwischen Embryonaltag 15 und dem Schlupf und verschwinden in den ersten Lebenswochen vollständig [25].

### 2.1.2.2 Einwanderung und Expansion der B-Zellen

Ab dem 10. Embryonaltag beginnt die Besiedlung der Bursafollikel mit präbursalen Stammzellen, wobei in jeden der 8.000 – 12.000 Follikel nur zwei bis fünf Zellen einwandern [26].

Der Zeitraum für die Besiedelung ist auf wenige Tage begrenzt und findet nicht wie im Thymus in mehreren Phasen statt.

Ein bekannter Faktor, der die Migration der Stammzellen in die Bursa beeinflusst, ist der Selektinligand Sialyl-Lewis-X. Selektine und ihre Liganden vermitteln die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen vor ihrem Austritt aus Blutgefäßen. Es konnte gezeigt werden, dass alle Selektine das Lactosamin Sialyl-Lewis-X binden können [27]. Dieses wird im Hühnerembryo ausschließlich auf präbursalen und bursalen Stammzellen exprimiert und ermöglicht den Zellen die Anheftung an Gefäßwände der Bursa. Zwischen dem 15. und 17. Embryonaltag beginnt sich das Expressionsmuster auf der Zelloberfläche der B-Zellen in der Bursa zu ändern. Während die Anzahl der Sialyl-Lewis-X-Moleküle stetig abnimmt, beginnen die Zellen mit Lewis-X eine verwandte, aber anders glykosilierte Kohlenwasserstoffstruktur in ihre Membran einzubauen. Diese Veränderung der Glykosilierung findet ausschließlich in der Bursa statt und korreliert eng mit dem Zeitpunkt, an dem bursale B-Zellen die Fähigkeit verlieren, die Bursa nach Cyclophosphamid-Behandlung wieder zu besiedeln [16, 28].

Zwischen dem 13. und 15. Embryonaltag beginnen die eingewanderten Zellen zu proliferieren [29], bis im Alter von 3 bis 5 Wochen jeder Follikel ca.  $10^5$  Zellen enthält [30]. Dabei teilen sich nur Vorläuferzellen, die ein funktionsfähiges Ig-Rearrangement vollzogen haben und damit IgM in ihrer Zellmembran exprimieren können [31]. Da beim „gene rearrangement“ zwei codierende Genomsegmente zufällig miteinander verbunden werden, sind zwei Drittel dieser Verknüpfungen „out of frame“, d.h., diese DNA-Sequenz kann nicht in ein Protein transkribiert werden, was für die Mehrheit der in die Bursa einwandernden B-Zellen zutrifft [32]. Da zum Zeitpunkt des Schlupfes aber 90 -95 % der Bursalymphozyten sIg exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass eine Selektion auf die sIg<sup>+</sup>-Zellen erfolgt ist [16].

Lange Zeit wurde vermutet, dass der BCR einen spezifischen Liganden auf dem Bursastroma erkennt und diese Interaktion zur klonalen Expansion der sIg<sup>+</sup>-Zellen führt. Dafür sprach auch die Tatsache, dass die Quervernetzung des BCR auf Bursalymphozyten zur Generierung einer „second messenger“-Antwort führt, das sIg folglich zur Signaltransduktion in der Lage ist [33]. Werden jedoch in Embryonen über retroviralen Gentransfer B-Zellen mit einem trun-kierten BCR erzeugt, so entwickeln sich diese Zellen dennoch weiter und sind zum Zeitpunkt des Schlupfes noch nachweisbar. Da sie ein Ig exprimieren, das nur aus dem konstanten Teil der schweren Kette besteht, können diese Zellen nicht spezifisch an Antigene binden. Dementsprechend ist die Erkennung eines bursalen Liganden durch den variablen Teil des BCR für die Proliferation doch nicht notwendig [34].

Vermutet wird, dass die durch produktives Ig-Rearrangement gebildeten sIg-Moleküle, wie bei der Maus gezeigt, zur Assoziierung des BCR-Komplexes notwendig sind. Hierbei werden die für die Signaltransduktion des BCR verantwortlichen Moleküle, CD79 $\alpha$  und CD79 $\beta$  (Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ ), in der Zelle mit dem Immunglobulinmolekül verbunden. Eine Translokation der einzelnen Komponenten in die Zellmembran ohne diese Verbindung ist nicht möglich. Da die strukturelle und funktionelle Homologie von CD79 $\alpha$  und CD79 $\beta$  des Huhnes zu Mensch und Maus sehr groß ist, und ein CD79 $\beta$ -Knockout bei der Maus zu schweren Störungen der B-Zellentwicklung führt, ist anzunehmen, dass die Oberflächenexpression dieser Moleküle auch beim Huhn notwendig ist. Daher könnte die Expression des Komplexes auf der Zelloberfläche zu einer basalen Signalübermittlung ohne extrazelluläre Rezeptor-Ligand-Interaktion führen, die zur Vermittlung der Zellproliferation ausreicht [11].

### **2.1.2.3 Generierung des Antikörper-Repertoires durch „gene conversion“**

Die zentrale Anforderung an das erworbene Immunsystem besteht darin, spezifisch eine große Vielzahl an Antigenen mit Hilfe des variablen Teils des Antigenrezeptors zu erkennen und darauf zu reagieren. Dazu müssen schätzungsweise zwischen  $10^6$  und  $10^8$  verschiedene Rezeptormoleküle gebildet werden. Wäre jede dieser Varianten vollständig im Genom codiert, bräuchte man hierfür mehr Gene, als im Gesamtgenom überhaupt vorhanden sind. Darum haben sich bei den Vertebraten verschiedene andere Mechanismen zur Generierung dieses Antikörperrepertoires entwickelt. Wie bereits ausgeführt, ist die genetische Information für den variablen Teil eines Immunglobulinmoleküls in verschiedenen Teilen, sog. Gensegmenten (V, J, D, s.2.1.1) codiert. Um beispielsweise ein vollständiges Exon für den variablen Teil der leichten Kette zu bilden, müssen ein V (Variabel) und ein J (Joining)-Gensegment miteinander verbunden werden. Bei der schweren Kette kommt es zunächst zur Verknüpfung von D (Diversity)- und J-Segment, bevor die Bindung an das V-Segment erfolgt. Der konstante Teil wird von einem separaten Exon codiert und durch Splicing der RNA mit dem variablen Teil verbunden.

Bei Mensch und Maus sind nun nicht nur jeweils ein V-, D- und J-Segment vorhanden, sondern auf drei Genloci – einem für die schwere Kette, und jeweils einem für die beiden Varianten der leichten Kette  $\kappa$  und  $\lambda$  – ca. 65 V-Segmente für die schwere Kette, ungefähr ebenso viele für die beiden Varianten der leichten Kette, ca. 30 D Varianten und 4 bis 6 J-Segmente pro Locus. Bei der somatischen Rekombination der DNA werden nun zufällig V- und J- (und D) Segmente miteinander kombiniert, wodurch sich die Anzahl verschiedener Moleküle potenziert (= combinatorial diversity). Weitere Variabilität wird durch das Einfügen einer zufälligen Anzahl zusätzlicher Nukleotide oder der variablen Deletion einzelner Nukleotide bei der

Verbindung der einzelnen Segmente erzeugt (= junctional diversity). Schließlich verdoppelt die Assoziation von unterschiedlichen schweren und leichten Ketten zum variablen Teil des Gesamt-Immunglobulinmoleküls die Diversität ein weiteres Mal [35, 36].

Nachdem erste Proteinanalysen bereits gezeigt hatten, dass beim Huhn für die leichte Kette statt einer  $\kappa$  und  $\lambda$  nur eine  $\lambda$  ähnliche Variante existiert [37], fanden sich im Genom des Huhnes im Locus für die leichte Kette nur ein einzelnes funktionelles  $V_L$ - und ein  $J_L$ -Gensegment. Ebenso findet sich im Locus für die schwere Kette neben 15 D-Segmenten mit sehr geringer Sequenzvariation jeweils nur ein einziges funktionelles  $V_H$ - und  $J_H$ -Segment, sodass die Erzeugung eines vielfältigen Antikörper-Repertoires über den gleichen Mechanismus wie bei Mensch und Maus nicht möglich ist [38, 39].

Interessanterweise fand man aber 5' des funktionellen V-Segments der leichten Kette 25 zum V-Segment homologe Gensegmente. Im Locus der schweren Kette konnten sogar 80 dieser Segmente nachgewiesen werden. Diese „Pseudogene“ genannten Segmente sind am 5'-Ende verkürzt und besitzen weder ein für die Oberflächenexpression notwendiges Leader-Exon noch eine Promotor-Region. Da ihnen außerdem funktionsfähige „recombination signal sequences“, also kurze flankierende DNA-Stücke, die zur Verbindung der einzelnen Segmente essentiell sind, fehlen, können sie für ein V-J-Rearrangement nicht verwendet werden [32, 40].

Hieraus ergibt sich, dass  $Ig^+$  bursale Stammzellen nach dem Ig-Rearrangement nur ein äußerst limitiertes Ig-Repertoire aufweisen und am Embryonaltag 15 praktisch alle den gleichen BCR in ihrer Membran tragen [41]. Analysen von L-Ketten cDNA-Sequenzen aus Milzen ausgewachsener Hühner zeigten jedoch die Existenz einer enormen Vielzahl unterschiedlicher BCRs. Diese wiesen aber, verglichen mit der Sequenz des ursprünglichen V-Segments, eine Vielzahl von Nukleotidsubstitutionen auf, welche Nukleotidsequenzen in den Pseudogenen des L-Ketten Locus entsprachen [38]. Aus dieser Entdeckung konnte der Mechanismus der „gene conversion“ als Weg der Immunglobulin-Diversifizierung beim Vogel abgeleitet werden. Hierbei werden sowohl für die schwere als auch für die leichte Kette Sequenzblöcke aus den Pseudogenen in die rearrangierten V-Gene transferiert [10, 40], wobei die Auswahl der Pseudogene nicht völlig zufällig erfolgt, sondern bestimmten Kriterien unterliegt. So werden näher liegende Sequenzen und Sequenzen höherer Homologie ebenso häufiger verwendet wie Pseudogene in antisense-Orientierung. Auch kann der Austausch durch vorhergehende Substitutionen beeinflusst werden [42].

Während der klonalen Expansion der  $sIg^+$ -Zellen in der Bursa findet, wie man heute weiß, alle 10 bis 15 Zellzyklen ein „gene conversion“ Ereignis statt, sodass in einem einzelnen V-

Gen zwischen 4 und 10 Substitutionen auftreten können, bevor die Zelle die bursale Entwicklungsphase abschließt [40]. Damit können durch diesen Mechanismus theoretisch bis zu  $10^{11}$  verschiedene Antikörpermoleküle generiert werden.

Anzumerken ist, dass nicht nur Hühner den Mechanismus der „gene conversion“ nutzen, sondern auch Schafe, Rinder und Kaninchen ihre Antikörpervielfalt teilweise oder vollständig auf diese Art erzeugen [43]. Dabei dient in allen Spezies das sog. „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) als primäres B-Zell Organ. Neben der Bursa beim Huhn sind das bei Schaf, Rind [44, 45] und Schwein [46] die Peyer'schen Platten [47, 48] und beim Kaninchen der Blinddarm [49, 50], wobei diese Spezies im Gegensatz zum Huhn mehrere funktionelle V-Gene für die schwere und leichte Kette besitzen und somit „gene conversion“ nicht als alleiniger Mechanismus zur Diversifizierung dient.

Die Ausbildung der verschiedenen Varianten des T-Zellrezeptors läuft dagegen beim Huhn nach dem von Mensch und Maus bekannten Mechanismus ab [51, 52].

#### **2.1.2.4 Perinatale Veränderungen in der Bursa**

Kurz vor dem Schlupf beginnt sich die Struktur der Bursafollikel zu ändern. Zum einen kommt es zur Ausbildung des Follikel assoziierten Epithels (FAE s. 2.1.2.1), zum anderen migrieren einige der Lymphozyten durch die Basalmembran und bilden den Follikelcortex. Dieser vergrößert sich durch massive Proliferation der Zellen nach dem Schlupf sehr rasch, wogegen sich die Lymphozyten in der Medulla nach dem Schlupf größtenteils nicht mehr teilen [53, 54].

Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die Aufnahme von exogenem Antigen in die Bursa durch das FAE. Dabei wird auf die Anallippen aufgebracht Material aufgrund reverser peristaltischer Reflexe ebenso aktiv vom FAE phagozytiert und an die antigenpräsentierenden Zellen der Medulla weitergegeben, wie oral verabreichte Substanzen. Diese exogenen Antigene verteilen sich wie aus dem Serum stammende Proteine ausschließlich in der Medulla [55, 56].

Eine Ligation der Verbindung zwischen Bursa und Darm und damit die Isolation des Organs von Umwelteinflüssen führt zu einer deutlichen Reduktion der Zellteilungen in der Medulla [57, 58] und während man bei der Einpflanzung von Bursarudimenten in die Bauchwand eine normale Zellbesiedelung in der Embryogenese findet, verschwinden diese Lymphozyten nach dem Schlupf [29]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Kontakt der B-Zellen in der Bursa mit aus dem Darm stammendem exogenem Antigen für die normale B-Zellentwicklung notwendig ist [11]. Möglicherweise wird dies durch die Ausbildung von Immunkomplexen zwischen  $\text{IgM}^+$  B-Zellen, Antigen und  $\text{sIgG}^+$  Follikulären dendritischen Zellen der Medulla vermittelt. Bei diesem IgG handelt es sich nicht um endogen synthetisiertes Im-

munglobulin, sondern um maternale Antikörper aus dem Dotter, die an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Follikulär Dendritischen Zellen gebunden sind und dort Antigen „präsentieren“ [54, 59].

Auch in den Expressionsmustern von Zellmembranmolekülen finden sich perinatale Veränderungen. Denn während präbursale Stammzellen vor ihrer Migration in die Bursa Sialyl-Lewis-X exprimieren, sind Zellen, in denen „gene conversion“ stattfindet durch die Expression von Lewis-X gekennzeichnet. Kurz vor der Emigration der B-Zellen in die Peripherie, erfahren die B-Zellen jedoch durch die Abnahme der Lewis-X Expression eine erneute phänotypische Veränderung von Lewis-X<sup>high</sup> Zellen zu Lewis-X<sup>low</sup> Zellen [28].

### 2.1.2.5 Apoptose in der Bursa

Während in der Embryonalentwicklung die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Bursa sehr gering ist, steigen die Apoptoseraten kurz nach dem Schlupf dramatisch an [60]. So emigrieren lediglich etwa 5% der gebildeten B-Zellen in die Peripherie, die restlichen Zellen sterben in der Bursa [61]. Hierzu gehören alle Zellen, die während ihrer Entwicklung die Fähigkeit verloren haben, Immunglobuline auf ihrer Oberfläche zu exprimieren [62]. Wie durch retroviralen Gentransfer gezeigt werden konnte, ist die Expression eines trunkierten sIg ohne variablen Anteil ausreichend, um in der Embryonalzeit die Proliferation der Zellen zu induzieren. Zur Emigration aus der Bursa ist aber offensichtlich ein vollständiges Immunglobulinmolekül notwendig, da Zellen mit trunkiertem sIg nicht in die Peripherie wandern, sondern in der Bursa durch Apoptose eliminiert werden [63]. Welches Signal den „programmierten Zelltod“ in der Bursa verursacht, weiß man bislang nicht. Da in 98% der „gene conversion“-Ereignisse der Leserahmen des Exons für den variablen Teil erhalten bleibt [64], kann ein nicht produktives „gene conversion“-Ereignis als Hauptursache allerdings ausgeschlossen werden. Interessanterweise scheinen Viabilität und Überleben der Zellen in der Bursa mit der Expression von chL12, einem Alloantigen mit 38 – 40 kD verknüpft zu sein, wobei sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Apoptose-resistenten Zellen unter den Zellen mit sehr hoher Expression von chL12 (chL12<sup>high</sup>) zu finden sind. Ob die Abnahme der chL12-Expression (chL12<sup>low</sup>/chL12<sup>-</sup>) jedoch Ursache oder Folge der Apoptose darstellt, ist nicht bekannt [65].

Bursale B-Zellen sterben nach Entnahme aus dem Gewebeverband innerhalb von kurzer Zeit, so dass nach 16 Stunden der *in vitro* Kultivierung von Lymphozyten aus der Bursa die Viabilität der Zellen unter 10% liegt [66]. Durch Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen lässt sich zeigen, dass bereits nach 8 Stunden mehr als 50% der Zellen Anzeichen von Apoptose aufweisen [62]. Die Überlebensrate der Zellen kann jedoch durch Zugabe des Phorbolesters

Phorbol-Myristat-Acetat (*PMA*) wahrscheinlich mittels Aktivierung der Protein Kinase C, um ein vielfaches gesteigert werden [67].

Da bei *in vitro* Organkulturen von embryonalen Bursa-Anteilen die Viabilität deutlich höher ist und sogar Proliferation und Differenzierung der B-Zellen nachgewiesen werden konnten [68, 69], scheinen Zell-Zell-Interaktionen bei der Vermittlung von Überlebenssignalen eine wichtige Rolle zu spielen.

Bcl-2 ist beim Säuger als anti-apoptisches Protein bekannt [70]. Das beim Huhn gefundene Homolog wird in allen lymphoiden Geweben exprimiert, am stärksten im Thymus und nur relativ schwach in der Bursa [71]. Dabei scheinen weder sich entwickelnde noch emigrierende Zellen der Bursa hohe Werte an bcl-2 zu exprimieren [65], während das Protein in frühen germinalen Zentren in größerer Menge nachgewiesen werden kann. [72]. Von Mensch und Maus ist bekannt, dass in germinalen Zentren die bcl-2-Expression von Antigen selektierten Zellen hochreguliert wird und die Zellen so vor Apoptose geschützt sind [73]. Für eine mögliche Rolle von bcl-2 bei der Regulation der B-Zellentwicklung spricht auch die Tatsache, dass durch Überexpression von humanem bcl-2 in der Bursa die Zahl der apoptotischen Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* deutlich reduziert werden konnte [66]. Zusätzlich verstärkt wird der Verlust lebender Bursazellen in Kultur durch Inkubation der Zellen mit einem Antikörper gegen chB6, einem Glycoprotein, das, mit Ausnahme der Plasmazellen der Harder'schen Drüse, auf allen B-Zellstufen des Huhnes exprimiert wird. Die Ligation von chB6 führt zum schnellen Sterben der Zellen, die dabei jedoch nur wenige Charakteristika apoptotischer Zellen aufweisen. Deshalb wird vermutet, chB6 könnte eine neue Familie von Molekülen repräsentieren, die auf eine bislang unbekannt Weise Zelltod vermitteln [74-76].

#### **2.1.2.6 Emigration von B-Zellen aus der Bursa**

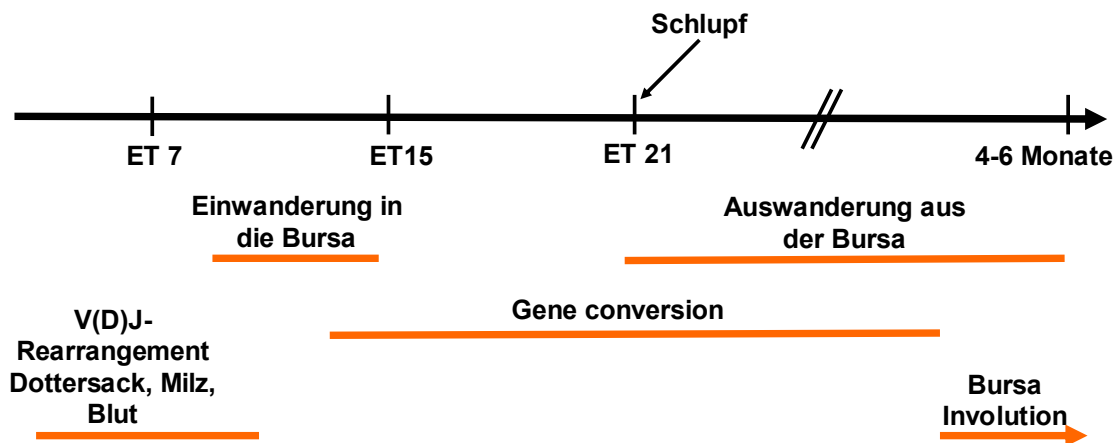
Bereits kurz vor dem Schlupf beginnen B-Zellen aus der Bursa in die Peripherie zu emigrieren, wobei die Zahl der peripheren B-Zellen zum Zeitpunkt des Schlupfes noch sehr gering ist. Bis zum Alter von 3 Wochen steigt die Emigrationsrate aus der Bursa jedoch auf 1% der peripheren B-Zellzahl pro Stunde an [77].

Dabei lassen sich aufgrund ihrer Lebensspanne in der Peripherie zwei Subpopulationen an emigrierenden Zellen unterscheiden. Population 1 stellt ca. 60 - 70 % der peripheren B-Zellen und ist mit einer Halbwertszeit von 30 Stunden extrem kurzlebig. Diese Zellen stammen aus dem Follikelcortex und verlassen die Bursa, ohne durch die Medulla zu wandern, entweder über die extrafollikulären Lymphgefäße [78] oder das dichte Kapillarnetz am cortico-medullären Übergang. Vermutlich handelt es sich hierbei um naive B-Zellen, die noch keinen spezifischen Kontakt mit Antigen hatten. Population 2 beinhaltet deutlich langlebigere Zellen mit

einer Halbwertszeit von ungefähr 12 Tagen und umfasst ca. 35% der peripheren B-Zellen. Man nimmt an, dass diese Subpopulation aus der Follikelmedulla stammt und von Zellen gebildet wird, die dort nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen zu langlebigeren Zellen gereift sind. Die Produktion von Zellen der Population 1 ist dabei 25 mal höher, als die der Population 2, so dass nur ca. 4%, der aus der Bursa emigrierenden Zellen Population-2-Zellen darstellen [77, 79, 80].

Im Blut findet sich zusätzlich noch eine weitere Population von B-Zellen. Diese Population 3 stellt im Alter von 2-3 Wochen lediglich etwa 5% der peripheren B-Zellen, nimmt jedoch mit dem Alter der Tiere an Zahl zu und ist mit einer Überlebenszeit von über 100 Tagen extrem langlebig. Versuche mit bursektomierten Tieren haben außerdem gezeigt, dass diese Zellen sich auch außerhalb der Bursa teilen.

Nach Involution der Bursa, wird der periphere B-Zellpool durch eine sich selbst erhaltende Population  $sIg^+$ , ursprünglich aus der Bursa stammender Zellen aufrechterhalten, die aufgrund ihrer Funktion postbursale Stammzellen genannt werden. Da jedoch unter experimentellen Bedingungen zu einem geringen Grad auch eine von der Bursa unabhängige B-Zellentwicklung beobachtet werden kann, ist nicht klar, ob Zellen der Population 3 eine Bursa unabhängige B-Zelllinie oder Vorläufer der postbursalen Stammzellen darstellen [77, 81].



**Abb. 2.2 Zeitliches Schema der B-Zellentwicklung beim Huhn**

Zwischen dem fünften und sechsten Embryonaltag (ET) finden erste  $DJ_H$ -Rearrangements im Dottersack statt, einige Tage später beginnt das V-Rearrangement in der Milz. Ungefähr zwischen dem zehnten und fünfzehnten Embryonaltag wandern die präbursalen Stammzellen in die Bursa ein. Hier kommt es zur massiven Proliferation der Zellen und der Diversifizierung ihres Antikörper-Repertoires durch „gene conversion“. Kurz vor dem Schlupf beginnen erste B-Zellen aus der Bursa zu emigrieren. Bis zum Beginn der sexuellen Reife im Alter von vier bis sechs Monaten bleibt die Bursa funktionell aktiv, danach kommt es zur Involution des Organs.



### 2.1.3 Postbursale B-Zellentwicklung

Liegen für die Entwicklung der B-Zellen beim Huhn bis zu ihrer Emigration aus der Bursa sehr ausführliche Untersuchungen vor, so ist über die genauen Reifungs- und Differenzierungsprozesse der Zellen in den sekundären lymphatischen Organen weniger bekannt. Auch ist eine Unterteilung in verschiedene Reifungs- und Funktionsstadien (unreif, T1, T2, naiv, aktiviert, Marginalzonen-, Plasma- und Gedächtniszelle) aufgrund fehlender Oberflächenmarker derzeit nicht möglich. Die vorliegenden Daten zur Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen weisen jedoch auf eine weitgehende Übereinstimmung mit den Vorgängen bei Säugetieren, insbesondere bei Mensch und Maus, hin.

#### 2.1.3.1 Periphere lymphatische Organe

Nach der Emigration aus der Bursa besiedeln die B-Zellen die peripheren lymphatischen Organe. Während die primären - oder auch zentralen - lymphatischen Organe, also Thymus und Bursa, der Entwicklung der Lymphozyten dienen, ist die Umgebung der sekundären bzw. peripheren lymphatischen Organe essentiell für die regulierte Aktivierung der B-Zellen und T-Zellen durch Antigen. Bei Mensch und Maus entstehen nach der antigenen Stimulation, in T-Zell abhängigen Immunantworten, aus Primärfollikeln, also Aggregaten nicht aktivierter B-Zellen, nach dem Einwandern aktivierter B-Zellen sog. Sekundärfollikel. In diesen bilden sich germinale Zentren, in denen unter massiver Proliferation der B-Zellen die Affinitätsreifung der Antikörper und die Bildung von Gedächtniszellen stattfindet [82, 83].

Im Gegensatz zum Säuger findet man beim Huhn in den sekundären lymphatischen Organen keine Primärfollikel. Statt dessen entstehen germinale Zentren nach antigener Stimulation an prädisponierten Stellen gleich als Sekundärfollikel. Sie sind von einer Bindegewebskapsel umgeben und frei von Blutgefäßen [84].

Lymphknoten fehlen, es finden sich jedoch Ansammlungen von Lymphgewebe um die Organe [85]. Zu den rein peripher lymphatischen Organen werden Milz, Caecaltonsillen (*CT*), die Peyer'schen Platten, das paranasale lymphatische Gewebe und dabei v.a. die Harder'sche Drüse sowie das Bronchus assoziierte lymphatische Gewebe in der Lunge (*BALT*) gezählt.

Die Milz besteht wie beim Säuger aus roter und weißer Milzpulpa. Sie wird beim Huhn, wie auch beim Säuger [86], bereits sehr früh in der Ontogenese von lymphoiden Zellen besiedelt, nämlich zwischen zehntem und elftem Embryonaltag. Die endgültige Entwicklung der lymphoiden Struktur findet jedoch erst nach dem Schlupf mit Beginn des Antigenkontaktes statt [85]. Antigene erreichen die Milz über die Blutzirkulation, weshalb die hier gebildeten Antikörper auch hauptsächlich gegen Antigene aus dem Blut gerichtet sind [87].

Die Caecaltonsillen liegen, als größte Lymphozytenansammlung im Darm, am Ausgang der Blinddärme in der Darmwand. Sie entwickeln sich in den ersten Lebenstagen nach Kontakt mit intestinalem Antigen [85], wobei erste germinale Zentren bereits nach kurzer Zeit zu finden sind.

Die Peyer'schen Platten finden sich beim Huhn im distalen Jejunum, sind jedoch in ihrer Ausprägung deutlich kleiner als beim Säuger. Sie bestehen aus germinalen Zentren und diffussem Lymphgewebe [88]. Das Meckel'sche Divertikel, ein Rudiment des Dottersacks, wird ab einem Alter von 2 Wochen von Lymphozyten infiltriert und bleibt bis zu einem Alter von 20 Wochen funktionell aktiv. Nach einigen Wochen finden sich hier germinale Zentren und eine große Zahl von Plasmazellen [89]. Erst vor kurzem wurde am Übergang zwischen Ösophagus und Proventrikulus die Ösophagealtonsille beschrieben [90]. Die sechs bis acht von Lymphoepithel bedeckten Lymphozytenaggregate, sind der einzige kranial des Magens gelegene GALT-Anteil und somit unverdauten Nahrungsantigenen ausgesetzt.

Eine weitere Besonderheit beim Huhn stellt die Harder'sche Drüse dar. Diese exokrine Drüse liegt in der Orbita mit einem zentralen Ausführungsgang in den medialen Winkel der Nickhaut. In ihrem Interstitium finden sich massive Ansammlungen lymphoider Zellen, bei einem Großteil davon handelt es sich um Plasmazellen, die Antikörper in die Tränenflüssigkeit abgeben. Über den Ausführungsgang gelangt retrograd Antigen in die Drüse, wodurch sie an der lokalen Immunantwort der Konjunktiven und des oberen Respirationstrakts beteiligt ist. In der Harder'schen Drüse kommt es zur Ausdifferenzierung der B-Zellen und zum Immunglobulin-Klassenwechsel, sodass neben IgM auch IgG und v.a. IgA produziert werden [91-93].

### **2.1.3.2 Postbursale Diversifizierung**

Die Affinitätsreifung der B-Zellen ist ein Prozess, bei dem im Verlauf der Immunantwort immer besser an das Antigen bindende Antikörper generiert werden. Dies erfolgt bei Mensch und Maus durch die sog. somatische Hypermutation. Hierbei werden in einer hohen Rate Punktmutationen in die rearrangierten Gene der leichten und schweren Kette eingeführt. Einige der entstehenden Zellen tragen daraufhin einen Rezeptor, der besser an das Antigen bindet und werden vorzugsweise zu reifen, Antikörper produzierenden Plasmazellen selektiert [94].

Auch beim Huhn kommt es, wie beim Menschen postuliert, zur polyklonalen Einwanderung von aktivierten B-Zellen in germinale Zentren und daraufhin zur oligoklonalen Expansion der aktivierten Zellen. Neben der somatischen Hypermutation unterliegen diese Zellen jedoch gleichzeitig der „gene conversion“. Im Unterschied zum Vorgang in der Bursa, spielen die Nähe des Donor-Pseudogens zum funktionellen V-Segment und seine Orientierung bei der postbursalen Diversifizierung jedoch keine Rolle [95].

### 2.1.4 Immunglobulinklassen

Das Antikörpermolekül dient der B-Zelle nicht nur in membrangebundener Form als Rezeptor, sondern wird von ihr als Effektormolekül sezerniert. Immunglobuline sind Glycoproteine und kommen bei allen Gnathostomata vor. Sie sind in ihrer Grundstruktur (zwei schwere und zwei leichte Ketten) hochkonserviert, unterscheiden sich aber in Details. Beim Huhn findet man drei Antikörperklassen: IgM, IgG und IgA. Diese unterscheiden sich durch die für die Funktion entscheidende Struktur der schweren Ketten, welche beim Huhn auf einem einzelnen Genlocus in drei verschiedenen Genen lokalisiert sind [96].

IgM tritt in löslicher Form auch beim Huhn fast ausschließlich als Pentamer auf und bildet als membrangebundenes Monomer den Rezeptor aller naiven B-Zellen [97, 98]. Das IgG-Molekül des Huhnes hat eine längere schwere Kette, einen niedrigeren isoelektrischen Punkt, ist stärker negativ geladen und aufgrund der fehlenden „Hinge“ Region weniger flexibel als das Äquivalent des Säugers. Aufgrund der Unterschiede wird es daher häufig statt mit IgG auch mit IgY bezeichnet [99, 100]. Mit seinen vier Domänen im konstanten Teil der schweren Kette und in der Verteilung der Cysteinreste weist es zusätzlich Ähnlichkeiten mit dem IgE der Säuger auf, weshalb angenommen wird, dass sich IgG und IgE eventuell aus einem IgG ähnlichen Vorläufermolekül entwickelt haben [101-103]. Im Gegensatz zum Säuger existieren beim Huhn keine IgG-Subklassen, da nur ein einziges Gen für den konstanten Teil vorhanden ist. IgA kommt beim Huhn meist als Dimer und seltener als Monomer vor und wird im Darm mit einer sekretorischen Komponente gekoppelt. Der einzige Unterschied zum Säuger besteht darin, dass der konstante Teil mit vier Domänen eine Domäne mehr aufweist [103-105]. Bislang wurden beim Huhn weder IgD noch IgE gefunden und genetische Analysen schließen deren Vorkommen auch weitgehend aus. Bei den besonderen B-Zell assoziierten Immunglobulinen des Huhnes handelt es sich vermutlich nicht um IgD, sondern um Isoformen von IgM [96, 106].

Zur Übertragung maternaler Antikörper über das Ei wird IgG im Ovar aktiv aus dem Serum in den Dotter transportiert und später vom Embryo aus dem Dottersack in das Blut des Embryos aufgenommen. IgA und IgM werden dagegen vom Eileiter in das Eiklar sezerniert und vom Embryo mit der Amnionflüssigkeit abgeschluckt [107].

### 2.1.5 Zytokine

Schon sehr früh wurde vermutet, dass auch lösliche Faktoren eine Rolle in der Regulation der B-Zellentwicklung spielen und der Bursa eine zusätzliche sekretorische Funktion zukommt

[108]. Heute ist bekannt, dass die bursalen Stromazellen ein Bursin genanntes Tripeptid (Lys-His-Gly-NH<sub>2</sub>) produzieren [109]. Dieses wird während der Ontogenese der Bursafollikel bei der Differenzierung der B-Zellen benötigt [17].

Während beim Säuger ein komplexes Netzwerk von Zytokinen zur Regulation der B-Zellfunktion beschrieben ist, fehlen beim Huhn entsprechende Kenntnisse über diese wichtigen zellulären Botenstoffe. Die Existenz einiger dieser Faktoren konnte aber auch im Huhn gezeigt werden. So ist der beim Säuger für den Immunglobulinklassenwechsel zu IgA notwendige Transforming growth factor- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) [110-112] beim Huhn zwar in seiner Sequenz seit längerem bekannt, funktionelle Daten liegen aber so gut wie nicht vor. Ähnliches gilt für das erst kürzlich beschriebene aviäre IL-6 Homolog, das auch beim Huhn die Akute-Phase-Reaktion zu regulieren scheint [113, 114], dessen Rolle als B-Zellwachstumsfaktor aber noch nicht untersucht wurde. Kenntnisse über die, für die humorale Immunantwort so bedeutenden Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 fehlen bisher völlig. Ihre Existenz konnte inzwischen allerdings gezeigt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Pete Kaiser, Institute for Animal Health, Compton, UK), sodass in absehbarer Zeit detaillierte Studien möglich werden.

Eine besondere Bedeutung als Regulatoren der B-Zellentwicklung kommt Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie zu. Zu nennen sind hier das CD40 Molekül und das erst vor kurzem entdeckte Zytokin BAFF.

## 2.2 BAFF – B cell activating factor belonging to the TNF family

Zellen, die keine entsprechenden Überlebens- und Wachstumssignale erhalten, sterben. Diese Strategie dient dem Organismus zum Schutz vor ungewollten Ereignissen, wie Autoimmunreaktionen und Zelltransformationen. Im Immunsystem wird das Gleichgewicht zwischen Überleben und Tod durch die differenzierte Kontrolle der Zellproliferation bei der Abwehr von Pathogenen, durch die Toleranz gegenüber körpereigenen Molekülen und durch die Homöostase zwischen den einzelnen Teilbereichen aufrechterhalten [115]. Stoffe, die für das Weiterleben der Zellen notwendig sind, sog. Überlebensfaktoren stehen oftmals in einem engen Kontext zu Zellaktivierung und Proliferation. Vor wenigen Jahren wurde mit dem „B cell activating factor belonging to the TNF family“ (*BAFF*) ein neues Mitglied der TNF-Superfamilie entdeckt, das offensichtlich einen wichtigen Überlebensfaktor für B-Zellen darstellt [116]. Da BAFF zeitgleich von mehreren Gruppen beschrieben wurde, ist es in der Literatur auch unter den Bezeichnungen BlyS (B Lymphocyte Stimulator) [117], TALL-1 (TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1) [118], THANK (TNF Homolog that activates apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) [119], TNFSF13b (TNF-Superfamily Member 13b) und zTNF4 [120] zu finden.

### 2.2.1 Die TNF-Familie

Arbeiten der letzten 20 Jahre haben zur Charakterisierung einer Proteinsuperfamilie geführt, die nach ihrem zuerst entdeckten Mitglied, dem „Tumor Nekrose Faktor“, benannt wurde [121-124]. Heute besteht diese Zytokinfamilie aus 19 Liganden, denen eine Familie von 29 TNF-Rezeptoren gegenübersteht. Während TNF wegen seiner zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen und der Induktion der Tumorregression in Mäusen beschrieben wurde [121], weiß man heute, dass diese Zytokine eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort auf Infektionen und der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase spielen [125]. Sie entfalten ihre Wirkung autokrin, parakrin, aber auch endokrin und können dabei sowohl Proliferation, Überleben und Differenzierung als auch Apoptose induzieren [126].

Während TNF selbst als inflammatorisches Zytokin in der Regulation der Infektionsabwehr wirkt [127], ist das Lymphotoxin (*LT*)-System entscheidend an der Entwicklung der peripheren lymphoiden Organe und der Ausbildung der Milzarchitektur beteiligt [128, 129]. Fas-Ligand (*FasL*, CD95L), TNF, und CD30L sind für die TCR vermittelte Apoptose von T-Zel-

len und unreifen Thymozyten verantwortlich [130-133], wobei einige Familienmitglieder unter Stimulation des TCR die T-Zell Proliferation durch einen autokrinen kostimulatorischen Mechanismus auch verstärken können. Die Interaktion von CD40L auf aktivierten T-Zellen mit dem Rezeptor CD40 auf B-Zellen und Dendritischen Zellen ist entscheidend für Überleben, Proliferation, Ig-Isotyp-Wechsel und Differenzierung der B-Zellen [134] und die Bindung von OX40 an OX40L ist für die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Ig produzierenden Zellen nötig [135].

TNF Familienmitglieder sind Typ II Membranproteine, d.h., sie bestehen aus einer carboxy-terminalen extrazytoplasmatischen und einer aminoterminalen intrazytoplasmatischen Domäne, die durch eine einzelne Transmembran-Domäne verbunden sind. Die stets als Homotrimer auftretenden Proteine, kommen sowohl in membrangebundener als nach proteolytischer Prozessierung auch in löslicher Form vor. Sie sind durch eine C-terminale „TNF homology domain“ (*THD*) genannte Domäne charakterisiert, welche eine für die Ausbildung der Beta-Faltblattstruktur und die Trimerisierung der Liganden entscheidende Consensus-Sequenz enthält [136].

Die Superfamilie der TNF-Rezeptoren ist durch die Präsenz von ein bis vier „Cystein rich domains“ (*CRD*) im extrazellulären Teil gekennzeichnet. Diese etwa 40 Aminosäuren langen Anteile besitzen eine charakteristische Struktur mit typischerweise drei intramolekularen Disulfidbrücken und sechs hochkonservierten Cysteinen. Sie werden von jeweils zwei, über intermolekulare Disulfidbrücken stabilisierten Modulen gebildet und stellen die ligandbindende Grundeinheit dieser Rezeptorklasse dar [136]. Anhand des Vorhandenseins oder Fehlens der sog. „death domain“ werden innerhalb der Rezeptorfamilie zwei große Gruppen unterschieden. Hierbei sind die Rezeptoren mit „death domain“ als „Death-Rezeptoren“ bekannt und vermitteln Apoptose. Während die meisten Liganden nur an einen spezifischen Rezeptor binden, gibt es mehrere TNF-Familienmitglieder, die mit verschiedenen Rezeptoren interagieren können [126].

### 2.2.2 BAFF-Struktur

Humanes BAFF (*huBAFF*) wurde durch Datenbank-Screening nach TNF homologen DNA - Sequenzen identifiziert. Das 285 Aminosäuren lange Typ II Membranprotein setzt sich aus einer 46 AS großen zytoplasmatischen, einer hydrophoben transmembranen und einer 218 AS langen extrazellulären Domäne zusammen und bildet eine typische „jelly roll“ Struktur aus neun  $\beta$ -Faltblättern. Das murine BAFF (*muBAFF*) ist aufgrund einer Insertion etwas größer (309AS). Beide Zytokine kommen als Homotrimer vor [116]. Wie alle anderen TNF-

Familienmitglieder besitzt auch BAFF eine THD, innerhalb der das Zytokin ca. 20–30% Ähnlichkeit zu den meisten anderen Familienmitgliedern und 50% Homologie zu APRIL (A proliferation inducing ligand) aufweist [136]. APRIL ist ein TNF-Ligand, der wie BAFF an die TNF-Rezeptoren BCMA und TACI bindet, aber offensichtlich keine Funktion in der B-Zellentwicklung hat [137]. Man weiß zwar, dass APRIL in der Lage ist, das Wachstum von Tumorzellen zu verstärken [138], seine physiologische Funktion ist bislang jedoch noch unklar. Obwohl bei BAFF alternatives Splicing für Exon 3 nachgewiesen wurde, findet man diese Splice-Varianten weder auf der Zelloberfläche, noch in sezernierter Form [139]. Das Auftreten eines Introns in der THD ist ebenso als Besonderheit der chromosomalen Organisation von BAFF zu nennen wie die Präsenz eines kurzen Exons, das eine für Furin-Typ-Proteasen spezifische Consensus-Sequenz von vier Aminosäuren enthält (Arg-Xxx-Arg/Lys-Arg). Bei anderen Mitgliedern dieser Zytokinfamilie fehlt dagegen die Furinschnittstelle und der größte Teil der C-terminalen Domäne ist auf einem Exon codiert [140]. Außer BAFF weisen diese enzymatische Schnittstelle auch APRIL, EDA und TWEAK auf. Sie ist an der N-terminalen Seite der THD lokalisiert und ermöglicht die Freisetzung der löslichen Form dieser Zytokine [141]. Obwohl man weiß, dass die Zytokine in löslicher Form biologisch aktiv sind, ist nicht bekannt, ob die Prozessierung eine Voraussetzung ist, oder ob auch die membrangebundene Form ausreichende biologische Aktivität aufweist. Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit von BAFF, APRIL, EDA und TWEAK stellt die charakteristische intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den  $\beta$ -Strängen E und F in der THD dar. Da diese Disulfidbrücke auch in „Eiger“, dem TNF-Homolog von *Drosophila* vorkommt, könnten BAFF, APRIL, EDA und TWEAK von einem primordialen „Ur-TNF“ abstammen [142, 143].

Die Kristallstruktur von BAFF zeigt ein Trimer, ähnlich dem anderer TNF-Familienmitglieder, nur etwas flacher und weiter [144-146]. Eine Besonderheit bilden die beiden innerhalb des Trimers gebundenen Magnesiumionen und die durch den Einschub von fünf Aminosäuren verursachte besonders tiefe Grube zwischen den  $\beta$ -Strängen D und E. Diese Region ist stark sauer, während die Oberfläche des BAFF-Rezeptors eher basisch ist. Durch pH-abhängige Interaktionen zwischen den BAFF-Trimeren kann es zur Ausbildung eines geordneten und symmetrischen Oligomers aus bis zu 20 BAFF-Trimeren kommen, wenn das Zytokin in löslicher Form vorliegt. Wie für einige andere TNF-Zytokine gezeigt, könnte hierdurch die Signalübermittlung am Rezeptor gesteigert werden [147]. Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass die Ausbildung dieser „Virus-like Cluster“ nur bei Expression mit einem Histidin-Tag stattfindet [148, 149].

Vor kurzem wurde eine alternative Splice-Form von BAFF entdeckt, die sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen vorkommt und aufgrund des Fehlens eines 57-bp großen Exons als  $\Delta$ BAFF bezeichnet wird.  $\Delta$ BAFF ist in der Lage, Komplexe mit sich selbst, aber auch mit dem Volllängen-BAFF zu bilden und durch diese Hetero-Multimerisierung mit BAFF dessen Aktivität negativ zu regulieren [150].

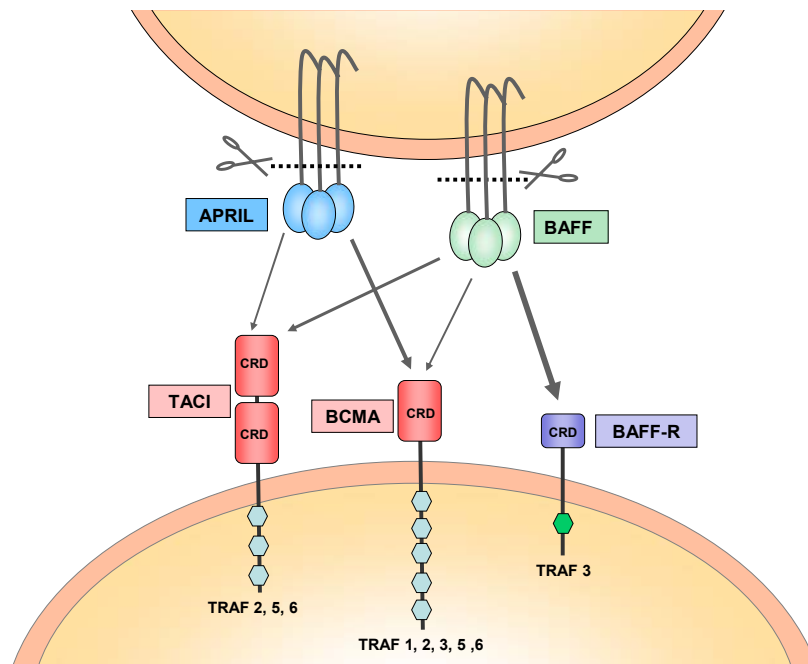
### 2.2.3 BAFF-Rezeptoren

Sowohl BAFF als auch APRIL binden an zwei BCMA (B cell maturation antigen, TNFRSF 17) und TACI (transmembran activator and CAML interactor, TNFRSF 13B) genannte Rezeptoren. BCMA wurde zwar als Translokations-Ereignis in einem humanen T-Zell-Lymphom entdeckt, wird jedoch beinahe ausschließlich auf reifen B-Zellen exprimiert [151, 152]. TACI wurde bei der Suche nach Proteinen, die mit CAML („Calcium modulator and cyclophilin ligand“) interagieren, kloniert und findet sich auf einigen B und T-Zellen [153]. Die Interaktion von BCMA und TACI mit BAFF und APRIL wurde durch kreuzweises Testen aller bekannten TNF-Liganden mit den vorhandenen Rezeptoren nachgewiesen. Da die Zelllinie BJAB zwar BAFF binden kann, bei ihr jedoch keine Expression von BCMA und TACI gezeigt werden konnte und Knockout-Modelle dieser Rezeptoren äußerst unklare Phänotypen aufweisen, wurde bald deutlich, dass noch ein weiterer Rezeptor für BAFF existieren musste [139]. So wurde durch Expressions-Klonierung BAFF-R (TNFRSF 13C) als dritter Rezeptor für BAFF gefunden und damit ein Rezeptor, der selektiv nur BAFF und nicht APRIL bindet [154, 155] (Abb. 2.3). In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zur Vermittlung der BAFF-Funktion als B-Zell-Überlebensfaktor alleine die Interaktion zwischen BAFF und BAFF-R verantwortlich ist [139].

Die extrazelluläre Domäne von TACI besitzt mit zwei CRDs eine typische TNFR-Struktur [153]. Bei BCMA handelt es sich um einen ungewöhnlich kleinen Rezeptor mit nur einer CRD [151]. Der BAFF-R enthält nur eine partielle CDR mit einer völlig atypischen Verteilung der konservierten Cysteinreste und wurde vermutlich deshalb erst so spät entdeckt [155]. Bei allen 3 Rezeptoren handelt es sich um Typ III Membranproteine. Diese zuerst im Viren-genom entdeckten Proteine weisen die selbe Orientierung wie Typ I Membranproteine auf, es fehlt ihnen jedoch eine Leadersequenz [156]. Während es sich bei BAFF-R und TACI um konventionelle Membranproteine handelt, ist BCMA großteils im Golgi-Apparat lokalisiert [157]. Intrazelluläres Rezeptor-Signaling wurde beispielsweise für einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor beschrieben [139]. Der extrazelluläre Anteil von TACI ist so gestaltet, dass eine proteolytische Spaltung an verschiedenen Stellen und somit die Freisetzung eines löslichen



Rezeptors möglich wäre [158]. Während bei konventionellen Mitgliedern der TNFR-Familie zwei CDRs in die Vertiefungen zwischen den Untereinheiten des trimeren Liganden binden, wurde für den BAFF-R gezeigt, dass die BAFF/BAFF-R-Interaktion von einigen wenigen AS in einem 26 AS großen Kernbereich mit  $\beta$ -Haarnadelstruktur vermittelt wird [159]. Die Mäuselinie A/WySnJ trägt eine natürliche Mutation im C-terminalen Teil des BAFF-R. Die Insertion von 21 AS, statt der 8 üblicherweise vorhandenen AS, führt dabei zu einem annähernd vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion und einem mit BAFF-Knockout-Mäusen vergleichbaren Phänotyp [160].



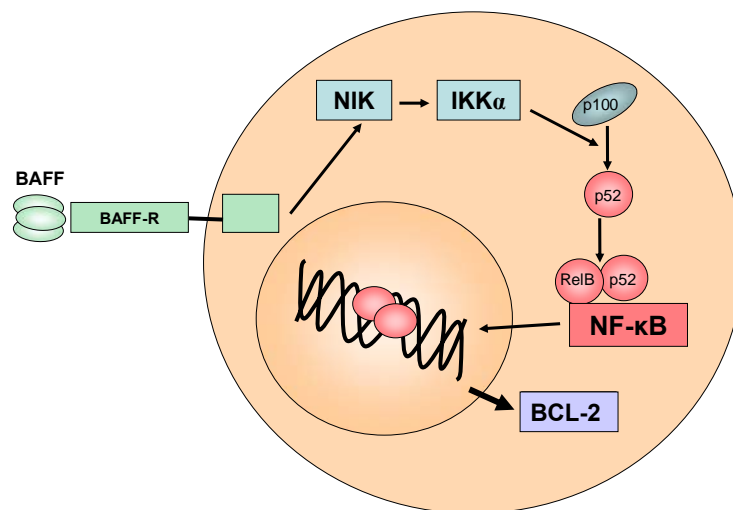
**Abb. 2.3 Die Interaktion zwischen BAFF und seinen verschiedenen Rezeptoren (nach Mackay et al. [161])**

Die Liganden BAFF und APRIL sind als Typ II homotrimere Transmembranproteine dargestellt. Die Schere kennzeichnet die Schnittstelle für eine Furin-Typ-Protease. TACI, BCMA und BAFF-R sind Typ III Transmembranprotein Rezeptoren. Die Dicke der Pfeile steht für die relative Bindungsstärke der Liganden an die Rezeptoren. CRD = Cystein rich domain; TRAF = TNF-receptor-associated factor

## 2.2.4 BAFF-R Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der TNFR-Familie basiert auf der Interaktion mit „Death Domain“ enthaltenden Proteinen, TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren (*TRAFs*) und einigen Rezeptor spezifischen assoziierten Molekülen [162]. Die bislang sechs bekannten TRAFs binden indirekt an spezifische Motive im zytoplasmatischen Teil der TNF-Rezeptoren, wobei TRAF 2, 5 und 6 dabei als Adaptormoleküle zwischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Kinase-Kaskaden im Zellinneren wirken. Daraus resultiert u.a. die Aktivierung von NF $\kappa$ B [126], ei-

nem Transkriptionsfaktor, der neben vielen regulatorischen Funktionen im Immunsystem über die Produktion von Bcl-2 auch anti-apoptische Mechanismen initiiert [163], eine Eigenschaft, die der biologischen Funktion von BAFF sehr gut entspricht. Dies wird besonders deutlich in NF $\kappa$ B-Knockout-Mäusen, deren Phänotyp große Ähnlichkeit mit BAFF defizienten Tieren aufweist [164, 165]. Während jedoch BCMA bis auf TRAF 4 mit allen bislang bekannten TRAFs interagieren kann und TACI-Consensussequenzen für TRAF 2, 5 und 6 besitzt, findet sich im intrazytoplasmatischen Teil des BAFF-R nur eine Bindungsstelle für TRAF 3, einem Faktor, der selbst keine Kinaseaktivierung vermittelt [166-168]. So lag der Schluss nahe, dass über den BAFF-R zwar NF $\kappa$ B aktiviert wird, dies aber nicht über den klassischen, sondern einen alternativen Weg erfolgt.



**Abb. 2.4 BAFF-Signaltransduktion über den alternativen Weg der NF $\kappa$ B-Aktivierung**

Nach Bindung von BAFF an den BAFF-R kommt es in der Zelle zur Aktivierung von NIK. Dies führt zur Phosphorylierung von p100 durch IKK $\alpha$ . Aus dem phosphorylierten p100 wird dann durch Ubiquitin p52 abgespalten, welches mit RelB dimerisiert. Dieses Dimer wandert in den Zellkern und führt dort u.a. zur Transkription von Bcl-2. NIK = NF $\kappa$ B inducing kinase; IKK $\alpha$  = I $\kappa$ B-Kinase  $\alpha$ ;

NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren kommen üblicherweise als Dimere vor, die aus den Mitgliedern der Rel- NF $\kappa$ B-Familie gebildet werden. Dazu gehören p65, c-Rel, p50, und p52. P50 und p52 werden dabei aus den aminoterminalen Enden von p105 bzw. p100 gebildet. Fehlen stimulatorische Signale, sind die NF $\kappa$ B-Komplexe üblicherweise mit den inhibitorischen Proteinen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  oder I $\kappa$ B $\epsilon$  assoziiert und werden so im Zytoplasma zurückgehalten [169]. Erhält die Zelle die entsprechenden Signale, kommt es beim klassischen Aktivierungsweg zur raschen Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex, woraufhin die inhibitorischen Moleküle Ubiquitin-abhängig degradiert werden. Der Zerstörung von I $\kappa$ B folgen die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern und die Transkription der Zielgene. IKK

besteht aus zwei katalytischen (*IKK $\alpha$*  und *IKK $\beta$* ) und einer obligatorischen regulatorischen Untereinheit (*IKK $\gamma$*  oder auch NEMO).

Bei der Signaltransduktion über den BAFF-R kommt es jedoch zunächst zur Aktivierung der „NF $\kappa$ B inducing kinase“ (*NIK*). NIK bindet an p100 und aktiviert dadurch vermutlich *IKK $\alpha$* , die anschließend p100 phosphoryliert [170]. Das phosphorylierte p100 wird dann von Ubiquitin zum aktiven p52 prozessiert und dimerisiert mit RelB zu NF $\kappa$ B2 [163], welches daraufhin in den Kern wandern und die Transkription von z.B. *bcl-2* und *bcl-x* initiieren kann [126] (Abb. 2.4). Die Induktion einer BAFF vermittelten erhöhten *Bcl-2* Expression konnte ebenso gezeigt werden [70, 163, 171] wie erhöhte *Bcl-2* Werte in BAFF transgenen Mäusen [141]. Für die p100 Prozessierung ist eine fortlaufende Protein-Neusynthese notwendig, wobei es sich wahrscheinlich um die kontinuierliche oder induzierte Synthese von NIK und/oder p100 handelt. NEMO wird hingegen für diesen Aktivierungsweg nicht benötigt [163].

TRAF 3 scheint dagegen nicht an der Aktivierung von NF $\kappa$ B beteiligt zu sein, sondern inhibiert die BAFF vermittelte NF $\kappa$ B-Kaskade und wirkt damit als negativer Regulator dieser Signalkette [172].

Neben der verstärkten Expression von *Bcl-2* gibt es Hinweise, dass die vermehrte Expression des anti-apoptotischen *Bcl-x* und die Reduktion der Expression pro-apoptotischer Gene wie *Bak* und evtl. *Blk* (*Bik-like killer*) ebenfalls an der Vermittlung der BAFF-Wirkung beteiligt sind [171, 173, 174].

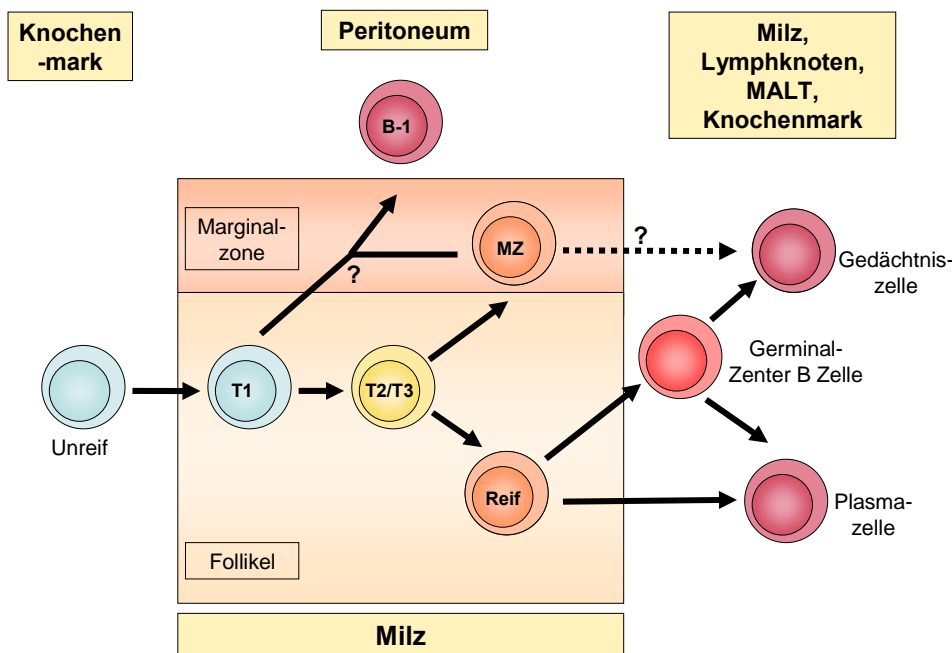
## 2.2.5 BAFF als B-Zell Überlebensfaktor

Die ersten Hinweise, dass BAFF einen Überlebensfaktor für B-Zellen darstellen könnte, gaben die stark vergrößerten B-Zellareale, die bei BAFF transgenen Mäusen gefunden wurde. Bei Mensch und Maus lassen sich in der B-Zellreifung mehrere Stadien unterscheiden. Es wurde schnell deutlich, dass BAFF nicht generalisiert auf alle B-Zellen, sondern selektiv auf bestimmte Reifungsstadien wirkt.

### 2.2.5.1 Stadien der B-Zellreifung bei Mensch und Maus

Die B-Zell-Lymphopoese findet bei Mensch und Maus ausschließlich im Knochenmark statt. Dort werden unreife, sog. „immature“ B-Zellen generiert, die dann über das Blut zur weiteren Reifung in die Milz wandern, wo sie in den B-Zellfollikeln zwei oder drei intermediäre Stadien (T1, T2, T3) durchlaufen, bevor sie zu naiven follikulären B-Zellen reifen [175, 176]. Die immaturen B-Zellen sind mit einer Lebenszeit von zwei bis vier Tagen sehr kurzlebig [177, 178], wohingegen reife B-Zellen mit durchschnittlich sechs Wochen deutlich länger leben.

Aus den naiven B-Zellen reifen in Milz, Lymphknoten, Mucosa assoziiertem Lymphgewebe (*MALT*) und Knochenmark Germinal-Zenter B-Zellen, die sich zu Plasma- und Memory-Zellen differenzieren können (Abb. 2.5). Eine besondere Subpopulation der reifen B-Zellen stellen die Marginalzonen (*MZ*) B-Zellen dar. Sie entstehen entweder aus dem reifen oder intermediären B-Zellpool und sind in der Lage, rasch auf antigene Stimuli zu reagieren [179]. Durch ihre Lokalisation in der Marginalzone haben sie Kontakt zu spezialisierten Antigen präsentierenden Zellen (*APC*) und Zugang zu Antigen aus dem Blut. Während Follikuläre B-Zellen, Plasma- und Memory-Zellen als B2 Linie zusammengefasst werden, findet man im Peritoneum noch eine spezialisierte Subpopulation von B-Zellen, die mit B1 bezeichnet wird. Ob diese Zellen von einer fetalen Linie abstammen und sich selbst erneuern oder aus den konventionellen B2-Zellen entstehen, ist bislang nicht klar [180].



**Abb. 2.5 Stadien der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus (nach Mackay et al. [139])**

Die B-Zell-Lymphopoese findet beim Säuger ausschließlich im Knochenmark statt. Unreife B-Zellen wandern aus dem Knochenmark über das Blut zur weiteren Reifung in die Milz. Hierbei bilden follikuläre (reife), Germinalzenter- und Plasmazellen die B2 Linie. Eine zweite im Peritoneum auftretende Linie wird mit B1 bezeichnet. Vermutlich stammen diese Zellen entweder von T1- oder Marginalzonen-B-Zellen der Milz ab. Zur Bildung germinaler Zentren mit Differenzierung der B-Zellen zu Gedächtnis- und Plasmazellen kann es in Milz, Lymphknoten und Mucosa assoziiertem lymphatischem Gewebe (*MALT*) kommen. Plasmazellen können sich anschließend im Körper verteilen und sind in Knochenmark, peripheren Geweben und der Milz zu finden.

### 2.2.5.2 BAFF in der B-Zellentwicklung

Alle bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass BAFF weder auf die Bildung unreifer B-Zellen im Knochenmark noch auf das T1-Stadium dieser Zellen einen Einfluss hat [137, 158, 181]. Die Entwicklung der nachfolgenden Differenzierungsstadien, v.a. der T2- und MZ-B-Zellen, ist jedoch zum großen Teil von diesem Zytokin abhängig. Bei BAFF transgenen Tieren findet sich eine massive Zunahme der peripheren B-Zellzahl, einhergehend mit einer deutlichen Vergrößerung von Milz, Lymphknoten und Peyer'schen Platten. Genauere Analysen der B-Zellen ergaben, dass die gravierenden Veränderungen v.a. durch die Zunahme von T2- und MZ-Zellen bedingt sind [141, 171, 182]. Dagegen führt eine Behandlung von Mäusen mit BCMA-Fc oder TACI-Ig [158], also einem löslichen, die BAFF/BAFF-R-Interaktion blockierenden Rezeptor, zu einer signifikanten Abnahme der peripheren B-Zellfrequenz [183]. Auch in diesen Experimenten blieb die Anzahl von immaturren und T1 Zellen unbeeinträchtigt, während nur noch wenige Follikuläre und MZ-B-Zellen gefunden wurden. Da bei Behandlungen mit löslichem BCMA und TACI neben BAFF auch APRIL inhibiert wird, konnte erst durch Generierung von BAFF-Knockout-Stämmen bestimmt werden, ob die beobachteten Effekte von BAFF alleine oder zusammen mit APRIL vermittelt werden. Es zeigte sich, dass auch bei BAFF<sup>-/-</sup>-Tieren schwere Verluste der peripheren B-Zellpopulationen auftraten. Histologisch konnten diese der Marginalzone und den B-Zellfollikeln zugeordnet werden, während die B-Zellareale in Kontakt mit T-zellreichen Zonen, also den periarteriellen Scheiden der Milz und den parakortikalen Bereichen der Lymphknoten, annähernd denen von Kontrolltieren glichen [137, 181]. Anhand dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei Fehlen von BAFF die B-Zellentwicklung im Stadium T1 blockiert wird [184].

Bei der *in vitro* Kultur von B-Zellen aus primären und sekundären lymphatischen Organen konnte mit BAFF die Überlebenszeit von T2-Zellen selektiv verlängert werden [171]. Werden die Zellen mittels Antikörpern gegen IgM zusätzlich noch über den BCR stimuliert, kommt es bei einigen Zellen sogar zur Differenzierung zu reifen B-Zellen [171], was für eine zusätzliche Funktion von BAFF als Reifungsfaktor spricht. Ob MZ-B-Zellen BAFF für ihre Differenzierung benötigen, oder der Verlust dieser Zellpopulation bei Fehlen von BAFF mit dem Fehlen von T2-Zellen zusammenhängt, ist bislang ungeklärt. Die Beobachtungen sprechen jedoch dafür, dass T2-Zellen die Vorläufer für MZ-B-Zellen sind [139]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die Zunahme von T2-Zellen unter BAFF-Einwirkung nicht durch Proliferation der Zellen zustande kommt [182, 185].

### 2.2.5.3 BAFF in der Immunantwort

Frühe *in vitro* Experimente haben einen kostimulatorischen Effekt von BAFF in B-Zell-Aktivierungs-Assays mit anti-IgM-Antikörpern gezeigt. In diesen Ansätzen entspricht die Wirkung von BAFF ungefähr den Ergebnissen, die durch Aktivierung der Zellen mit CD40L oder IL-4 erzielt werden. Die Resultate verschiedener Versuche weisen zwar in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und Stimulans einige Unterschiede auf, alle zeigen jedoch, dass BAFF alleine nicht in der Lage ist, B-Zellproliferation zu induzieren [116]. Daher stellt das, von BAFF übermittelte, proliferative Signal vermutlich eher eine Konsequenz der höheren Zahl lebender, in den Zellzyklus eintretender Zellen, als eine echte Kostimulation dar.

Die Injektion von BAFF führt bei Mäusen, wahrscheinlich ebenso durch die höhere B-Zellzahl bedingt, zu einer Verstärkung der T-Zell abhängigen und T-Zell unabhängigen Immunantwort. Hierbei kommt es neben einer Zunahme der Plasmazellen auch zur Erhöhung der Ig-Serumkonzentrationen, v.a. von IgM und IgA [117, 186], wobei andere Arbeiten auch einen Anstieg von IgG zeigen konnten [141]. Dem entsprechend führt die Inhibition von BAFF *in vivo* mit BCMA-Ig und TACI-Ig neben der Reduktion der B-Zellzahl auch zu einer Reduktion der T-Zell abhängigen und der T-Zell unabhängigen Antikörperproduktion [154, 187]. Voneinander unabhängig konnte bei diesen Tieren jedoch die Bildung einer geringen Menge affinitätsgereifter Antikörper und das Stattfinden somatischer Hypermutation gezeigt werden [154, 188]. Dies spricht ebenso für das Vorhandensein einiger reifen B-Zellen in BAFF defizienten Tieren, wie die Tatsache, dass BAFF<sup>-/-</sup>-Tiere geringe Mengen antigenspezifischer IgG- und IgA-Antikörper produzieren [137].

Zur Aktivierung einer humoralen Immunantwort kommt es erst, wenn reife B-Zellen durch Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen aktiviert wurden und daraufhin beginnen, sich in germinalen Zentren (GC) zu teilen. Zur Klärung der Frage, ob BAFF auch für das Überleben dieser proliferierenden reifen B-Zellen eine Rolle spielt, trugen Untersuchungen an A/WySnJ- und BAFF<sup>-/-</sup>-Mäusen bei. Sie zeigten, dass BAFF zur Aufrechterhaltung aktiver germinaler Zentren notwendig ist. Sowohl bei den BAFF-R defekten A/WySnJ-Tieren als auch bei den BAFF-Knockouts kommt es nach antigener Stimulation zur offensichtlich BAFF unabhängigen Formierung von GCs, die in ihrer Anzahl annähernd der von Wildtyp-Tieren entsprechen. Nach relativ kurzer Zeit verschwinden bei den BAFF defizienten Tieren jedoch die größeren GCs, bis nach bereits 12 Tagen keine mehr zu finden sind. Auffällig dabei ist, dass den induzierten germinalen Zentren das charakteristische Netzwerk reifer follikulärer Dendritischer Zellen (FDC) fehlt [189]. Da diesen Zellen eine zentrale Funktion bei der GC

Formierung nachgesagt wird [190, 191] und zur Lymphfollikel-Ausbildung von B-Zellen produziertes Lymphotoxin (*LT*) essentiell ist [192-194], könnte die mangelnde *LT*-Produktion als sekundäre Folge der BAFF-Defizienz für den primären Defekt in der Ausbildung germinaler Zentren verantwortlich sein [189].

Die Generierung von Ig-sezernierenden Zellen (*ISC*) aus Gedächtniszellen erfordert die Interaktion zwischen antigenspezifischen B-Zellen, T-Zellen und Dendritischen Zellen (*DC*). Bei der Kultivierung von humanen Gedächtniszellen stellte sich heraus, dass auch die Überlebensrate dieses Differenzierungsstadiums durch BAFF erhöht wird. Der Effekt wurde besonders deutlich in Kulturen, in denen es durch Präaktivierung mit CD40L und IL-2/IL-10 schon zur Differenzierung von *ISCs* gekommen war [195]. Auch hier wurde die erhöhte Viabilität durch Hemmung der Apoptose erzielt, allerdings offensichtlich nicht über die vermehrte Expression von Bcl-2, sondern durch die Modulierung der Expression von anderen pro- und anti-apoptischen Genen wie Bcl-x, A1 [173] oder Blk [174]. Während der Differenzierung von Gedächtniszellen zu Plasmablasten und schließlich der terminalen Form der Plasmazellen verändert sich die Expression einiger Oberflächenrezeptoren. Überraschenderweise kommt es dabei neben der verminderten Expression von CD40 [196] und dem BAFF-R zeitgleich zur Induktion der BCMA-Expression. Diese signifikant höheren Werte der BCMA-Expression auf Plasmazellen im Vergleich zu immaturren und ruhenden maturaen B-Zellen [195, 197] und die Tatsache, dass durch Zusatz von APRIL die Überlebensrate der Plasmazellen ebenfalls gesteigert werden konnte [195], legen den Schluss nahe, dass BCMA zwar nicht für die Regulation der B-Zell Reifung nötig ist, die Wirkung von BAFF auf Plasmazellen dagegen eher über BCMA als den BAFF-R vermittelt wird.

Der Immunglobulin-Klassenwechsel ist ein essentieller Bestandteil jeder protektiven humoralen Immunantwort. Denn während reife B-Zellen nach dem ersten Antigenkontakt zunächst IgM sezernieren, kommt es im folgenden zur Substitution der Konstanten Region von IgM durch diejenige von IgG, IgA oder IgE [198, 199]. Mediert wird der Wechsel des Immunglobulin-Isotyps durch die sog. „class switch DNA recombination“ (CSR). Dieser Vorgang wird üblicherweise in den germinalen Zentren T-Zell abhängig durch die Interaktion von CD40L auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem CD40-Molekül auf B-Zellen eingeleitet. Durch Kontakt mit viralen Glycoproteinen und bakteriellen Polysacchariden ist jedoch auch ein T-Zell unabhängiger Wechsel zu IgA und IgG möglich. Dieser findet durch Interaktion zwischen APCs und B-Zellen in der Marginalzone der Milz oder der Lamina propria des Darmes statt und vermittelt einen besonders raschen Schutz vor eindringenden Pathogenen [200]. *In vitro* Versuche haben ergeben, dass APCs nach Stimulation mit Interferon (*IFN*)  $\alpha$ , *IFN* $\gamma$  oder LPS die Expression

von BAFF und APRIL verstärken und dadurch einen CD40 unabhängigen Klassenwechsel bewirken können. Während beim T-Zell abhängigen Klassenwechsel die Aktivierung der B-Zelle durch Quervernetzung des BCR zur Einleitung der CSR essentiell ist, ist dies in BAFF und APRIL aktivierten B-Zellen nicht notwendig. Zu welchem Isotyp der Wechsel stattfindet hängt dabei, wie bei der T-Zell abhängigen Form, vom umgebenden Zytokinmilieu ab [201]. Zur Differenzierung in Antikörper sezernierende plasmazytoide Zellen benötigen aber auch BAFF aktivierte Zellen ein zusätzliches Signal über den BCR. Ebenso erfordert die Antikörpersekretion dieser Zellen die Anwesenheit von IL-15, einem Zytokin, das von DCs und Makrophagen produziert wird und auch in CD40 aktivierten B-Zellen die Antikörperproduktion anregt [202, 203].

### 2.2.6 BAFF und BAFF-R-Expression

Um die Funktion eines Zytokins verstehen zu können, ist es essentiell zu wissen, von welchen Zellen es exprimiert wird, ob es in auto-, para- oder endokriner Form wirkt und welche Zellen Rezeptoren für das Zytokin tragen.

Die ersten Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten, dass BAFF-mRNA in Milz, Lymphknoten und PBLs in größerer Menge vorhanden ist. Eine schwache Expression ist zudem in Thymus, Herz, Plazenta, Dünndarm und Lunge zu finden [116, 117]. Dies wies bereits darauf hin, dass Zellen aus lymphoiden Geweben die Hauptquelle für BAFF darstellen. Analysen der Oberflächenexpression ergaben daraufhin, dass BAFF von Zellen myeloiden Ursprungs exprimiert wird, also Monozyten, Makrophagen und aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen, nicht jedoch von naiven oder aktivierten B und T-Zellen [117]. Die Regulation des Immunsystems erfolgt durch ein vielschichtiges Zytokin-Netzwerk und so wird auch die Produktion von BAFF durch verschiedene andere Zytokine beeinflusst. In der Membran von Dendritischen Zellen ist nach Stimulation der Zellen mit  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$  oder CD40L deutlich mehr BAFF nachzuweisen [201]. Zusätzlich konnte auch ein Einfluss von IL-10 und IL-4 auf die Expression von löslichem und membrangebundenen BAFF in Monozyten und DCs gezeigt werden. Beide Zytokine haben eine aktivierende Wirkung auf B-Zellen, gelten jedoch als inhibitorische Zytokine für Monozyten. Dennoch konnte für IL-10 eine ähnliche Verstärkung der BAFF-Expression nachgewiesen werden, wie für  $IFN\gamma$ . Während aber durch  $IFN\gamma$  die Transkription vom BAFF angeregt wird, d.h. vermehrt BAFF-mRNA gebildet wird, ist dies für IL-10 nicht der Fall. Die Zunahme der BAFF-Proteinmenge durch IL-10 scheint eher durch einen translationalen oder posttranslationalen Mechanismus zustande zu kommen und kann durch IL-4 komplett blockiert werden [204].



Überraschenderweise wird BAFF auch von humanen neutrophilen Granulozyten exprimiert. So findet man bereits bei unstimulierten Granulozyten eine basale Menge an sezerniertem BAFF. Zur Steigerung der BAFF-Sekretion kommt es nach Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$ , die höchste Expressionsrate wird jedoch durch G-CSF erzielt. Im Gegensatz zu Monozyten und Dendritischen Zellen wird BAFF von neutrophilen Granulozyten aber nicht in die Membran eingebaut und dann proteolytisch gespalten, sondern bereits intrazellulär prozessiert und sofort sezerniert [205].

Die Feststellung, dass DCs, Makrophagen und neutrophile Granulozyten BAFF v.a. nach proinflammatorischen Stimuli produzieren, diese Zellen in der Milz aber in der Peripherie der B-Zellfollikel und nicht in direkter Nähe zu den meisten B-Zellen lokalisiert sind, warf die Frage auf, ob unter nicht entzündlichen Bedingungen nicht noch eine weitere Quelle für das Zytokin existiert. Versuche mit Knochenmarks-Chimären aus bestrahlten Tieren und BAFF<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen alleine nicht ausreichend BAFF zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Zahl peripherer B-Zellen produzieren können. Dafür ist eine Population strahlungsresistenter Stromazellen verantwortlich. Möglicherweise könnten dies die spezialisierten Stromazellen der Milz, die follikulären Dendritischen Zellen sein [206]. Diese Zellen sind strahlungsresistent, finden sich in der Nähe von sich entwickelnden B-Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Milzarchitektur [207]. Es scheint daher möglich, dass die Interaktion zwischen Follikulär Dendritischen Zellen nicht nur für die Lokalisierung der B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen, sondern auch für die von BAFF abhängige Reifung und das Überleben der B-Zellen verantwortlich ist.

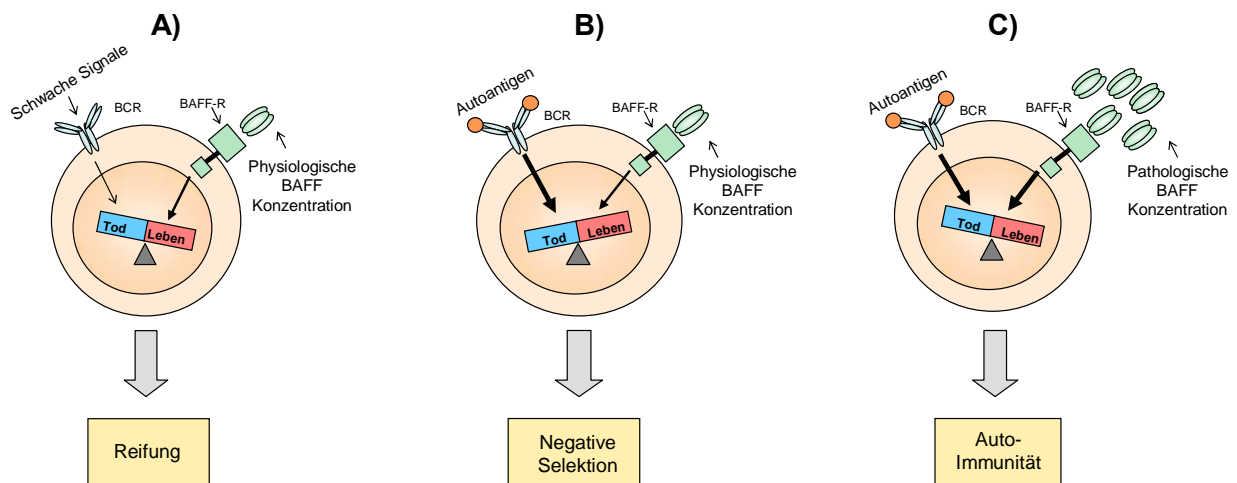
Wie bereits ausgeführt, findet sich der Hauptrezeptor für BAFF, der BAFF-R abgesehen von einer schwachen Expression auf ruhenden T-Zellen [160] ausschließlich auf B-Zellen. Sein Expressionsmuster spricht für die Theorie, dass nur bestimmte B-Zell-Reifungsstadien durch BAFF beeinflusst werden [139, 182]. So zeigen neueste Daten, dass der BAFF-R in der Membran der B-Zell-Vorläuferstadien im Knochenmark vollständig fehlt. Auf unreifen und T1-Zellen zeigt sich bereits eine äußerst niedrige Expression des Rezeptors, weshalb vermutet werden kann, dass die Expression des BAFF-R mit der Expression von IgM in der Zellmembran (*sIgM*) korreliert. Die höchste Expression des Rezeptors lässt sich bei T2-Zellen, B-Zellen der Marginalzone und reifen B-Zellen im Knochenmark nachweisen [208]. Folglich bestätigt der Beginn der BAFF-R-Expression bei unreifen B-Zellen und die Erhöhung der Rezeptordichte mit fortschreitender Differenzierung die bisherige Einteilung in BAFF sensitive und BAFF unabhängige B-Zell-Entwicklungsstufen.

### 2.2.7 BAFF und periphere Toleranz

Immuntoleranz stellt sicher, dass das Immunsystem nicht gegen körpereigene Antigene reagiert, den Organismus aber dennoch gegen Pathogene verteidigen kann. Mittlerweile wurden viele Mechanismen identifiziert, die die Generierung von autoreaktiven Lymphozyten verhindern können [209]. Besonders wichtig sind dabei Faktoren, die das Überleben von Zellen regulieren. Abweichungen hierin können zum Entstehen von Autoimmunerkrankungen führen. Daher ist es nicht überraschend, dass BAFF transgene Tiere neben den oben aufgeführten Merkmalen auch Immunglobulin medierte Autoimmunerkrankungen entwickeln [120, 141, 186]. Alle Linien BAFF transgener Mäuse zeigen eine B-Zell Hyperplasie und eine Hypergammaglobulinämie. Die Tiere weisen erhöhte Serumspiegel für IgG, IgM, IgE und IgA auf und haben vergrößerte Milzen, Lymphknoten und Peyer'sche Platten. Weiterhin finden sich neben zirkulierenden Immunkomplexen auch Antikörper gegen Einzel- und Doppelsträngige DNA und Histone. Ebenfalls betroffen sind die Nieren. Hier zeigen sich Anzeichen einer Vaskulitis und deutlich vergrößerte Glomeruli [120, 141, 186]. Diese Merkmale entsprechen exakt denen, einer bei Mensch und Tier bekannten Autoimmunerkrankung, dem Systemischen Lupus Erythematosus (*SLE*). Werden BAFF transgene Tiere älter, entwickeln sie ein weiteres Krankheitsbild, das dem beim Menschen vorkommenden Sjögren's Syndrom stark ähnelt. Kennzeichnend für diese Krankheit sind durch Entzündungsprozesse und Leukozyteninfiltrate vergrößerte Speicheldrüsen, die aufgrund der Zerstörung der Drüsenzellen nur noch geringe Mengen an Speichel produzieren [210]. Bezeichnenderweise wurden bei Patienten mit SLE, Sjögren's-Syndrom und Rheumatoider Arthritis erhöhte Mengen BAFF im Serum gefunden, wobei die Höhe der BAFF-Spiegel mit der Schwere der Krankheit assoziiert ist [211].

Die Immuntoleranz wird an kritischen Punkten der B-Zellentwicklung sowohl zentral im Knochenmark als auch in der Peripherie kontrolliert. Aufgrund der vorhandenen Daten scheint eine Rolle von BAFF in der zentralen Immuntoleranz sehr unwahrscheinlich, wegen die periphere Toleranz offensichtlich durch vermehrte Expression des Zytokins beeinträchtigt wird. Im Knochenmark werden die unreifen B-Zellen anhand der Expression eines funktionellen BCR auf ihrer Oberfläche selektiert (positive Selektion). Nur sIg<sup>+</sup> Zellen wandern aus dem Knochenmark aus, weshalb in der Peripherie keine sIg<sup>-</sup> B-Zellen gefunden werden [212, 213]. Zwischen dem Austritt aus dem Knochenmark und dem Einwandern in die Milz verschwinden ca. 80% der kurzlebigen unreifen B-Zellen, höchstwahrscheinlich durch negative Selektion an Autoantigenen. Das bedeutet, dass Zellen, deren BCR körpereigene Antigene erkennt, in Apoptose getrieben werden [214]. Generell lassen sich bei der Reaktion

von B-Zellen auf Stimulation durch den BCR verschiedene Phasen unterscheiden. So führt eine Quervernetzung des BCR *in vitro* bei unreifen B-Zellen zur Apoptose [214], während reife B-Zellen auf den gleichen Reiz zu proliferieren beginnen [177]. *In vivo* werden Aktivierung und Selektion der B-Zellen durch eine Vielzahl weiterer Signale reguliert, u.a. durch BAFF. Da BAFF über die gesteigerte Expression anti-apoptotischer Faktoren, wie bcl-2, B-Zellen vor der Apoptose bewahren kann und im Falle einer Überproduktion zum Entstehen von B-Zell getriebenen Autoimmunerkrankungen führt, erklärt man sich den Einfluss von BAFF auf die periphere Toleranz folgendermaßen (Abb. 2.6):



**Abb. 2.6 Die Rolle von BAFF in der peripheren Toleranz und bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen**

Schwache Signale über den BCR und die Wirkung einer physiologischen BAFF-Konzentration über den BAFF-R führen zur Reifung der B-Zelle (A). In Gegenwart physiologischer BAFF-Konzentrationen führt die starke Stimulation des BCR über ein Autoantigen zur Apoptose der B-Zelle (B). Pathologisch hohe BAFF-Konzentrationen können die Apoptose der B-Zelle nach Erkennung eines Autoantigens verhindern und damit zum Überleben autoimmuner Zellen führen (C).

Erhalten B-Zellen schwache Apoptose-Signale, entweder durch niedrig affine Bindung an ein Antigen oder basales Signaling über die Signaltransduktionsmoleküle des BCR-Komplexes (Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ ) [215], so können physiologische BAFF Konzentrationen die Zellen vor Apoptose retten und ihre Reifung ermöglichen. Bei der Bindung einer B-Zelle an ein Autoantigen erhält diese starke „Todes-Signale“, die durch die anti-apoptotische Wirkung physiologischer BAFF-Konzentrationen nicht ausgeglichen werden können. Diese Zellen werden negativ selektiert und sterben. Bei einer Überproduktion von BAFF kann es jedoch dazu kommen, dass selbst starke, durch ein Autoantigen vermittelte, Apoptose-Signale unterdrückt werden, was zum Überleben und zur Reifung von autoreaktiven B-Zellen und somit zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung führt [161].

Da die BAFF-Expression in entzündeten Geweben erhöht ist, könnte BAFF auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen als Folge chronischer Entzündungen eine Rolle zukommen. Hierfür sprechen die massiv erhöhten BAFF-Spiegel in Serum und Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis [216].

Die bisherigen Erkenntnisse machen BAFF zu einem vielversprechenden Ziel für therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Behandlungen mit TACI-Ig konnten in SLE-Tiermodellen die Schwere der Krankheit reduzieren oder sogar ihren Ausbruch verhindern [120, 181], weshalb große Hoffnungen in die Verwendung von BAFF-Antagonisten in der SLE-Behandlung gesetzt und erste Antikörper gegen BAFF bereits in klinischen Studien eingesetzt werden [161].

### 2.2.8 TACI als inhibitorischer BAFF-Rezeptor

Alle bisherigen Daten sprechen dafür, dass die Wirkung von BAFF als B-Zell-Überlebensfaktor alleine BAFF-R vermittelt ist. Die Funktion von TACI, neben BAFF-R und BCMA der dritte Rezeptor für BAFF, wird dagegen kontrovers diskutiert. TACI wird nicht nur auf B-Zellen sondern auch auf ruhenden und aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden [160]. Interessanterweise stellte man fest, dass BAFF zwar nicht in der Lage ist, die Viabilität von unstimulierten T-Zellen zu erhöhen, jedoch zusammen mit einer Stimulation des T-Zell Rezeptors einen kostimulatorischen Effekt ausüben kann [217]. Da die Expression von TACI bei der Aktivierung von T-Zellen verstärkt wird, die schwache Expression von BAFF-R dagegen aber völlig verschwindet, scheint TACI für die Kostimulation verantwortlich zu sein. Im Gegensatz zur aktivierenden Wirkung auf T-Zellen steht die eindeutige Hemmung der B-Zellproliferation *in vitro*, wenn TACI auf diesen mittels agonistischer Antikörper aktiviert wird [218]. Und während ruhende B-Zellen vergleichsweise mehr BAFF-R als TACI exprimieren, kommt es nach Aktivierung der Zellen mit anti-IgM und BAFF zur selektiven Zunahme von TACI in der Zellmembran. TACI-Knockout-Mäuse (TACI<sup>-/-</sup>) zeigen eine deutliche Zunahme der B-Zellfrequenz in den lymphatischen Organen, massive Lymphozyten-Infiltrationen in Leber und Niere, vermehrte Lymphombildung und schwere autoimmune Nephritiden, die großteils zum Tod führen. Dies entspricht einer Verstärkung des Phänotyps von BAFF transgenen Tieren. Bisherige Erkenntnisse lassen folglich darauf schließen, dass es sich bei TACI um einen inhibitorischen BAFF-Rezeptor handelt, der für die Regulation der B-Zellfunktion *in vivo* notwendig ist und nach Aktivierung der B-Zellen zur Terminierung der B-Zellantwort beiträgt [218].

### 3 Zielsetzung

Nachdem in einer EST-Datenbank eine cDNA-Sequenz identifiziert werden konnte, die eine sehr hohe Homologie zu Säuger BAFF aufweist, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob diese Sequenz für ein funktionelles Zytokin kodiert und gegebenenfalls, dessen Funktion näher zu charakterisieren. Hierzu sollte das Zytokin in verschiedenen Expressionssystemen rekombinant hergestellt werden, um eine biochemische Analyse des Proteins und seiner Interaktion mit potentiellen Rezeptoren zu ermöglichen. Die anschließende Untersuchung der biologischen Aktivität sollte in einem ersten Schritt nach Etablierung geeigneter Testsysteme *in vitro* erfolgen. Da die B-Zellreifung beim Huhn bedeutende Unterschiede zu der des Säugers aufweist, sollte in einem zweiten Schritt mittels geeigneter *in vivo* Substitutions- und Inhibitionsexperimente die Funktion des Zytokins weitergehend charakterisiert werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

#### 4.1.1 Hühner

Für die Versuche mit primären Zellen wurden Blut und Organe von H.B19–Hühnern (MHC I Haplotyp B<sup>19/19</sup>) und M11-Hühner (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp) verwendet. Die B19-Tiere stammen aus der institutseigenen Zucht, die M11-Tiere wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee bezogen. Die Eier wurden unter Standardbedingungen ausgebrütet und die Tiere in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen gehalten. Sie erhielten handelsübliches Alleinfutter und Wasser ad libitum.

Die *in vivo* Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchsnummer 209.1/211-2531-46/03 genehmigt.

#### 4.1.2 Kaninchen

Zur Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurden Kaninchen immunisiert, die freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Genehmigung der Immunisierungen erfolgte unter der Nummer 211-2531.6-1412001 durch die Regierung von Oberbayern.

### 4.2 Gewinnung von primären Hühnerleukozyten

#### 4.2.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

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

8,0 g	Natriumchlorid (NaCl) <sup>1*</sup>
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumchlorid (KCl) <sup>1</sup>
ad 1000 ml Aqua dest.	

---

\* Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen

pH-Wert mit HCl bzw. NaOH auf 7,2 eingestellt, für die Verwendung in der Zellkultur autoklaviert.

### **Ficoll-Paque<sup>2</sup>**

#### **Heparinlösung (500 U/ml)**

1 ml          Heparin-Natrium 20.000<sup>3</sup>  
ad 40 ml     RPMI 1640<sup>4</sup>

### **Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>**

## **4.2.2 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL)**

Je nach Bedarf wurden 10 oder 20 ml Spritzen mit 0,1 bis 0,2 ml Heparinlösung beschichtet. Die Blutentnahme erfolgte aus der rechtsseitigen V. jugularis. PBL wurden anschließend durch Slow Speed-Zentrifugation gewonnen [219]. Dabei wurde das heparinisierte Vollblut bei Raumtemperatur (*RT*) 20 min bei 60xg zentrifugiert. Anschließend wurden die auf den Erythrozyten liegenden Leukozyten durch vorsichtiges Rühren mit einer Pasteurpipette im Plasma aufsuspendiert, mit diesem abgenommen und zweimal mit PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 225xg für 10 min gewaschen. Nach einer Lebend/Tot Färbung durch Zusatz von 50% Trypanblau wurden die Zellen mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer beurteilt und gezählt.

## **4.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus Organen**

Zur Organentnahme wurden die Hühner nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Die Organe wurden sofort nach Entnahme in 4°C kaltes PBS überführt und auf Eis gestellt.

Zur Isolierung der CT wurden die Darmstücke mit einer Schere der Länge nach aufgeschnitten und unter mehrfachem Mediumwechsel zur Entfernung von Inhalt und Schleim für ca. 15 min auf einem Schüttler gewaschen. Zur weiteren Präparation wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Metallsieb (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm) gedrückt und die erhaltene Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für ca. 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand abgenommen, bei 4°C und 225xg für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und auf 10 ml einer Ficoll-Paque-Lösung geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtezentrifugation bei *RT* mit 600xg, konnten die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit kaltem PBS gewaschen werden. Auch hier wurde die Zellzahl nach einer Trypanblau-Färbung (s. 4.2.2) bestimmt.

Zur Gewinnung von embryonalen Zellen wurden die Organe nach Entnahme zwischen zwei Objektträgern zerkleinert. Die weitere Präparation erfolgte analog zu der oben beschriebenen Technik, jedoch wurden die Zellpellets in 3 bis 5 ml PBS resuspendiert und die Dichtezentrifugation in 15 ml Röhren auf lediglich 3 ml Ficoll-Paque-Lösung durchgeführt.

## 4.3 Kultivierung von Zellen

### 4.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze

#### Standardmedium (10% FCS)

445 ml	RPMI 1640 mit 0,532 g/l stabilem Glutamin <sup>3</sup> (im Folgenden RPMI)
50 ml	fetales Kälberserum <sup>3</sup> (fetal calf serum ( <i>FCS</i> )), 30 min bei 57°C inaktiviert)
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>3</sup> (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

Lagerung: FCS und Penicillin-Streptomycin wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 293T- Medium

445 ml	DMEM mit 0,532 g/l stabilem Glutamin, 4% Glucose <sup>3</sup>
10 ml	FCS <sup>3</sup>
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>3</sup>

#### PBS-EDTA

200 mg	Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra-Natrium Hydrat ( <i>EDTA</i> ) <sup>5</sup>
ad 1 l	PBS (siehe 4.2.1)

#### G418-Stammlösung 50mg/ml

250 mg	G418 <sup>5</sup>
ad 5 ml	PBS

#### Einfriermedium

45 ml	FCS <sup>3</sup>
5 ml	Dimethylsulfoxid ( <i>DMSO</i> ) <sup>1</sup>

Lagerung: DMSO wurde bei RT gelagert, das Einfriermedium bei -20°C

#### ConA-Stammlösung

15 mg	Concanavalin A ( <i>ConA</i> ) <sup>2</sup>
ad 10 ml	RPMI 1640 <sup>3</sup>

Lagerung: in Aliquots von 500 µl bei -20°C, Reste nach dem Auftauen verworfen.



**ConA-Medium (0,5% FCS)**

0,25 ml FCS<sup>3</sup>  
 0,5 ml Penicillin-Steptomycin Lösung  
 ad 50 ml RPMI

**4.3.2 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
293T	Nierenfibroblasten	Mensch	293T	[220, 221]
DT40	B-Zellen	Huhn	Standard	[222]
RP9	B-Zellen	Huhn	Standard	[223]
2D8	B-Zellen	Huhn	Standard	[224]

**4.3.3 Kultivierung von Zellen**

In Suspension wachsende Hühner-Zelllinien bzw. primäre Zellen wurden in der gewünschten Dichte in Standardmedium aufgenommen und bei 40°C kultiviert. Die Teilung dieser Zellkulturen erfolgte entweder durch Zentrifugation und erneutes Einstellen der Zelldichte oder durch Verdünnen der Zellsuspension mit frischem Medium.

Von den adhärent wachsenden 293T- Zellen wurde zur Teilung das Medium vollständig abgenommen und der Zell-Monolayer zur Entfernung von FCS Resten einmal kurz mit 37°C warmem PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit PBS-EDTA (37°C) bedeckt und ca. 10 min lang bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut in der gewünschten Dichte in 293T-Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert.

**4.3.4 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 1 bis 1,8 ml in entsprechende Gefrier Röhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol haltigen Einfrierbox (Abkühlung 1°C/min) bei -80°C eingefroren. Zur Lagerung bis zu 1 Jahr verblieben die Zellen bei -80°C, für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

**4.3.5 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dann wurden 50 ml kaltes

PBS zugegeben, die ersten 10 ml tropfenweise, um das zellschädigende DMSO langsam auszuverdünnen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225xg, 10 min, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in ca. 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben.

#### **4.3.6 Herstellung von ConA stimulierten Leukozyten (ConA-Blasten)**

Zur Stimulierung von Leukozyten mit Concanavalin A wurden die Zellen in ConA-Medium aufgenommen; auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt mit 10 µg ConA/ml Medium bei 40°C kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das ConA-Medium von den semiadhärenten Blasten vorsichtig abgenommen und durch frisches Standardmedium ersetzt. Waren die Zellen nicht adhärent, wurden sie aus den Zellkulturflaschen entnommen, abzentrifugiert (10 min, 225xg) und für die weitere Kultivierung in Standardmedium resuspendiert. Die Analyse der Blasten erfolgte nach 48 Stunden.

#### **4.4 Klonierung von chBAFF cDNA**

Die Klonierung des Zytokins ist ausführlich in der Arbeit von Schneider, Kothlow et al. „*Chicken BAFF – a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*“ beschrieben [221] und wurde im Labor von Prof. Dr. Peter Staeheli, Universität Freiburg, durchgeführt.

#### **4.5 RNA-Präparation**

Alle Arbeiten wurden mit RNase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Wiederverwendbare Geräte und Gegenstände wurden nach Benutzung für mindestens eine Stunde mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gespült oder nach Eintauchen in 96% Ethanol abgeflammt.

##### **4.5.1 Material**

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lagerung der Reagenzien bei RT.

**Trizol® Reagenz**<sup>7</sup>

Lagerung: 4°C

**Chloroform ad analysis**<sup>8</sup>

**DEPC-Wasser**

1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)<sup>5</sup>  
ad 1000 ml Aqua dest.

Inkubation für 1 Stunde bei 37°C, autoklavieren;

**Isopropanol<sup>8</sup>****70% Ethanol**

70 ml Ethanol absolut<sup>8</sup>  
30 ml DEPC-Wasser

**4.5.2 Durchführung**

Zur RNA-Isolierung aus primären Zellen wurden die jeweiligen Organe (bzw. je nach Größe nur Teile davon) nach Entnahme sofort in einem Handhomogenisator<sup>20</sup> unter Zugabe von 1-3 ml Trizol homogenisiert und in 1 ml Fraktionen in 2 ml Eppendorfcups überführt.

Bei Zelllinien wurden  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen gewonnen, zentrifugiert (10 min, 225xg, 4°C) und das trockene Zellpellet mittels einer Spritze mit aufgesetzter 20G Kanüle in 1 ml Trizol resuspendiert.

Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, kurz geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert, wodurch die organische von der RNA-haltigen wässrigen Phase getrennt wurde. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Probengefäß transferiert und mit 500 µl Isopropanol versetzt, nach kurzem Schütteln, zunächst 10 min bei RT und anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der RNA. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 4°C, 12.000xg) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 4°C mit 7500xg zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen und nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration ( $OD_{260}$ ) bei -80°C gelagert.

## 4.6 Northern Blot

### 4.6.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden mittels „Random-Priming“

#### 4.6.1.1 Material

**Prime it II® Random primer labeling Kit** <sup>22</sup>

$\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP<sup>2</sup>

**Klenow-Enzym 5U/ $\mu$ l** <sup>22</sup>

**EDTA 0,5 M**

186,1 g EDTA

ad 700 ml Aqua bidet.

**Sephadex-G50 Säule**<sup>2</sup>

#### 4.6.1.2 Durchführung

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde das „Prime it II® Random primer labeling Kit“ nach Herstellervorschrift verwendet. Für die Markierung wurden 100 ng DNA denaturiert und anschließend mit 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP (3000Ci/mmol) und 1  $\mu$ l Klenow-Enzym in 50  $\mu$ l 1x Reaktionspuffer gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA gestoppt. Nicht eingebaute dNTP-Moleküle wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden vor ihrem Einsatz für den Northern Blot für 10 min bei 98°C denaturiert.

### 4.6.2 Elektrophorese und Transfer der RNA

#### 4.6.2.1 Material

**DEPC-Wasser** (s. 4.5.1)

**10x MOPS Puffer**

25,12 g Morpholinopropansulfonsäure (*MOPS*)<sup>1</sup>

2,46 g Natrium Acetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na)<sup>5</sup>

2,22 g EDTA Di-Natrium Dihydrat (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O)<sup>5</sup>

ad 600 ml DEPC-Wasser; Einstellen des pH auf 7,0

**1,2 % RNA-Agarosegel**

160 ml	DEPC-Wasser
2,4 g	Agarose <sup>1</sup>
20 ml	10x MOPS-Puffer
20 ml	Formaldehyd 37% <sup>5</sup>

Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Microwelle im DEPC-Wasser gelöst und dann auf 50°C abgekühlt. Unter dem Abzug wurden MOPS-Puffer und Formaldehyd zugegeben und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegossen.

**Elektrophorese-Laufpuffer**

1300 ml	DEPC-Wasser
160 ml	10x MOPS-Puffer
140 ml	Formaldehyd 37% <sup>5</sup>

**20x Probenpuffer**

32 mg	Bromphenolblau <sup>5</sup>
32 mg	Xylencyanol <sup>5</sup>
2 ml	Glycerol RNase frei <sup>5</sup>
2 ml	DEPC-Wasser

Lagerung: -20°C, in Aliquots von 50 µl

**deionisiertes Formamid**

10 ml	Formamid <sup>1</sup>
0,5 g	AG®-501-X8 Granulat (Kationenaustauscher) <sup>9</sup>

1 Stunde zusammen rotieren, Granulat absetzen lassen;

Lagerung: -20°C, in Aliquots von 500 µl

**RNA-Ladepuffer**

500 µl	deionisiertes Formamid
250 µl	DEPC-Wasser
100 µl	10x MOPS-Puffer
100 µl	Formaldehyd 37% <sup>5</sup>
50 µl	20x Probenpuffer

kurz vor Gebrauch ansetzen;

**20x SSC (Transferpuffer)**

175 g	NaCl <sup>1</sup>
88,23 g	Natriumcitrat <sup>1</sup>
ad 1000 ml DEPC-Wasser	

auf pH 7 einstellen, 10x SSC-Puffer wurde durch Verdünnung des 20x-Ansatzes mit DEPC-Wasser hergestellt.

### 4.6.2.2 Durchführung

Von jeder Gewebe-/Zellprobe wurden 15 µg RNA (hergestellt nach 4.5) in einer Vakuumentrifuge getrocknet und in 20 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen. Zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen wurden die Proben dann für 5 min bei 65°C erhitzt und auf Eis wieder abgekühlt, bevor sie auf das RNA-Agarosegel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte für 5-6 Stunden unter Zirkulation des Laufpuffers bei 180A.

Anschließend wurde die aufgetrennte RNA über Kapillarkräfte über Nacht aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde von unten nach oben folgender Aufbau gewählt:

- ein Stapel Papiertücher
- 2 Lagen trockenes Filterpapier, in Gelgröße
- 1 Lage Filterpapier, kurz in 10x SSC-Lösung eingelegt, in Gelgröße
- die Nylonmembran, kurz in 10x SSC-Lösung eingelegt, in Gelgröße
- Agarosegel, kurz in 10x SSC-Lösung eingelegt
- 2 weitere Lagen Filterpapier, kurz in 10x SSC-Lösung eingelegt, 4x so lange wie das Gel zugeschnitten, an beiden Seiten in 10x SSC-Lösung getaucht;

Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese für 2 Stunden bei 80°C gebacken und konnte bis zum weiteren Gebrauch in Plastikfolie gehüllt bei -20°C gelagert werden.

### 4.6.3 Hybridisierung

#### 4.6.3.1 Material

##### 20% SDS-Stammlösung

20 g Natriumduodecylsulfat (*SDS*)<sup>9</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

##### Waschlösung 1 (0,2x SSC/0,5% SDS)

10 ml 20x SSC-Lösung  
25 ml 20% SDS-Stammlösung  
ad 1000 ml DEPC Wasser

##### Waschlösung 2 (2x SSC/0,5% SDS)

100 ml 20x SSC-Lösung  
25 ml 20% SDS-Stammlösung  
ad 1000 ml DEPC Wasser

**PIPES ph 6,8**

30 g 1,4 Piperazindiethansulfonsäure<sup>5</sup> (*PIPES*)

ad 100 ml DEPC-Wasser

löst sich nach Zugabe von einigen Tropfen NaOH, pH mit NaOH auf 6,8 einstellen

**20x PIPES-Mix**

10 ml PIPES ph 6,8 1 M

17,4 g NaCl<sup>1</sup>

20 ml EDTA 0,5 M (s.4.6.1.1)

ad 100 ml DEPC-Wasser

**50x Denhardt's-Lösung**

1 ml Ficoll-Paque<sup>2</sup>

1 g Poloyvinylpyrrolidon<sup>5</sup>

1 g BSA<sup>1</sup>

ad 100 ml DEPC Wasser

steril filtrieren; Lagerung: in Aliquots bei -20°C

**Filterpapier Nr.3<sup>10</sup>****Hybond<sup>TM</sup>N, Nylon Membran<sup>2</sup>****Hybridisierungslösung**

2,5 ml 20x PIPES-Mix

200 µl 50x Denhardt's-Lösung

250 µl 20% SDS-Stammlösung

5 ml Formamid

2 g ss-Heringsspermien-DNA<sup>5</sup>

ad 10 ml DEPC Wasser

**4.6.3.2 Durchführung**

Nach einer 10-minütigen Vorbehandlung bei 68°C in Waschlösung 1, folgte eine dreistündige Inkubation mit 10 ml Hybridisierungslösung bei 42°C. Nach der Prähybridisierung wurde die <sup>32</sup>P-markierte cDNA-Sonde hinzugegeben worauf bei 42°C über Nacht die Hybridisierung erfolgte. Prähybridisierung und Hybridisierung wurden in Glasröhren durchgeführt, die in einem Hybridisierungsofen konstant rotierten. Am nächsten Tag wurde die Membran noch für 1 Stunde bei 68°C in Waschlösung 2 gewaschen und für 24 Stunden bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

## 4.7 *In situ* Hybridisierung

### 4.7.1 Synthese der $^{33}\text{P}$ markierten RNA-Sonde

#### 4.7.1.1 Material

chBAFF-cDNA

$\alpha[^{33}\text{P}]\text{dUTP}^2$

ACG Mix 2,5 mM<sup>22</sup>

5x Transkriptionspuffer<sup>22</sup>

T7-Polymerase<sup>22</sup>

SP6-Polymerase<sup>22</sup>

DNase<sup>19</sup>

RNasin<sup>24</sup>

#### Tris-Cl 1M

6,055 g Tris<sup>8</sup>

ad 50 ml Aqua dest.

mit HCl pH auf 8,0 einstellen; Lagerung: RT

#### TE-Puffer (Tris-EDTA)

12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)<sup>8</sup>

2 ml EDTA 0,5 M (s. 4.6.1)

ad 1000 ml DEPC-Wasser

#### Präzipitationslösung

48 ml Ethanol

4,8 ml Na-Acetat (4 M)

1,6 mg tRNA<sup>24</sup>

Lagerung: -20°C

#### 70% Ethanol

30 ml Ethanol<sup>1</sup>

ad 100 ml DEPC-Wasser

#### 4.7.1.2 Durchführung

Nach dem Auftauen von  $\alpha[^{33}\text{P}]\text{dUTP}$  wurden zwei 6,25  $\mu\text{l}$  Aliquots – entsprechend 250  $\mu\text{Ci}$  - zu jeweils 0,5  $\mu\text{g}$  DNA gegeben. Beide Proben wurden daraufhin in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend erfolgte die Transkriptions-Reaktion durch Zugabe von je 1,25  $\mu\text{l}$



5x Transkriptionspuffer, 0,33 µl RNAsin, 0,62 µl ACG mix, 0,33 µl Polymerase (T7 für die antisense-, SP6 für die sense-Probe) und 3,73 µl Wasser. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C wurden 0,33 µl DNase zugegeben und die Proben für 15 bis 30 min erneut bei 37°C inkubiert. Nun wurden die Nucleinsäuren durch hinzufügen von 100 µl Präzipitationslösung für 30min bei -70°C ausgefällt, woraufhin die Proben für 30 min bei 4°C und 16.000xg zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 4°C, 12.000xg) und schließlich nochmals in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Nach resuspendieren des Pellets in 63 µl TE-Puffer und 1 µl RNasin, wurde nach Verdünnen von 1 µl der Sonde mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit die Aktivität im β-Counter bestimmt und die Konzentration der aktiven Probe in ng/µl berechnet.

## 4.7.2 Hybridisierung und Entwicklung

### 4.7.2.1 Material

#### Pronase K<sup>11</sup>

mit 3,47 ml DEPC-Wasser versetzen und zur Eliminierung der RNAsen für 4 Stunden bei 37°C inkubieren, Verdünnung zur Verwendung in 37°C warmem TE-Puffer pH 7,5

Lagerung: in Aliquots bei -20°C;

#### Gefrierschnitte der entsprechenden Organe (10 µm)

#### 5x TE-Puffer (s.4.7.1.1)

#### 10x PBS Lösung

80 g	NaCl <sup>1</sup>
14 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>
2 g	KCl <sup>1</sup>

ad 1000 ml DEPC-Wasser (bei Bedarf mit DEPC-Wasser auf 1x PBS verdünnen)

#### PBS

10x PBS mit DEPC-Wasser verdünnt

#### Glycerin-Puffer

2 g	Glycerin <sup>5</sup>
100 ml	10x PBS

ad 1000 ml DEPC-Wasser

**Essigsäure-Anhydrid-Lösung**

625 µl Essigsäure-Anhydrid<sup>6</sup>  
ad 250 ml PBS

**gepuffertes Formaldehyd**

25 ml Formaldehyd 37%<sup>5</sup>  
225 ml PBS

**Alkoholreihe**

2x 70% Ethanol  
2x 90 % Ethanol  
2x 100% Ethanol  
2x Xylol<sup>8</sup> (nur für die Dehydrierung vor dem Eindeckeln)

Verdünnungen erfolgten in DEPC-Wasser, für den ersten Dehydrierungsschritt wurden jeweils 0,33 M Ammonium-Acetat<sup>1</sup> hinzugefügt;

**20x SSPE<sup>24</sup>****Lösung A**

25 ml deionisiertes Formamid (s. 4.6.3.1)  
10 ml 50% Dextran Sulfat<sup>2</sup>  
4 ml 20x SSC (s. 4.6.2.1)  
1 ml 50x Denhardt's-Lösung (s. 4.6.3.1)  
1 ml 0,5 M EDTA (4.6.1.1)

Lagerung: in 0,8 µl Aliquots, bei -20°C;

**Lösung B**

100 µl Yeast tRNA (10 mg/ml)<sup>24</sup>  
10 µl DTT 1M<sup>1</sup>  
35 µl 20 x SSPE  
250 ng <sup>33</sup>P-Probe

ad 200 µl DEPC-Wasser

vor Gebrauch frisch ansetzen;

**Hybri-well press seal-hybridization chambers<sup>5</sup>****RNase A<sup>5</sup>****RNase-Puffer**

50 ml NaCl 5 M (s.4.9.1)  
5 ml Tris 1 M (s.4.7.1.1)  
1 ml EDTA 0,5 M (s.4.6.1.1)  
ad 500 ml Aqua bidest.

**RNase A-Lösung**

0,5 ml RNase<sup>5</sup> (10 mg/ml)  
250 ml RNase Puffer

Puffer auf 37°C vorwärmen und RNase direkt vor Verwendung zugeben;

**Waschlösungen aus 20x SSC (s.4.6.3.1)**

2x SSC  
1x SSC  
0,5x SSC  
0,1x SSC

die Verdünnung erfolgte in Aqua dest, ab hier kein RNase freies Arbeiten mehr nötig;

**NTB-2 Emulsion, Kodak<sup>2</sup>****NTB-2 Gebrauchslösung**

10 ml NTB-2 Emulsion  
10 ml 0,6 M Ammonium-Acetat

vor Gebrauch ca. 40 min bei 45 °C schmelzen, Lagerung: 4°C, völlig dunkel;

**D-19 Developer, Kodak<sup>23</sup>****Fixer, Kodak<sup>23</sup>****Mayer's Hematoxylin<sup>5</sup>****4.7.2.2 Durchführung**

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 5 min in gepuffertem Formaldehyd fixiert und 2 x 5 min in PBS gewaschen. Danach folgte zur Deproteinierung des Gewebes für 7 min bei RT die Behandlung mit 24 U/ml Pronase K und 2 x 5 min Waschen in PBS. Die durch den Proteaseverdau entstandenen positiven Ladungen wurden anschließend durch die 10-minütige Acetylierung mit Essigsäure-Anhydrid-Lösung neutralisiert. An 2 x 2 min Waschen in PBS schlossen sich eine weitere Fixierung in gepuffertem Formaldehyd (RT, 5 min), nochmaliges Waschen (2 x 2 min in PBS) und die Dehydrierung der Proben in einer aufsteigender Alkoholreihe an. Dabei wurden die Schnitte in jeder Alkoholstufe jeweils 5 min entwässert und anschließend luftgetrocknet.

Für die Hybridisierung wurden 4 Teile Lösung A mit 1 Teil Lösung B gemischt, gevortext, kurz abzentrifugiert und 75 µl pro Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Hybriwell press seal-hybridization chambers versiegelt, in eine feuchte Kammer gelegt und über

Nacht bei 52-55°C hybridisiert. Nach der Entfernung der Hybridisierungskammer wurden die Objektträger 2 x 5 min in 2x SSC gewaschen, bevor durch eine 30-40-minütige Behandlung mit RNase A-Lösung nicht gebundene RNA verdaut wurde. Da RNaseA nur einzelsträngige RNA zerstört, blieb die gebundene Sonde davon unberührt. Nun wurden die Schnitte in Waschlösungen absteigender Salzkonzentration gewaschen und zwar 2 x 5 min in 2x SSC, 5 min in 1x SSC, 10 min in 0,5x SSC und 30 min bei 60°C in 0,1x SSC. Nach einer erneuten Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min) wurden sie schließlich noch 5 min bei 37°C getrocknet.

Zum Entwickeln wurden die Objektträger für 30 min im Dunkelraum in NTB-Gebrauchslösung gestellt, dann in eine mit Folie versiegelte Aufbewahrungsbox mit Dessikatorgranulat gelegt, so nochmals 2–4 Stunden bei RT und anschließend 4–5 Wochen bei 4°C gelagert. Hierauf folgten eine 2–5-minütige Inkubation in Kodak D-19 Developer, 1 min Waschen mit Wasser und ein 5-minütiger Fixierschritt in Kodak Fixer. Nach Inkubation in der Fixierlösung wurden die Schnitte zunächst für 5 min unter fließendem Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. gewaschen.

Zum Gegenfärben wurden die Schnitte für 25 Sekunden in Mayer's Hematoxylin getaucht und anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte nochmals in einer Alkoholreihe (70%, 90%, 100%, Xylol – 2 x 5 min) dehydriert und anschließend feucht eingedeckelt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

## 4.8 Immunhistologie

### 4.8.1 Material

#### Gefrierschnitte der entsprechenden Organe (10 µm)

##### Aceton<sup>1</sup>

##### 10x PBS Lösung

80 g	NaCl <sup>1</sup>
14 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>1</sup>
2 g	KCl <sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua dest.

bei Bedarf mit Aqua dest. auf 1x PBS verdünnt;

**Blockierlösung**

500 µl Ziegenserum  
ad 5 ml PBS

**Antikörper (s.4.16.1)**

Anti-Bu1 (1 µg/ml in PBS)  
F71D7 (Zellkulturüberstand 1:2 in PBS)

anti-Maus-Ig-Biotin<sup>16</sup> (10 µg/ml in PBS)

**StreptABCComplex/HRP<sup>21</sup>****DAB-Lösung**

1 DAB-Tablette<sup>8</sup>  
100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%  
ad 10 ml Aqua dest.

ca. 15 min vor Verwendung ansetzen

**Mayer's Hematoxylin<sup>5</sup>****Alkoholreihe**

1x Alkohol 70%  
1x Alkohol 96%<sup>1</sup>  
2x Isopropanol<sup>1</sup>  
2x Xylol<sup>1</sup>

**4.8.2 Durchführung**

Die Gefrierschnitte wurden zunächst bei RT getrocknet, dann für 10 min in Aceton fixiert und anschließend für 3 x 5 min in PBS rehydriert. Daran schloss sich eine 20-minütige Inkubation bei RT in Blockierlösung an. Die Blockierlösung wurde abgekippt – kein Waschen – und der primäre Antikörper für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf die Schnitte gegeben. Dann folgte, nach 3 x 5 min Waschen mit PBS die Inkubation mit dem biotinierten sekundären Antikörper (anti-Maus-Ig-biotin) in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min bei RT. Nach 3 weiteren 5-minütigen Waschschrritten folgte die Verwendung der ABC-Lösung nach Herstellerangaben (30 min, RT). Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte in DAB-Lösung gefärbt, bis eine leichte Braunfärbung erkennbar war und die Reaktion durch 5-minütiges Waschen unter fließendem Leitungswasser gestoppt wurde. Abschließend erfolgten vor dem Eindeckeln der Schnitte eine Kernfärbung mit Hematoxylin und die Entwässerung in einer Alkoholreihe (Alkohol und Isopropanol je 5 min, Xylol je 10 min).

## 4.9 Aufreinigung von His-chBAFF über Affinitätschromatographie

### 4.9.1 Material

#### ***E.coli* M15 pQE9 chBAFF Glycerol Stock**

Die Methode zur Herstellung der mit chBAFF transfizierten *E.coli* ist detailliert beschrieben in Schneider, Kothlow et al. „*Chicken BAFF – a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*“ [221] und wurde im Labor von Prof. Dr. Peter Staeheli in Freiburg durchgeführt.

#### **LB-Medium**

25 g Luria Broth Base (*LB*)-Medium<sup>1</sup>  
ad 1000 ml Aqua dest.

pH 7,2 einstellen, sofort nach Herstellung autoklavieren; Lagerung: 4°C

#### **Ampicillin 50 mg/ml**

500 mg Ampicillin<sup>5</sup>  
ad 10 ml Aqua bidest.

Lagerung: in 500 µl Aliquots bei –20°C

#### **Kanamycin 25 mg/ml**

250 mg Kanamycin<sup>5</sup>  
ad 10 ml Aqua bidest.

Lagerung: in 500 µl Aliquots bei –20°C

#### **Kulturmedium**

100 µg Ampicillin<sup>5</sup>  
25 µg Kanamycin<sup>5</sup>  
ad 1 ml LB-Medium

#### **IPTG Stammlösung 1M**

2,38 g Isopropylthiogalactose (*IPTG*)<sup>1</sup>  
ad 10 ml Aqua bidest.

#### **Ni-NTA-Agarose<sup>19</sup>**

#### **NaCl 5M**

29,22 g NaCl<sup>1</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

**Tris-Cl 1M** (s. 4.7.1.1)**Imidazol 1 M**

6,80 g Imidazol (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>)<sup>6</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

**MgCl<sub>2</sub> 1 M**

20,33 g MgCl<sub>2</sub><sup>1</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

**KCl 1 M**

7,46 g KCl<sup>1</sup>  
ad 100ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

**Ultraschall-Puffer-Stammlösung**

100 ml NaCl 5 M  
50 ml Tris-HCl pH 8,0  
5 ml MgCl<sub>2</sub> 1 M  
100 ml Glycerin<sup>5</sup>  
1 ml NP-40<sup>6</sup>  
ad 1000 ml Aqua bidet.

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (außer NP-40) verwenden,  
Lagerung: RT

**β-Mercaptoethanol (β-ME) 14,2 M<sup>9</sup>****25x Complete (Proteaseinhibitor)**

1 Tablette Complete<sup>11</sup>  
ad 2 ml Aqua bidest.

Lagerung: -20°C

**Ultraschallpuffer**

2 ml 25x Complete  
20 µl β-ME<sup>9</sup>  
100 µl Imidazol  
ad 50 ml Ultraschall-Puffer Stammlösung

vor Gebrauch frisch ansetzen

**Waschpuffer 2-Stammlösung**

100 ml KCl 1 M  
20 ml Tris-Cl ph 8,0  
5 ml MgCl<sub>2</sub> 1 M

200 ml	Glycerin
1 ml	NP-40 <sup>6</sup>
10 ml	Imidazol
ad 1000 ml	Aqua bidet.

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (außer NP-40) verwenden;  
Lagerung: RT

### **Waschpuffer 1**

2 ml	Complete
20 µl	β-ME <sup>9</sup>
1 ml	Imidazol <sup>6</sup>

ad 50 ml Ultraschall-Puffer-Stammlösung

vor Gebrauch frisch ansetzen

### **Waschpuffer 2**

2 ml	Complete
20 µl	β-ME <sup>9</sup>

ad 50 ml Waschpuffer-Stammlösung

vor Gebrauch frisch ansetzen

### **Equilibrierungspuffer**

20 µl	Imidazol
-------	----------

ad 10 ml Ultraschall-Puffer-Stammlösung

vor Gebrauch frisch ansetzen

### **Elutionspuffer-Stammlösung**

100 ml	KCl 1M
20 ml	Tris-Cl pH 8,0
5 ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
200 ml	Glycerin <sup>5</sup>
1 ml	NP-40 <sup>6</sup>
17,02 g	Imidazol (=250mM) <sup>6</sup>

ad 1000 ml Aqua bidet.

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (außer NP-40) verwenden;  
Lagerung: RT

### **Elutionspuffer**

20 µl	β-ME <sup>9</sup>
-------	-------------------

ad 50 ml Elutionspuffer-Stammlösung

vor Gebrauch frisch ansetzen

### **Poly-Prep®-Chromatographie-Säule<sup>9</sup>**



## Econo-Pac 10DG Säule (BioRad)<sup>9</sup>

### 4.9.2 Reinigung

Zunächst wurde vom Glycerinstock des mit pQE9-chBAFF transfizierten *E.coli* Stammes eine Vorkultur in 2,5 ml Kulturmedium angeimpft und für zwei Stunden bei 28°C geschüttelt. 20 µl dieser Vorkultur wurden in 1l Kulturmedium überführt und für 14 bis 16 Stunden erneut bei 28°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht wurde. Durch die Zugabe von 1,5 mmol IPTG wurde dann für 1 Stunde die Proteinexpression induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterien in 1l-Gefäßen bei 4°C für 30 min bei 4000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml kaltem Ultraschallpuffer resuspendiert und, wenn nötig, bis zur weiteren Aufarbeitung in 10 ml Fraktionen bei -70°C gelagert werden oder sie wurden für die sofortige Weiterverarbeitung in 50 ml Rörchen transferiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis.

Zum Aufbrechen der Zellen mittels Ultraschall wurden die Fraktionen 7 x 30 sec mit je 30 sec Pause zwischen den einzelnen Schritten beschallt (Cycle 90, Power MS 72). Anschließend wurde die Bakterienlösung für 25 min bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Equilibrierung der Ni-Agarose. Dazu wurden pro Liter Bakterienkultur jeweils 1 ml Ni-Agarose in einem 50 ml Falcon-Rörchen nacheinander mit 10 ml Aqua bidest, 10 ml Elutionspuffer und 10 ml Equilibrierungspuffer gewaschen, d.h. vorsichtig aufsuspendiert und kurz abzentrifugiert. Der Bakterienüberstand wurde auf die equilibrierte Ni-Agarose gegeben und für zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Ni-Agarose Suspension in eine Poly-Prep®-Chromatographie-Säule überführt und der Überstand abgelassen. Die Säule wurde dann mit je 15 ml Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Zur Elution wurden 1,5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Eluat in 6 Fraktionen mit je 250 µl aufgefangen. Nach Überprüfung der Reinigung in der SDS-PAGE wurden die proteinreichen Fraktionen gepoolt, mittels einer Econo-Pac 10DG Säule nach Herstellerangaben in PBS umgepuffert und nach photometrischer Proteinbestimmung bei -20°C gelagert.

Da die Ni-Agarose zwei- bis viermal verwendbar ist, wurde sie zur Regeneration mit weiteren 5 ml Elutionspuffer gespült, in 30% Ethanol aufgenommen, mit einer Pasteurpipette in ein 50 ml Rörchen transferiert und bei 4°C gelagert.

### 4.10 Herstellung von Flag-chBAFF

Die Methode der eukaryotischen Expression von chBAFF als Protein mit Flag-Tag ist detailliert beschrieben in Schneider, Kothlow et al. „*Chicken BAFF – a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*“ [221] und wurde im Labor von Prof. Dr. Peter Staeheli in Frei-

burg durchgeführt. Für alle Versuche mit Flag-chBAFF wurden Zellkulturüberstände von PCR-3-chBAFF transfizierten 293T-Zellen verwendet.

## 4.11 Gewinnung und Reinigung eines polyklonalen Antiserums gegen chBAFF

### 4.11.1 Material

#### Serumgewinnung

His-chBAFF (*E.coli*) in PBS  
Freund'sches komplettes Adjuvans (FCA)<sup>5</sup>  
Freund'sches inkomplettes Adjuvans (FIA)<sup>5</sup>

#### Startpuffer

1,424 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )<sup>1</sup>  
in 400ml Aqua dest.  
0,936 g Natrium-di-hydrogenphosphat-monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ )<sup>1</sup>  
in 300 ml Aqua dest.

unter pH-Kontrolle solange  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ -Lösung in die  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung geben, bis pH 7,0 erreicht ist; Lagerung: bei 4°C

#### Elutionspuffer

3,75 g Glycin<sup>1</sup>  
ad 500 ml Aqua dest.

mit HCl pH 2,5 einstellen; Lagerung: 4°C

#### Tris-Cl 1M (s. 4.9.1)

#### Guanidinhydrochlorid 6M

57,32 g Guanidinhydrochlorid<sup>1</sup>  
ad 100 ml Aqua dest.

Lagerung: RT

#### Dialysepuffer pH 7,8

45,0 g  $\text{NaCl}$ <sup>1</sup>  
29,03 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ <sup>1</sup>  
1,65 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ <sup>1</sup>  
ad 5l Aqua dest.

kurz vor Gebrauch ansetzen

**Ethanol 20%**

20 ml Ethanol<sup>8</sup>  
ad 100 ml Aqua dest.

**Dialysierschlauch, Visking, (14kDA cut off)<sup>12</sup>****ProSep®-rA High Capacity<sup>25</sup>****4.11.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums**

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen chBAFF wurde ein Kaninchen nach Blutentnahme zur Gewinnung eines Präimmunsersums (=Kontrollserum) mit His-chBAFF immunisiert. Dazu wurden bei der Erstimmunisierung 500 µl His-chBAFF (c = 0,36 mg/ml) mit 500 µl FCA emulgiert und i.m. injiziert. Bei den Boosterimmunisierungen nach 4 und 8 Wochen wurde FIA statt FCA verwendet.

Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde begonnen, im Abstand von zwei bis drei Wochen ca. 20-40 ml Blut aus der mittleren Ohrarterie zur Serumgewinnung zu entnehmen. Das Vollblut wurde zur Gerinnung für ca. zwei Stunden bei 37°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation wurde das Serum abgenommen, nochmals für 10 min bei 4°C und 800xg abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

**4.11.3 Affinitätschromatographie zur Reinigung des Antiserums**

Zur Konzentration der im Serum enthaltenen Antikörper gegen chBAFF wurde das polyklonale Kaninchenserum über eine IgG bindende ProteinA-Sepharose-Säule aufgereinigt. Hierzu wurde das Serum mit einem 0,45 µm Filter filtriert und 1:2 mit Startpuffer verdünnt. Die Durchlaufgeschwindigkeit der Säule wurde mittels einer peristaltischen Pumpe auf 1 ml/min eingestellt und die Säule zunächst mit mindestens 30 ml Startpuffer äquilibriert. Anschließend wurden 5 ml des Serums auf die Säule aufgetragen. Das darauf folgende Waschen der Säule mit Startpuffer wurde über einen Monitor kontrolliert und solange fortgesetzt, bis die Extinktion bei 280 nm zur Basislinie zurückgekehrt war. Zur Elution des gebundenen IgG wurde Elutionspuffer auf die Säule aufgebracht. Das Eluat wurde in einem Röhrchen aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung neutralisiert. Zur Regeneration der Säule wurde diese nach der Elution zunächst erneut mit ca. 30 ml Startpuffer gespült, dann mit 20 ml Guanidinhydrochlorid regeneriert, nochmals mit 30 ml Startpuffer gewaschen und zuletzt zur Aufbewahrung bei 4°C mit einer 20% Ethanol-Lösung versetzt.

Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht unter Rühren bei 4°C in 5 l Dialysepuffer umgepuffert. Der IgG-Gehalt wurde anschließend photometrisch bestimmt.

## 4.12 SDS-PAGE

### 4.12.1 Material

#### 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

91 g Tris<sup>8</sup>  
2 g SDS<sup>9</sup>

ad 500ml Aqua dest.,

pH mit HCl auf 8,8 einstellen, Lagerung: 4°C

#### 4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8

6,05 g Tris<sup>8</sup>  
0,4 g SDS<sup>9</sup>

ad 100 ml Aqua dest.

pH mit HCl auf 6,8 einstellen, Lagerung: 4°C

#### APS 10%

0,5 g Ammoniumpersulfat (APS)<sup>9</sup>

ad 5 ml Aqua bidest.,

Lagerung: -20°C in Aliquots von 110 µl

#### Trenngel 12%

3,5 ml Aqua bidest.

2,5 ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

4 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>1</sup>

50 µl APS 10%

20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)<sup>1</sup>

in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

#### Sammelgel

6,17 ml Aqua bidest.

2,5 ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

1,33 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>1</sup>

50 µl APS 10%

20 µl TEMED<sup>1</sup>

in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

**5x Elektrophoresepuffer**

15,1 g	Tris <sup>8</sup>
72,0 g	Glycin <sup>1</sup>
5,0 g	SDS <sup>9</sup>
ad 1000 ml	Aqua dest.

zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen; Lagerung: 4°C

**6x Probenpuffer**

7 ml	4x TrisCl/SDS-Puffer pH 6,8
3 ml	Glycerol <sup>1</sup>
1 g	SDS <sup>9</sup>
1 mg	Bromphenolblau <sup>5</sup>
ad 10 ml	Aqua bidest.

Lagerung: -20°C in 1ml Aliquots

**β-Mercaptoethanol<sup>9</sup>****Prestained Protein Molekulargewichtsmarker, ~10-180 kD<sup>13</sup>****Protein Molekulargewichtsmarker, ~10-200 kD<sup>13</sup>****4.12.2 Durchführung**

In eine BioRad mini Protean II Gießkammer wurde zunächst das Trenngel eingefüllt und mit ca. 1ml Aqua bidest. überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 20 min wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt, das Trenngel mit Sammelgel überschichtet und der entsprechende Probenaschenkamm sofort eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämmen entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zu 50 µl der Proben wurden 10 µl 6x Probenpuffer gegeben. Zur Überprüfung der Aufreinigung von HischBAFF wurden zu 15 µl der Eluatproben 15 µl vorverdünnter 2x Probenpuffer gegeben. Bei den Arbeiten unter reduzierenden Bedingungen wurden außerdem noch 5% β-ME dazupipettiert. Die Probe wurde für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden 20 µl der Proben bzw. 6 µl der Marker in die Geltaschen eingebracht und das Gel in die Kammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 25 mA gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke bis zum Ende auf 40 mA erhöht.

## 4.13 Coomassie-Färbung

### 4.13.1 Material

#### Coomassie-Färbelösung

450 ml Ethanol<sup>8</sup>  
100 ml Essigsäure 96%<sup>8</sup>  
2,5 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250<sup>14</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

die Färbelösung ist wiederverwendbar

#### Entfärbelösung

250 ml Ethanol<sup>8</sup>  
100 ml Essigsäure 96%<sup>9</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

die Entfärbelösung wurde nach Gebrauch zur Wiederverwendung mit Aktivkohle entfärbt;

### 4.13.2 Durchführung

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophoresekammer wurde es für 15 min in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht. Diese wurde nach 10 min nochmals gewechselt und das Gel über Nacht entfärbt.

## 4.14 Western Blot

### 4.14.1 Material

#### Anodenpuffer 1

36,33 g Tris<sup>8</sup>  
200 ml Methanol<sup>8</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

#### Anodenpuffer 2

3,03 g Tris<sup>8</sup>  
200 ml Methanol<sup>8</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

**Kathodenpuffer**

3,03 g Tris<sup>8</sup>  
200 ml Methanol<sup>8</sup>  
5,25 g  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure<sup>5</sup>  
ad 1000 ml Aqua bidest.

Lagerung: RT

**Magermilchlösung 5%**

5 g Magermilchpulver<sup>1</sup>  
ad 100ml PBS

kurz vor Gebrauch ansetzen

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

0,5 ml Tween20<sup>®1</sup>  
ad 1000ml PBS (s. 4.2.1)

**Nitrocellulosemembran BA83 Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ <sup>15</sup>****Filterpapier Nr. 3<sup>10</sup>****Antikörper**

Kaninchen-anti-chBAFF (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS-T)  
anti-Kaninchen-IgG-POD<sup>5</sup> (1:10.000 in PBS-T)  
anti-His-tag (X-X-Gly-Ser-His-His-His)<sup>27</sup>  
anti-Maus-IgG-POD<sup>5</sup> (1:10.000 in PBS-T)

**ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents<sup>2</sup>****Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)<sup>2</sup>****4.14.2 Durchführung**

Zum Blotten der Proteine im Semi-dry-Elektroblotter [225] wurden zwischen die mit Aqua dest. benetzten Plattenelektroden von unten nach oben geschichtet:

- 4 Lagen in Anodenpuffer 1 getränktes Filterpapier,
- 2 Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Filterpapier
- die mit Aqua bidest. getränkte Nitrocellulosemembran
- das SDS-Gel und
- 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier

Alle Komponenten wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und ohne Luftblasen aufeinandergelegt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA / cm<sup>2</sup> Gel, entsprechend 45 mA / Gel für 75 min. Nach dem Blotten wurde die Membran für 60 min bei RT

mit 5% Magermilchlösung blockiert. Dieser Schritt erfolgte wie alle weiteren auf einem Plattenschüttler. Nach einem 15-minütigen Waschschrift mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit Kaninchen-anti-chBAFF über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran 3x10 min mit PBS-T gewaschen und für eine weitere Stunde mit anti-Kaninchen-IgG-POD gefärbt. Nach gründlichem Waschen (6x10 min) mit PBS-T, konnte die Membran nun nach Herstellerangaben mit dem ECL™ Western Blotting Detection Reagents inkubiert und entwickelt werden.

## 4.15 ELISA

### 4.15.1 Material

#### Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )<sup>1</sup>  
6,00 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.; pH auf 9,6 einstellen

Lagerung: 4°C

#### PBS-T (0,05% Tween20) (s. 4.14.1)

#### Magermilchlösung 5% (s. 4.14.1)

#### TMB-Puffer

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

ad 1000 ml Aqua bidest.

Lagerung: 4°C

#### TMB Stammlösung

6 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ( $\text{TMB}^8$ )  
ad 1ml DMSO<sup>1</sup>

Lagerung: RT, lichtgeschützt

#### TMB Gebrauchslösung

10 ml TMB-Puffer 37°C  
332 µl TMB Stammlösung  
3,0 µl 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>1</sup>

kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden



**Schwefelsäure 1M**

472 ml Aqua dest.  
28 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%<sup>8</sup>

Säure vorsichtig unter Rühren über einen Glasstab ins Wasser laufen lassen;

**Antikörper**

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
<b>Flag-chBAFF ELISA</b>					
Anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1 µg/ml	<sup>5</sup>
Anti-chBAFF	chBAFF	IgG (polyklonal)	Kaninchen		s.4.11.2
Anti-rabbit-IgG-POD	Kaninchen IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:10.000	<sup>5</sup>
<b>ch-Immunglobulin ELISA</b>					
A1	chIgA	IgG1	Maus	5 µg/ml	[226]
M1	chIgM	IgG1	Maus	5 µg/ml	
G2	chIgG	IgG1	Maus	5 µg/ml	
A3-POD	chIgA	IgG1	Maus	1:20.000	
M2-POD	chIgM	IgG2a	Maus	1:2000	
G1-POD	chIgG	IgG1	Maus	1: 400.000	

**Tab. 4.1 Im ELISA verwendete Antikörper**

Wenn nicht anders aufgeführt wurden die ELISA-Platten im Folgenden zwischen allen Schritten mit Hilfe eines ELISA-Washers je dreimal mit PBS-T gewaschen und in jedem Schritt für 60 min bei 37°C inkubiert, die Verdünnung der Antikörper erfolgte in PBS-T.

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

**4.15.2 Flag-chBAFF ELISA**

NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten wurden mit 100 µl anti-Flag-M2 in Beschichtungspuffer (Konzentration s. Tab. 4.1) über Nacht bei 4°C beschichtet.

Nach Abwaschen des nicht gebundenen Beschichtungsantikörpers erfolgte die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Platte mit 200 µl Magermilchlösung, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Platte mit 100 µl der zu testenden 293T-BAFF Überstände inkubiert, wobei die Überstände in einer log<sub>2</sub>-Verdünnung (1:2 bis 1:2048 in PBS-T) aufgetragen wurden. Daran schloss sich die Inkubation mit 100 µl des gereinigten polyklonalen anti-chBAFF-IgG an. Als letztes wurden 50 µl anti-rabbit-IgG-POD aufgetragen. Zur Entwicklung des ELISA wurden 100 µl TMB Gebrauchslösung zugegeben und für

10 min im Dunkeln bei RT inkubiert, wobei eine Bindung von Flag-chBAFF durch eine Blaufärbung der Probe angezeigt wird. Ohne Waschen wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 50 µl 1M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erzielt wird. Zur Quantifizierung wurde der ELISA im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

### 4.15.3 Hühner-Immunglobulin ELISA

Zur Bestimmung des Immunglobulingehalts im Serum der behandelten Tiere wurden NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten mit je 100 µl der primären Antikörper (A1, M1, G2) in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Blockierung der Platte mit 200 µl Magermilchpulver, wurden 100 µl der zu testenden Seren als log<sub>2</sub> Titration aufgetragen. Dabei lagen den Titrationsreihen folgende Ausgangsverdünnungen in PBS-T zugrunde:

- IgA-Bestimmung: 1: 10 - 1:20 (je jünger die Tiere, desto niedriger die Verdünnung)
- IgM-Bestimmung: 1:20 – 1:50 (je jünger die Tiere, desto niedriger die Verdünnung)
- IgG-Bestimmung 1:5000

Anschließend folgte die Inkubation mit 50 µl des POD-konjugierten sekundären Antikörpers. Die Entwicklung mittels TMB erfolgte analog zu der unter 4.15.2 beschriebenen Methode.

## 4.16 Durchflusszytometrie

Die Messungen für diese Arbeit wurden an einem Fluorescence Activated Cell Scanner (FACScan®) durchgeführt und mit Cell Quest Pro und WinMDI 2.8 ausgewertet.

### 4.16.1 Material

#### Fluo-Puffer

5 g        Bovines Serum Albumin (*BSA*)<sup>1</sup>  
50 mg     Natrium-Azid ( $\text{NaN}_3$ )<sup>8</sup>  
ad 500 ml    PBS

Lagerung: 4°C

#### FACS-Puffer

100 mg     $\text{NaN}_3$ <sup>8</sup>  
ad 1000 ml    PBS

Lagerung: RT

**10x PBS** (s.4.8.1)

**Paraformaldehyd (PFA) 4%**

20 g Paraformaldehyd<sup>8</sup>  
ad 450 ml Aqua bidest.

im Wasserbad bei 60°C ca. 1h rühren, dann einige Tropfen NaOH zugeben um das restliche PFA in Lösung zu bringen, 50 ml 10xPBS zugeben, Lagerung: 4°C

Substanz	Funktion	Konzentration
Streptavidin-PE <sup>16</sup>	Bindung an biotinierte Antikörper	1:300
Propidium Iodid (PI)	Anfärbung toter Zellen durch Bindung an die DNA	2,5 µg/ml
7-Actinomycin-D <sup>5</sup> (7-AAD)		
Flag-chBAFF (293T-BAFF Zellkulturüberstand)	Bindung an BAFF-Rezeptoren	1:5
Normal-Mausserum	Blockierung freier Bindungsstellen bei Doppelfärbungen	1:20

Tab. 4.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

#### 4.16.2 Einfachfärbung

Die im Folgenden genannten Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der zum Färben benutzten 96-Loch-Rundboden-Platten. Zur Verdünnung von Antikörpern wurde Fluo-Puffer eingesetzt. Alle Inkubationsschritte fanden auf Eis und im Dunkeln statt.

Ungefähr  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/Kavität wurden auf eine 96-Loch-Platte transferiert und durch kurze Zentrifugation bei 716xg pelletiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl des primären Antikörpers resuspendiert und für 25 min inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer und erneuter Zentrifugation, wurden die Proben für 20 min in 35 µl des sekundären Antikörpers – anti-Maus-IgG-FITC oder anti-Maus-PE - inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer, Zentrifugation) wurden die Zellen zur Messung in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in geeignete Probenröhrchen überführt.

Für den Nachweis der Bindung von chBAFF an Oberflächenrezeptoren wurden die Zellen zunächst für 25 min in 50 µl Flag-chBAFF-Zellkulturüberstand resuspendiert. Nach einem Waschschrift erfolgte für 20 min die Inkubation mit anti-Flag-M2, an die sich nach erneutem Waschen die Färbung mit anti-Maus-IgG-FITC anschloss. Die Färbung mit dem freundlicherweise von Dr. Pascal Schneider (Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellten humanem und murinem BAFF wurde nach derselben Methode durchgeführt.

**Antikörper**

Klonname	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
<b>Primäre Antikörper (unmarkiert)</b>					
anti-L-Kette <sup>16</sup>	leichte Kette	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[106]
L22	Bu-1a (chB6.1)	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[227]
11G2	Bu-1b (chB6.2)	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	
AV20 <sup>16</sup>	Bu1	IgG1	Maus	2,5 µg/ml	[75]
M1	IgM	IgG1	Maus	5 µg/ml	[226]
M2	IgM	IgG2a	Maus	5 µg/ml	
16-6	CD45	IgG2a	Maus	Zellkulturüberstand	
CT3	CD3	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[228]
2-6	CD4	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[229]
3-298	CD8	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand	[230]
TCR-1	TCR γδ	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[231]
TCR-2	TCRα/vβ1	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[232]
TCR-3	TCRα/vβ2	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[233]
a-Flag-M2 <sup>5</sup>	Flag-Epitop	IgG1	Maus	5 µg/ml	
a-Flag-M2-Biotin <sup>5</sup>	Flag-Epitop	IgG1	Maus	5 µg/ml	
<b>Sekundäre Antikörper (fluoreszenzmarkiert)</b>					
anti-Maus-IgG-FITC <sup>5</sup>	Mäuse-IgG	Polyklonal	Ziege	1:250	
anti-Maus-IgG-PE <sup>16</sup>	Mäuse-IgG	Polyklonal	Ziege	1:300	
anti-Maus-IgG1-FITC <sup>16</sup>	Mäuse-IgG1	Polyklonal	Ziege	1:50	
anti-Maus-IgG2a-FITC <sup>16</sup>	Mäuse-IgG2a	Polyklonal	Ziege	1:50	
anti-Maus-IgG1-PE <sup>16</sup>	Mäuse-IgG1	Polyklonal	Ziege	1:300	
anti-Maus-IgG2a-PE <sup>16</sup>	Mäuse-IgG2a	Polyklonal	Ziege	1:300	

**Tab. 4.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie**

### 4.16.3 Doppelfärbung

Für Doppelfärbungen, bei denen die betreffenden primären Antikörper unterschiedliche Isotypen aufweisen, wurde die Färbung mit isotypspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt (z.B. AV20 (IgG1) vs. M2 (IgG2a)). Hierzu wurden die Zellen zunächst für 25 min gleichzeitig mit je 35 µl beider Primärantikörper inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Färbung mit 35 µl einer Mischung der entsprechenden isotypspezifischen Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen (z.B. anti-Maus-IgG1-FITC und anti-Maus-IgG2a-PE).

Für die 2-Farben Immunfluoreszenz mit chBAFF wurden die Zellen zunächst in einer Einfachfärbung mit den entsprechenden primären Antikörpern (anti-Bu1, anti-CD3 usw.) und anti-Maus-IgG-FITC als Sekundärantikörper gefärbt (s. 4.16.2). Im nächsten Schritt wurden gleichzeitig die freien Bindungsstellen des sekundären Antikörpers durch Zugabe von NMS blockiert und chBAFF-Flag an die Rezeptoren gebunden. Dazu wurden die Zellen für 20 min in 40 µl einer Mischung aus Fluo-Puffer, Normal-Mausserum und chBAFF-Flag inkubiert. Anschließend wurden die Proben nacheinander für 20 min mit 35 µl anti-Flag-M2-Biotin und zuletzt mit 35 µl Streptavidin-PE gefärbt.

### 4.16.4 BCMA-Inhibition

Um die spezifische Bindung von chBAFF an humanes BCMA nachzuweisen, wurde Flag-chBAFF mit verschiedenen Konzentrationen an huBCMA-Fc vorinkubiert. Dieses wurde uns ebenfalls von Dr. Pascal Schneider (s. 4.16.2) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden zu 50 µl einer log<sub>2</sub>-Titration von hBCMA-Fc 50 µl der konstant gehaltenen Flag-chBAFF-Verdünnung gegeben und 30 min auf Eis inkubiert.

40 µl dieser Ansätze wurden dann analog zu 4.16.2 zur Färbung der Zellen verwendet, so dass bei erfolgter Bindung von chBAFF an hBCMA kein freies chBAFF mehr in den Proben war und somit im Durchflusszytometer keine Fluoreszenz mehr sichtbar war.

### 4.16.5 Lebend/Tot-Färbung

Zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen wurde bei Einfachfärbung kurz vor der Messung PI (s. Tab. 4.2) zu den fertig gefärbten und in den Messröhrchen befindlichen Proben gegeben.

Bei Doppelfärbungen erfolgte die Lebend/Tot-Unterscheidung durch Zugabe von 7-AAD, da dies zwar etwas schwächer färbt aber mit der zweiten Fluoreszenzfarbe deutlich weniger in-

terferiert als PI. Nach Zugabe von 7-AAD wurden die Proben zur besseren Bindung des Farbstoffs an die DNA vor der Messung nochmals 10 min im Dunkeln bei RT belassen.

#### **4.16.6 Fixierung**

Konnten die Zellen nicht sofort gemessen werden und war eine Lebend/Tot Färbung nicht nötig, wurden sie in 1% PFA fixiert. Dazu wurden 100 µl PFA 4% in die Probenröhrchen vorgelegt und die in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommene Probe dazugegeben. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

### **4.17 B-Zell-Separation mittels MACS®**

Werden zur Klärung gewisser Fragestellungen statt gemischten Zellpopulationen, wie sie nach der Präparation von Leukozyten aus Organen vorliegen, reine Populationen, wie z.B. B-Zellen oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen benötigt, ist es möglich, die gewünschte Zellpopulation über eine MACS (= Magnetic Cell Sorting) Separation aufzureinigen. Nach Markierung des betreffenden Antigens mit FITC, wird dieses von anti-FITC-Antikörpern gebunden, die an kleine paramagnetische Beads gekoppelt sind. Dies macht es nun möglich, die markierten Zellen beim Durchlauf durch eine, in einen Magneten eingespannte Säule, selektiv zurückzuhalten und separat von der Säule zu waschen, nachdem diese aus dem Magneten entfernt wurde.

#### **4.17.1 Material**

**Standardmedium** (s. 4.3.1)

**Medium 5% FCS**

25 ml	FCS <sup>3</sup>
5 ml	Penicillin-Streptomycin <sup>3</sup>
ad 500 ml	RPMI <sup>3</sup>

**anti-L-Kette** (s.Tab. 4.3 )

**anti-Maus-Ig-FITC<sup>5</sup>** (Verdünnung 1:50 in Medium)

**MACS anti-FITC-Microbeads<sup>17</sup>**

**MACS Separation Column LS<sup>17</sup>**

### 4.17.2 Durchführung

Milzleukozyten wurden entsprechend 4.2.3 präpariert und gezählt. Da es sich hierbei um eine Positiv-Separation handelt, d.h. die an die Säule gebundenen Zellen werden später weiter verwendet, und tote Zellen unspezifisch an die Matrix der MACS-Säule binden, wurden für das MACS-Sorten nur Zellpräparationen mit einer Viabilität > 90% verwendet.

$5 \times 10^8$  Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen abzentrifugiert ( $4^\circ\text{C}$ ,  $225 \times g$ , 10 min), in  $500 \mu\text{l}$  /  $1 \times 10^7$  Zellen anti-L-Kette ZKÜ resuspendiert und für 25 min auf Eis gestellt. Nach dem Waschen der Zellen mit 5% FCS-Medium (Auffüllen des Röhrchens und abzentrifugieren bei  $4^\circ\text{C}$ ,  $225 \times g$ , 10 min) erfolgte für 20 min die Inkubation mit  $50 \mu\text{l}$  anti-Maus-Ig-FITC /  $1 \times 10^7$  Zellen auf Eis. Nach erneutem Waschen wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet in  $90 \mu\text{l}$  Medium /  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  MACS anti-FITC-Microbeads wurde die Zellsuspension nochmals für 15 min im Dunkeln bei  $6-12^\circ\text{C}$  im Kühlschrank inkubiert.

Während der letzten Inkubationszeit wurde die Säule durch Einspannen in den Magneten und Waschen mit 3 ml Medium vorbereitet. Dann wurde die vorsichtig gewaschene und in 1 ml Medium /  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommene Probe in 2 ml Fraktionen auf die Säule gegeben ( $25 \mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden als Probe 1 – „Vor Separation“ - und  $25 \mu\text{l}$  des Durchlaufs als Probe 2 „Negativ Fraktion“ abgenommen und auf Eis gestellt). Über eine LS Separationsäule können aus einer Zellsuspension von  $1 \times 10^9$  Zellen, maximal  $1 \times 10^8$  Zellen positiv gesortet werden. Nachdem die Säule dreimal mit 4 ml Medium gewaschen wurde, wurde sie aus dem Magneten genommen und mit Hilfe eines Stempels mit weiteren 5 ml Standardmedium eluiert. Das in einem Röhrchen aufgefangene Eluat wurde nochmals gewaschen und in frischem Standardmedium aufgenommen.  $25 \mu\text{l}$  des Eluats wurden zur Überprüfung der Separation im FACS als Probe 3 „Positiv-Fraktion“ abgenommen und ebenfalls auf Eis gestellt.

Die Reinheit der Separation konnte nun ohne weitere Färbeschritte nach Überführen der Proben 1 bis 3 in FACS®-Messröhrchen und Zugabe von  $300 \mu\text{l}$  Fluo-Puffer durchflusszytometrisch bestimmt werden.

## 4.18 *In vitro* Funktionstest: Bestimmung der Überlebensrate

### 4.18.1 Material

**Flag-chBAFF Zellkulturüberstand**

**Flag-Kontrollüberstand**

**Trypanblau-Lösung<sup>1</sup>**

**Antikörper** (s. Tab. 4.3)

Anti-L-Kette

Anti-Maus-Ig-FITC<sup>5</sup>

**Propidium Iodid<sup>5</sup>** (s.Tab. 4.2)

### 4.18.2 Durchführung

Zur *in vitro* Überprüfung der biologischen Funktion von chBAFF wurden primäre Leukozyten mit Flag-chBAFF Zellkulturüberstand kultiviert. Anschließend wurde die Überlebensrate der B-Zellen bestimmt. Die nach den unter 4.2.2 (PBL), 4.2.3 (gemischte Leukozyten aus verschiedenen Organen), und 4.17 (gesortete B-Zellen) gewonnenen und in Standardmedium aufgenommenen Zellen, wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/Kavität in eine 24-Loch-Platte eingesät. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit der zu den jeweiligen Versuchen angegebenen Konzentration an Flag-chBAFF-Zellkulturüberstand versetzt. Als Kontrolle diente Überstand von Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 bis 72 Stunden kultiviert.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellsuspension in 5 ml Röhrchen überführt. Um einen vollständigen Transfer zu erreichen, wurden die einzelnen Kavitäten jeweils zweimal mit PBS nachgespült. Nach Zentrifugation der Zellen wurden diese in exakt 1 ml Medium resuspendiert, worauf die absolute Zahl der lebenden Zellen in den Proben mittels Trypanblau-Färbung (s. 4.2.2) bestimmt wurde. Die Frequenz der lebenden B-Zellen wurde Durchflusszytometrisch gemessen, indem die Zellen durch Färbung mit dem L-Ketten-Antikörper markiert (s. 4.16.2) und zusätzlich mit PI gefärbt wurden. Die Frequenz der lebenden B-Zellen entspricht dabei der Frequenz der L-Ketten positiven und PI negativen Zellen.



Die absolute Zahl lebender B-Zellen in den Kulturen konnte durch Multiplikation der absoluten Zahl lebender Zellen mit der Frequenz lebender B-Zellen berechnet werden.

#### 4.19 *In vitro* Funktionstest: Bestimmung der Proliferation

Um die Proliferation von Zellen z.B. nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, nachweisen zu können, hat sich die Markierung der Zellen mit Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) in letzter Zeit zu einer anerkannten Alternative zur [<sup>3</sup>H]Thymidin- oder BrdU-Inkorporation entwickelt. Bei CFDA-SE handelt es sich um ein nicht polares Molekül, das die Zellmembran spontan penetriert und im Zellinneren von intrazellulären Esterasen zum anionischen CFSE hydrolysiert wird. CFSE bindet daraufhin irreversibel an freie Amingruppen des Zytoskeletts. Nach einer initialen Phase der Equilibrierung (ca. 24 Stunden) ist die Fluoreszenz von ruhenden CFSE markierten Zellen über Monate stabil und kann im Durchflusszytometer nach Anregung bei 488 nm im FL1-Detektionskanal nachgewiesen werden. Wenn sich Zellen teilen, wird das gebundene CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, was zu einer Halbierung der Fluoreszenzintensität der Zelle führt. Dadurch können im Durchflusszytometer 8 bis 10 Zellteilungen unterschieden werden. Der große Vorteil der CFSE-Markierung gegenüber der [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation besteht darin, dass mittels einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Zellen im Anschluss an die Kultivierung, genau bestimmt werden kann, welche Zellpopulationen sich geteilt haben.

##### 4.19.1 Material

###### CFSE-Stammlösung 10mM

25 mg CFSE<sup>18</sup>

ad 4,5 ml DMSO<sup>5</sup> (wasserfrei, da stark hygroskopisch, Aufbewahrung im Exsikkator)

Lagerung: -20°C, in 50 µl Aliquots, Reste nach dem Auftauen verwerfen

###### RPMI 1640<sup>3</sup>

###### Standardmedium (s. 4.2.1)

###### PBS 2% CHS

1 ml Hühner Serum (CHS)<sup>3</sup>

ad 50 ml PBS

Lagerung: 4°C

**CFSE-Arbeitslösung 2,5  $\mu$ M**

2,5  $\mu$ l      CFSE-Stammlösung  
ad 10 ml    PBS 2% CHS

kurz vor Gebrauch frisch ansetzen

**Flag-chBAFF****Fluo-Puffer** (s. 4.16.1)**Antikörper** (s. Tab. 4.3)

AV20, 16-6, CT3  
anti-Maus-Ig-PE<sup>16</sup>

**4.19.2 Durchführung**

Die benötigte Zahl an Milzleukozyten wurde abzentrifugiert, in 1 ml /  $1 \times 10^7$  Zellen  $37^\circ\text{C}$  warmer CFSE-Arbeitslösung resuspendiert und für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  in einem schüttelnden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort zweimal mit warmem RPMI gewaschen (10 min, 225xg), wobei bei erfolgreicher Färbung eine Gelbfärbung des Zellpellets zu erkennen war.

Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in Standardmedium resuspendiert, auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen / ml eingestellt und auf einer 24 Lochplatte mit 1 ml Zellsuspension / Kavität unter Zugabe von 5% Flag-chBAFF-Zellkulturüberstand für 48 Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  kultiviert.

100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden nach Zugabe von 200  $\mu$ l Fluo-Puffer zur Überprüfung der Färbung im Durchflusszytometer benutzt. Dabei wurde ohne weitere Färbeschritte die Fluoreszenz der Zellen im FL1-Kanal gemessen. Um später die einzelnen Zellteilungen gut voneinander unterscheiden zu können, muss die Fluoreszenz bei ca. 400 Volt zwischen  $10^3$  und  $10^4$  liegen.

Zur Kontrolle der Proliferationsfähigkeit der Zellen nach der Färbung wurden ein Aliquot der CFSE-gefärbten Milzzellen nach der unter 4.3.6 beschriebenen Methode mit 10  $\mu$ g/ml ConA stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen von der Platte genommen, abzentrifugiert und für die durchflusszytometrische Phänotypisierung der proliferierenden/nicht proliferierenden Zellen einer Einfachfärbung nach 4.16.2 unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde dabei anti-Maus-Ig-PE verwendet. Zur Markierung der toten Zellen wurden diese mit 7-AAD angefärbt (s. 4.16.5)

## 4.20 Nachweis der *in vivo* Aktivität von chBAFF

### 4.20.1 Material

**His-chBAFF** (hergestellt nach 4.9)

**His-MxA**

ein exakt wie His-chBAFF hergestelltes und aufgereinigtes Kontrollprotein

**hBCMA-Fc** (s. 4.16.4)

**PBS** (s. 4.2.1)

### 4.20.2 chBAFF-Substitution

3 Tage alten Küken wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen zweimal täglich entweder His-chBAFF oder His-MxA (2 mg/kg KG) *i.p.* injiziert. Nach Bestimmung des Körpergewichts und Entnahme von Blut zur Serumgewinnung wurden die Tiere an Tag 8 getötet. Zur Gewinnung von Leukozyten nach 4.2.3 wurden Milz, Bursa und Caecaltonsillen entnommen. Die Präparationen von Milz und Bursa erfolgten einzeln, die Caecaltonsillen beider Gruppen wurden, um ausreichende Zellzahlen zu erhalten, jeweils vereinigt. Zur Berechnung des Milz/KG-Index wurde zusätzlich das Milzgewicht bestimmt. Während die verschiedenen Leukozytenpräparationen anschließend im Durchflusszytometer analysiert wurden (Färbung s. 4.16.2), wurde in den Seren der Immunglobulingehalt mittels ELISA (s. 4.15.3) bestimmt.

### 4.20.3 chBAFF-Neutralisation

Im ersten Versuch erhielten Küken am 2., 5. und 8. Lebenstag je 300 µg hBCMA-Fc oder das entsprechende Volumen an PBS *i.p.*. An Tag 10 wurden die Tiere gewogen und heparinisier-tes Vollblut gewonnen. Nach Tötung der Tiere wurden Milz, Bursa und Caecaltonsillen entnommen und von Milz und Bursa das Gewicht bestimmt. Je 1 ml Blut / Tier wurde zur Plas- magewinnung genutzt, aus dem restlichen Blut wurden PBL nach 4.2.2 gewonnen. Aus den Milzen und den vereinigten Caecaltonsillen wurden nach 4.2.3 die Leukozyten isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. Der Immunglobulingehalt der Plasmen wurde im ELISA (s. 4.15.3) ermittelt.

Im zweiten Versuch wurde das Behandlungsschema variiert. So wurden Eintagsküken über einen Zeitraum von 5 Tagen einmal täglich 300 µg huBCMA-Fc oder ein entsprechendes Vo- lumen PBS *i.p.* injiziert. An Tag 6 wurden die Tiere getötet und Gewicht, Zellfrequenzen und Immunglobulinspiegel nach dem gleichen Schema wie in Versuch 1 analysiert.

## **4.21 Statistische Auswertung**

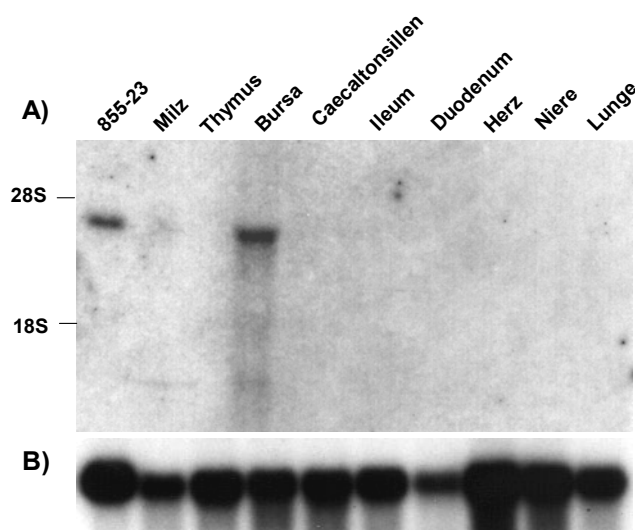
Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der SPSS Software für Windows. Die Daten wurden mit dem Student t-Test ausgewertet.



Zur Gewinnung eines Vollängenklons der löslichen Form von chBAFF wurde das PCR-Primerpaar 5'-AGCAACGAGTAACATGGATTGCAC-3' und 5'-GCTTCAGAGGAGTC-TAACTGCAC-3' konstruiert. Unter Verwendung dieser Primer konnte aus einer cDNA-Bibliothek der Hühner-T-Zelllinie 855-23 [234] der komplette offene Leserahmen von chBAFF amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde daraufhin in den Vektor pcDNA3.1<sup>7</sup> kloniert.

## 5.2 Untersuchung der chBAFF-Expression in verschiedenen Organen

Um eine Übersicht zu erhalten, in welchen Geweben chBAFF exprimiert wird, wurde wie unter 4.6 beschrieben, ein Northern Blot durchgeführt. Dazu wurden jeweils 15 µg RNA aus verschiedenen Hühner Gewebeproben in einem Agarose-Gel mit 4% Formaldehyd der Größe nach aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten PCR-Fragmenten aus der chBAFF-Sequenz hybridisiert. Als Positivkontrolle wurde RNA der Hühner-T-Zelllinie 855-23 verwendet, da in dieser mittels PCR bereits chBAFF-mRNA nachgewiesen werden konnte. Zur Überprüfung der aufgetragenen RNA-Menge wurde die Membran anschließend noch mit radioaktiv markierter cDNA von chicken GAPDH, einem sog. "house-keeping" Gen, beprobt. Neben dem Transkript der Positivkontrolle aus 855-23-Zellen, fand sich ein deutliches Signal in der Bursa. Ein sehr schwaches Signal konnte zudem in der Milzpräparation nachgewiesen werden. Alle übrigen untersuchten Gewebe zeigten keine Expression des Zytokins. Nach der Höhe der Banden zu urteilen, ist die für chBAFF kodierende RNA ungefähr 3 kB groß (Abb. 5.2)

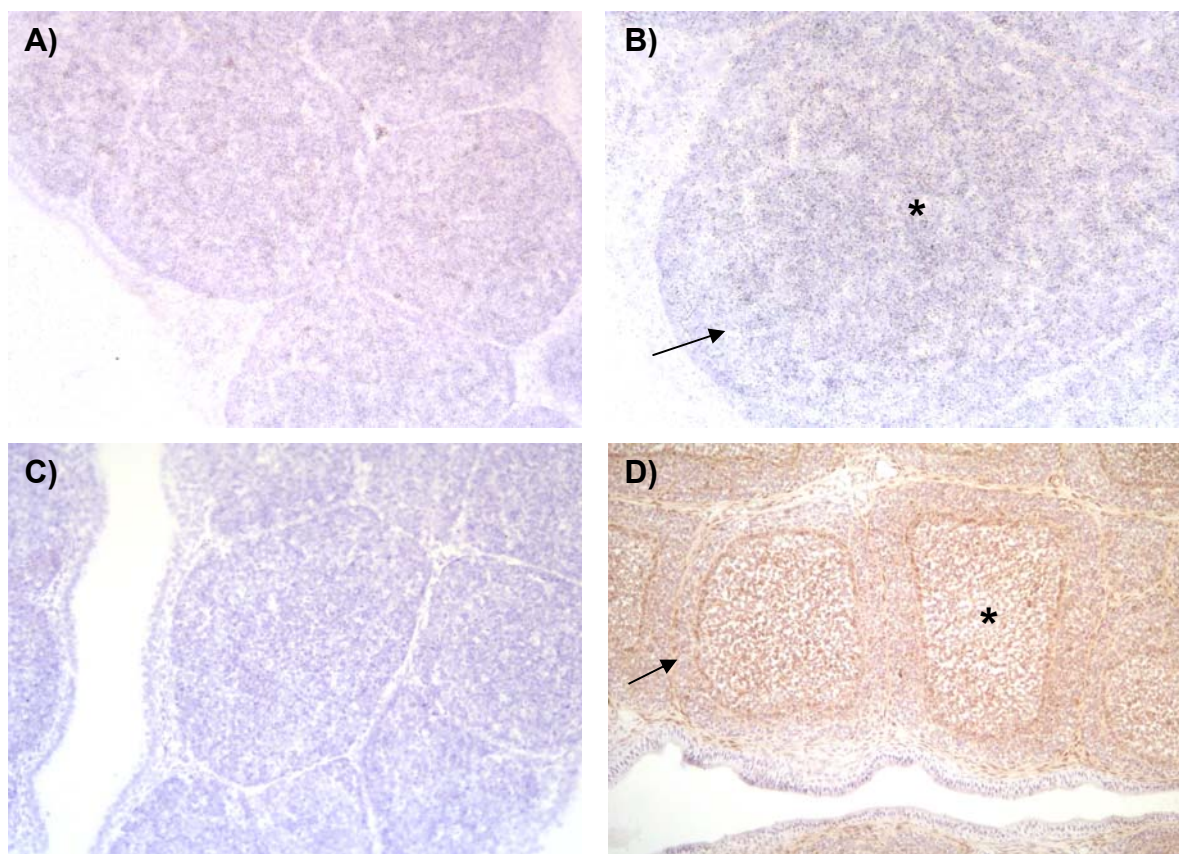


### Abb. 5.2 chBAFF-Genexpressions-Profil

(A) Eine Northern Blot Membran mit RNA-Proben aus verschiedenen Geweben des Huhnes und der Hühner-T-Zelllinie 855-23 wurde mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierter chBAFF-cDNA beprobt. (B) Zur Abschätzung der relativen Menge der aufgetragenen RNA wurde die Membran anschließend nochmals mit einer Hühner-GAPDH-cDNA hybridisiert. Die Positionen der als Marker verwendeten 28S und 18S rRNA sind angezeigt.

Der Northern Blot hatte gezeigt, dass Transkripte für chBAFF vorrangig in der Bursa zu finden sind. Da für die RNA-Präparation jedoch die gesamte Bursa verwendet wurde, blieb offen, welche Zellpopulation der Bursa – B-Zellen oder Stromazellen – das Zytokin produzieren.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine *in situ* Hybridisierung der Bursa durchgeführt. Dabei konnte mit der zur chBAFF-mRNA komplementären und mit  $^{33}\text{P}$  markierten antisense cDNA-Probe im gesamten Organ chBAFF-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 5.3), wobei die Follikelmedulla geringfügig stärker angefärbt wurde als der Cortex. Die zum Vergleich durchgeführte immunhistologische Färbung der B-Zellen in der Bursa mit einem Antikörper gegen Bu1 zeigte die dicht gepackten B-Zellen im Follikelcortex und die etwas lockerere Verteilung der B-Zellen in der Medulla. Anzumerken ist, dass Antikörper gegen Bu1, neben den B-Zellen, auch eine kleine Makrophagenpopulation in der Medulla erkennen. Insgesamt konnte das Verteilungsmuster der chBAFF-Expression durch die *in situ* Hybridisierung keiner bestimmten Zellpopulation in der Bursa zugeordnet werden.



**Abb. 5.3 *in situ* Hybridisierung**

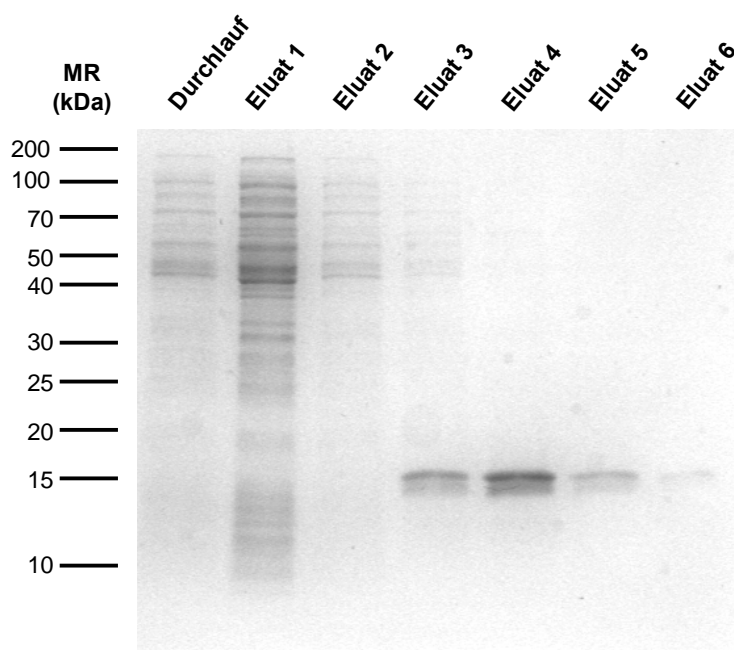
Kryoschnitte der Bursa wurden mit  $^{33}\text{P}$  markierten BAFF-cDNA Proben hybridisiert und einer Kernfärbung mit Hämalaun unterzogen. A) Antisense cDNA, 20fache Vergrößerung. B) Antisense cDNA, 40fache Vergrößerung. C) Sense cDNA, 20fache Vergrößerung. D) Kryoschnitt der Bursa mit einer immunhistologische Färbung der B-Zellen durch einen Antikörper gegen Bu1 (siehe 4.8). Pfeile weisen auf den Cortex, Sterne kennzeichnen die Medulla eines Bursafollikels.

### 5.3 Herstellung und Nachweis von rekombinantem chBAFF

Für die im weiteren geplanten Versuche zur Funktion dieses Zytokins wurde rekombinantes Protein benötigt. Hierzu sollte rekombinantes chBAFF sowohl in einem prokaryotischen als auch in einem eukaryotischen Expressionssystem hergestellt werden.

#### 5.3.1 Prokaryotische Expression in *E.coli*

Zur prokaryotischen Expression von chBAFF in *Escherichia coli* wurde zunächst mit den Primern 5'-CGCGGATCCTCTATTGTCAACGCAGAAGAAACA-3' und 5'-CCCAAGCTTTCAGAGGAGTCTAACTGCACC-3' eine PCR-Reaktion auf der 855-23 cDNA-Bibliothek durchgeführt, über die eine einzelne Schnittstelle für BamHI und HindIII in das PCR-Produkt eingeführt wurde. Anschließend wurde das entstandene cDNA-Produkt zwischen die BamHI und HindIII Schnittstellen des prokaryotischen Expressionsvektors pQE9<sup>19</sup> kloniert und der Vektor in den *E.coli* Stamm M15 transfiziert. Nach Induktion der Expression dieses Konstrukts erhielt man ein im folgenden als His-chBAFF bezeichnetes Produkt, das am N-terminalen Ende um das Peptid Met-Arg-Gly-Ser-(His)<sub>6</sub>-Gly-Ser erweitert ist. Zur Aufreinigung von His-chBAFF wurden Bakterienkulturen bei einer OD<sub>600</sub>=0,5 für eine Stunde mit 1,5 mM Isopropylthiogalactose induziert. Dann wurden die Bakterien mittels Ultraschall lysiert, bevor die Affinitätschromatographie über eine Nickel-Chelat-Agarose-Säule erfolgte (s. 4.9).



**Abb. 5.4 SDS-Gel zur Überprüfung der His-chBAFF Aufreinigung**

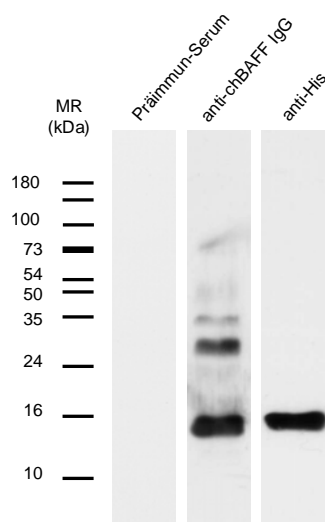
Nach Elution der Ni-Agarose-Säule wurden eine beim Durchlauf des Bakterienlysates entnommene Probe sowie die sechs Elutions-Fractionen in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Eine Bande für chBAFF ist in den Eluaten 3, 4, 5 und – sehr schwach – in Eluat 6 zu erkennen. Bis auf das Eluat 3 sind die Fraktionen annähernd frei von Verunreinigungen.



Die Kontrolle der erhaltenen Elutionsfraktionen erfolgte im SDS-Gel. Wie in Abb. 5.4 gezeigt, enthält das SDS-Gel eine deutliche Bande für ein ca. 15 kDa großes Protein, welches sich überwiegend in den Eluaten 3, 4 und 5 fand. Sehr schwach war diese Bande auch in Eluat 6 zu erkennen. Die Vielzahl weiterer Banden in den Eluaten 1 und 2 waren auf Verunreinigungen zurückzuführen, die sich in geringem Maß auch noch in Eluat 3 fanden. Die Eluate mit den größten Proteinmengen (3-5) wurden anschließend vereinigt und der Proteingehalt nach dem Umpuffern in PBS photometrisch bestimmt. Diese Präparationen enthielten zu >95% rekombinantes chBAFF mit einem geringen Anteil an Verunreinigungen. Im Mittel konnten aus einem Liter Bakterienkultur 0,2–0,4 mg His-chBAFF gewonnen werden. Dies war im Vergleich zur Aufreinigung anderer Proteine wie z.B. chIFN $\gamma$  [234] eine relativ geringe Ausbeute.

### 5.3.2 Gewinnung eines Kaninchenserums gegen chBAFF

Nachdem prokaryotisch exprimiertes His-chBAFF in gereinigter Form vorlag, wurde ein Kaninchen mehrmals mit 0,2 mg His-chBAFF in FCA bzw. FIA immunisiert (s. 4.11.2). Die erste Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte drei Wochen nach der zweiten Boosterung. Das gewonnene Antiserum wurde zunächst im Dot Blot getestet und zeigte eine deutlich positive Reaktion mit His-chBAFF, während das als Kontrolle dienende Präimmunserum negativ blieb. Hierauf wurden die Seren aus mehreren Blutentnahmen vereinigt und die IgG-Fraktion, wie in 4.11.3 beschrieben, über eine ProteinA-Sepharose aufgereinigt. Das gereinigte Kaninchen-anti-chBAFF-IgG wurde nach 4.14 im Western Blot auf seine spezifische Bindung an chBAFF überprüft. Hierzu wurde über Ni-Agarose aufgereinigtes His-chBAFF verwendet und die Membran zur Kontrolle mit einem Antikörper gegen das Histidin-Tag gefärbt, wobei eine knapp 16 kDa schwere Bande sichtbar wurde (Abb. 5.5).



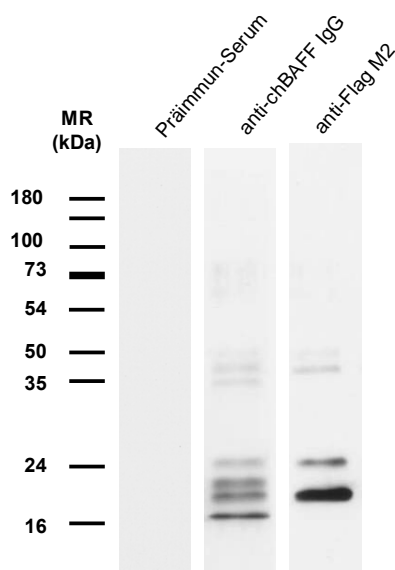
**Abb. 5.5 Western Blot mit gereinigtem Kaninchen anti-chBAFF IgG**

1  $\mu$ g His-chBAFF wurde pro Reihe in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit 5  $\mu$ g Kaninchen-anti-chBAFF IgG, 5  $\mu$ g Maus-anti-Histidin-Tag Antikörper oder Präimmunserum (1:500) gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen-POD und anti-Maus-POD verwendet. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL-System.

Dies entspricht den, bei der Kontrolle der Aufreinigung, im SDS-Gel erhaltenen Banden (vgl. Abb. 5.4). Eine identische Bande wird auch bei der Färbung mit anti-chBAFF-IgG abgebildet, während die Kontrollfärbung mit dem Präimmunserum negativ blieb. Das gereinigte Serum enthält folglich spezifische Antikörper gegen das prokaryotisch exprimierte Zytokin. Die in der Färbung mit anti-chBAFF-IgG zusätzlich entstandenen Banden, dürften auf Verunreinigungen in den zur Immunisierung benutzten Präparationen zurückzuführen sein, gegen die das Kaninchen ebenfalls Antikörper gebildet hat.

### 5.3.3 Eukaryotische Expression in 293T-Zellen

Zur Expression von chBAFF in eukaryotischen Zellen wurde zunächst eine PCR mit 855-23 cDNA und den Primern 5'-CAAATGCATTCTATTGTCAACGCAGAAGAA-3' und 5'-CCGGAATTC TCAGAGGAGTCTAACTGCAC-3' durchgeführt. Hierdurch wurden in der Nähe der Fragmentenden einzelne Schnittstellen für NsiI und EcoRI integriert, sodass das PCR-Produkt anschließend mit NsiI und EcoRI verdaut werden konnte. Das entstandene Fragment entspricht der löslichen Form von chBAFF und enthält alle 152 Aminosäuren die stromabwärts der möglichen Furinschnittstelle liegen. Um eine sezernierbare Form von chBAFF zu erhalten, wurde das verdaute PCR-Produkt stromabwärts des Hämagglutinin-Signal-Peptids und der Flag-Sequenz in eine Modifikation des PCR-3-Vektors kloniert, da dieser Vektor eine effiziente Expression von cDNA in eukaryotischen Zellen vermittelt [235]. Mit diesem Konstrukt wurden unter Verwendung von Metafectene<sup>26</sup> 293T-Zellen transfiziert und die Überstände nach 72 Stunden geerntet. Da das von den Zellen in den Überstand abgegebene Protein ein Flag-Tag trägt, wird es im Folgenden als Flag-chBAFF bezeichnet.

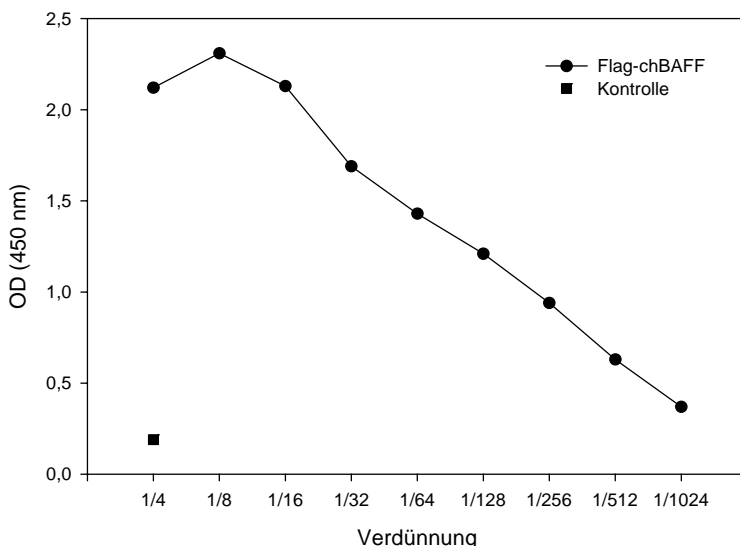


**Abb. 5.6 Nachweis von Flag-chBAFF im Western Blot**

Flag-chBAFF haltiger 293T-Überstand wurde wie unter 4.14 beschrieben im 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde anschließend mit Präimmunserum (1:500), 5 µg Kaninchen-anti-chBAFF oder anti-Flag-M2-POD gefärbt. Für die Kaninchenserum wurde als sekundärer Antikörper anti-Kaninchen-POD verwendet. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL-System.

Auf dem im Anschluss mit den Überständen durchgeführten Western Blot waren bei Färbung der Membran mit anti-Flag-M2-POD Banden mit dem geschätzten Molekulargewicht von 18, 24, 35 und 50 kDa erkennbar. Dabei handelt es sich bei den Banden von 35 und 50 kDa vermutlich um Dimere der beiden leichteren Banden. Als Ursache für die zwei verschiedenen Monomere mit 18 und 24 kDa kommen sowohl unterschiedliche Prozessierung als auch Glykosylierung in Frage. Die Färbung der Membran mit dem gereinigten Kaninchen-anti-chBAFF-IgG wies die selben Banden auf, enthielt jedoch noch weitere Banden, die wie in 5.3.2 angesprochen, durch Antikörper gegen Verunreinigungen in der zur Immunisierung des Kaninchens benutzten Probe verursacht werden. Das zur Kontrolle benutzte Präimmunserum war auch in diesem Fall negativ, sodass sich feststellen lässt, dass das polyklonale Kaninchen-anti-chBAFF IgG nicht nur an His-chBAFF sondern auch an das eukaryotisch exprimierte Flag-chBAFF bindet.

Zum quantitativen Nachweis von Flag-chBAFF in 293T-Überständen, wurde unter Verwendung des anti-Flag-M2-Antikörpers und des gereinigten anti-chBAFF-Kaninchenserums ein ELISA etabliert (4.15.2). So konnte der relative Flag-chBAFF-Gehalt in den verschiedenen Chargen von 293T-Überständen bestimmt werden. Abb. 5.7 zeigt eine typische Titrationskurve des Zellkulturüberstandes.

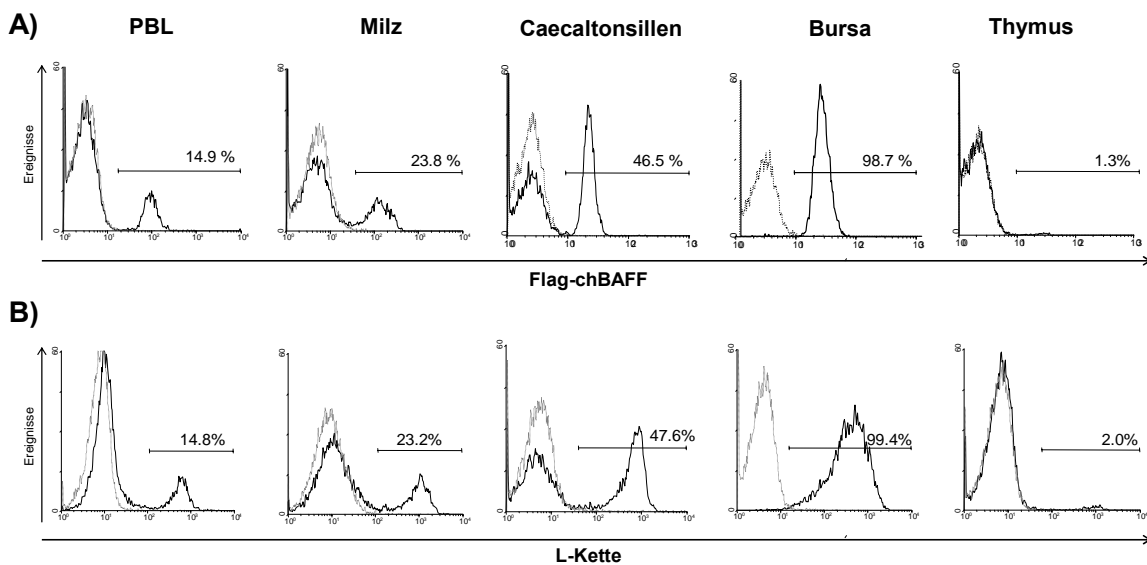


**Abb. 5.7 Bestimmung des Flag-chBAFF-Gehalts im ELISA**

Auf eine mit dem anti-Flag-M2-Antikörper beschichtete ELISA-Platte wurde eine log<sub>2</sub>-Titration des Zellkulturüberstandes von Flag-chBAFF transfizierten 293T-Zellen aufgetragen und mittels Kaninchen-anti-chBAFF, anti-Kaninchen-IgG-POD und TMB analysiert. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 450nm. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit allen Antikörpern, aber ohne Zellkulturüberstand.

## 5.4 Selektive Bindung von chBAFF an B-Zellen

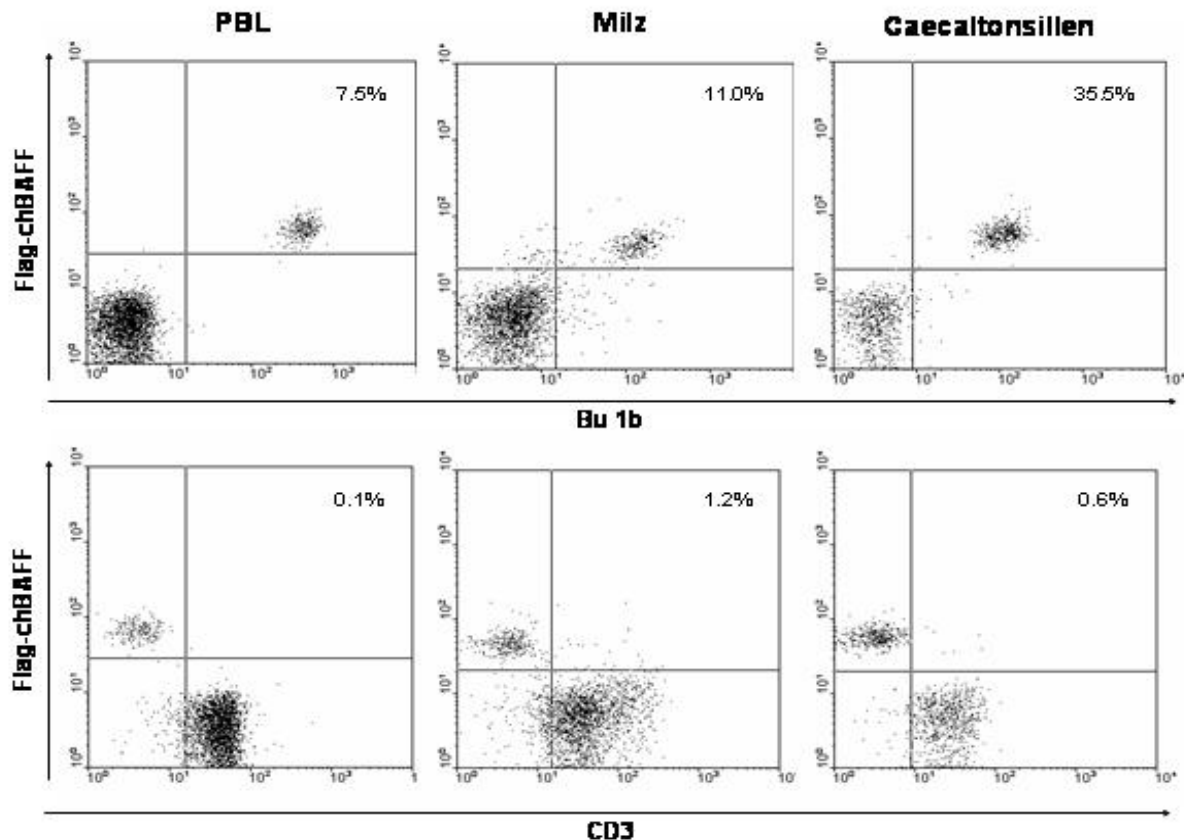
Beim Säuger finden sich die drei bekannten Rezeptoren für BAFF, BAFF-R, BCMA und TACI hauptsächlich auf B-Zellen. Während BAFF-R dabei exklusiv von B-Zellen exprimiert wird, sind TACI und BCMA zum geringen Teil auch auf anderen Zellen vorhanden (s. 2.2.3). Um zu untersuchen, an welche Zellen das Zytokin beim Huhn bindet, wurde versucht, die Bindung von Flag-chBAFF an einen Rezeptor über die Färbung mit einem anti-Flag-Antikörper nachzuweisen. Nachdem sich die Durchführbarkeit dieser Methode in ersten Versuchen erwiesen hatte, folgten durchflusszytometrische Untersuchungen verschiedenster Zellpräparationen. Hierzu wurden zunächst nach 4.2.2 und 4.2.3 hergestellte Lymphozytenpräparationen aus Blut, Milz, Bursa, Caecaltonsillen und Thymus in einer Einfachfärbung (s. 4.16.2.) im FACS analysiert. Abb. 5.8 zeigt, dass sich sowohl in den PBL, als auch in der Milz und den Caecaltonsillen eine deutlich abgrenzbare Zellpopulation fand, an die Flag-chBAFF gebunden hatte. In der Bursa exprimierten praktisch alle Zellen Rezeptoren für das Zytokin, während eine Bindung von Flag-chBAFF an Thymozyten nicht nachzuweisen war. Diese Daten und die Tatsache, dass die Frequenz der positiven Zellen exakt der durch Färbung mit einem anti-L-Ketten-Antikörper bestimmten Frequenz der B-Zellen in den Präparationen entsprach, wies stark daraufhin, dass BAFF-Rezeptoren auch beim Huhn hauptsächlich auf B-Zellen zu finden sind.



**Abb. 5.8 Bindung von chBAFF an Lymphozyten**

Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von Flag-chBAFF an Lymphozyten aus Blut, Milz, Caecaltonsillen, Bursa und Thymus (A), bzw. der B-Zellfrequenz durch Färbung mit einem Antikörper gegen die L-Kette (B). Die gestrichelten Histogramme im Hintergrund geben die Fluoreszenz der Kontrolle, d.h. des leeren Vektors für Flag-chBAFF bzw. eines isotypischen Kontrollantikörpers an.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurden Lymphozyten aus Blut, Milz und Caecaltonsillen wie in 4.16.3 beschrieben, einer Doppelfärbung mit Flag-chBAFF und spezifischen Antikörpern gegen B-Zellen (Bu1b) bzw. T-Zellen (CD3) unterzogen. Abb. 5.9 ist zu entnehmen, dass sowohl im Blut als auch in Milz und Caecaltonsillen alle Bu1b<sup>+</sup> Zellen, somit alle B-Zellen, auch in der zweiten Fluoreszenz positiv waren, sich daher mit Flag-chBAFF anfärben ließen. Umgekehrt betrachtet, waren alle Flag-chBAFF<sup>+</sup> Zellen auch Bu1b<sup>+</sup>. Die Färbung mit anti-CD3 dagegen zeigte, dass Flag-chBAFF nicht an CD3<sup>+</sup> Zellen, also T-Zellen gebunden hat und alle Flag-chBAFF<sup>+</sup> Zellen CD3<sup>-</sup> sind. Weitere Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten ergaben, dass auch diese Zellen Flag-chBAFF nicht binden können (Daten nicht gezeigt). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Rezeptoren für chBAFF ausschließlich auf B-Zellen exprimiert werden.

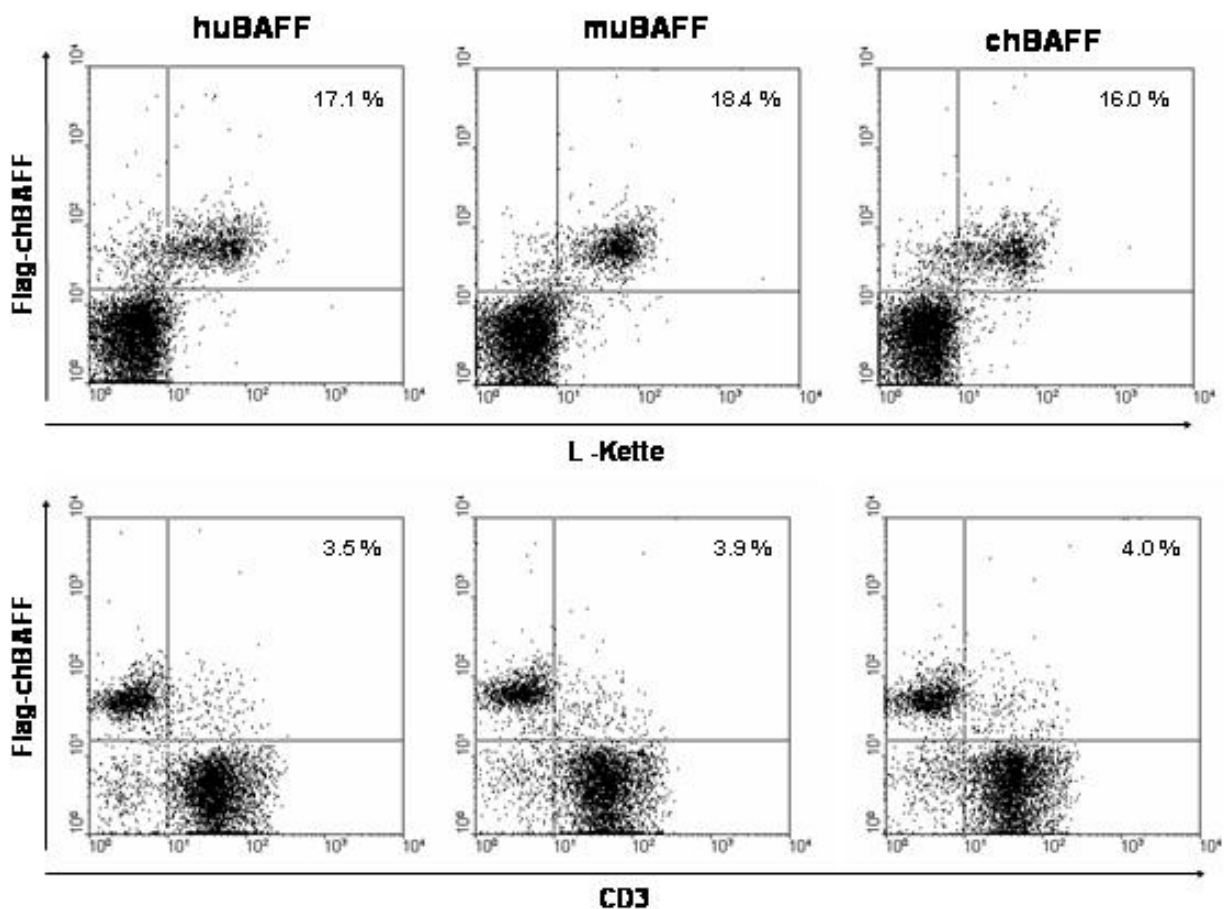


**Abb. 5.9 Bindung von chBAFF an B-Zellen**

Lymphozyten aus Blut, Milz und Caecaltonsillen von 7 Wochen alten Tieren wurden nach 4.16.3 in Fluoreszenz 1 mit spezifischen Markern für B-Zellen (Bu1b) und T-Zellen (CD3) und in Fluoreszenz 2 mit Flag-chBAFF gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen chBAFF und humanem bzw. murinem BAFF, stellte sich die Frage, ob humanes und murines BAFF auch in der Lage sind, mit BAFF-Rezeptoren des Huhnes zu interagieren. Vergleichend durchgeführte Doppelfärbungen mit PBL, Milz, Caecaltonsillen, Bursa und Thymus ergaben in allen Fällen, dass muBAFF und huBAFF ebenso wie chBAFF selektiv an Hühner-B-Zellen bindet. Dabei war neben dem Färbemuster auch die Intensität der Färbung mit derjenigen von chBAFF vergleichbar.

Abb. 5.10 zeigt den durchflusszytometrischen Vergleich der Bindung der drei Zytokine am Beispiel der Milz.



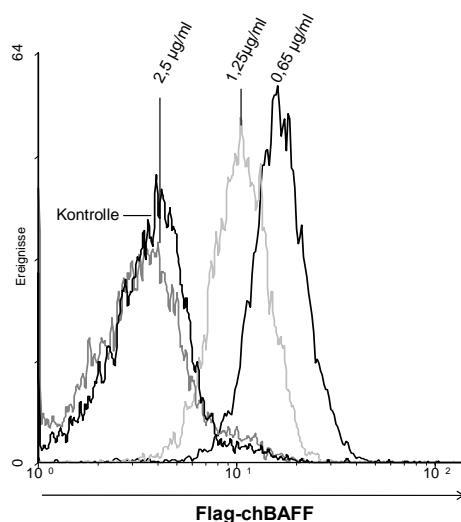
**Abb. 5.10 Vergleich der Bindung von huBAFF, muBAFF und chBAFF an Milzlymphozyten**

Milzlymphozyten wurden in einer Doppelfärbung (s. 4.16.3) vergleichend mit huBAFF, muBAFF und chBAFF gefärbt. In der oberen Reihe wurde mit dem anti-L-Ketten-Antikörper eine spezifische Färbung gegen B-Zellen, in der unteren Reihe mit anti-CD3 eine spezifische Färbung gegen T-Zellen durchgeführt.

Interessanterweise bindet chBAFF auch an B-Zellen von Ente und Pferd (Daten nicht gezeigt). Da für diese beiden Spezies bislang nur unzureichende Marker für B-Zellen vorhanden sind, könnte Flag-chBAFF zukünftig als solcher eingesetzt werden.

## 5.5 Inhibition der chBAFF-Bindung durch humanes BCMA

Wie Abb. 5.10 zeigt, binden sowohl humanes als auch murines BAFF an B-Zellen des Huhnes. Zusätzlich konnte in Kooperation mit Dr. Pascal Schneider (Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz) sowohl mittels Rezeptor-Ligand-Interaktions-ELISA als auch durch eine Ko-Immunopräzipitation nachgewiesen werden, dass chBAFF an alle BAFF-Rezeptoren von Mensch und Maus, also BAFF-R, BCMA und TACI bindet [221]. Da humanes BCMA als BCMA-Fc-Konstrukt in löslicher Form zur Verfügung stand, konnte im weiteren überprüft werden, ob es auch in der Lage ist, die Rezeptorbindungsstellen von chBAFF zu blockieren und damit die Bindung von chBAFF an Hühner-B-Zellen zu inhibieren. Hierzu wurde Flag-chBAFF mit verschiedenen Konzentrationen von huBCMA-Fc vorinkubiert und anschließend zur Färbung von Bursalymphozyten verwendet (s. 4.16.4). Üblicherweise konnte der 293T-Überstand für die Durchflusszytometrie bis 1:50 verdünnt werden, wurde für diesen Versuch aber in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt. Es zeigte sich, dass durch Präinkubation des Flag-chBAFF haltigen Zellkulturüberstandes mit huBCMA-Fc in einer Konzentration von 2,5 µg/ml, die Fluoreszenzintensität der Zellen auf die der Negativkontrolle reduziert und die Bindung von Flag-chBAFF an die Zellen folglich vollständig inhibiert werden konnte. Während 1,25 µg/ml huBCMA noch zu einer Reduktion der Flag-chBAFF-Bindung führte, war mit 0,65 µg/ml keine Hemmung mehr nachzuweisen, da die Fluoreszenzintensität der Zellen bei dieser Konzentration derjenigen von nur mit Flag-chBAFF gefärbten Zellen entsprach (Abb. 5.11). Folglich bindet huBCMA-Fc nicht nur an chBAFF sondern kann auch die Interaktion des Zytokins mit seinem membranständigen Rezeptor vollständig inhibieren.

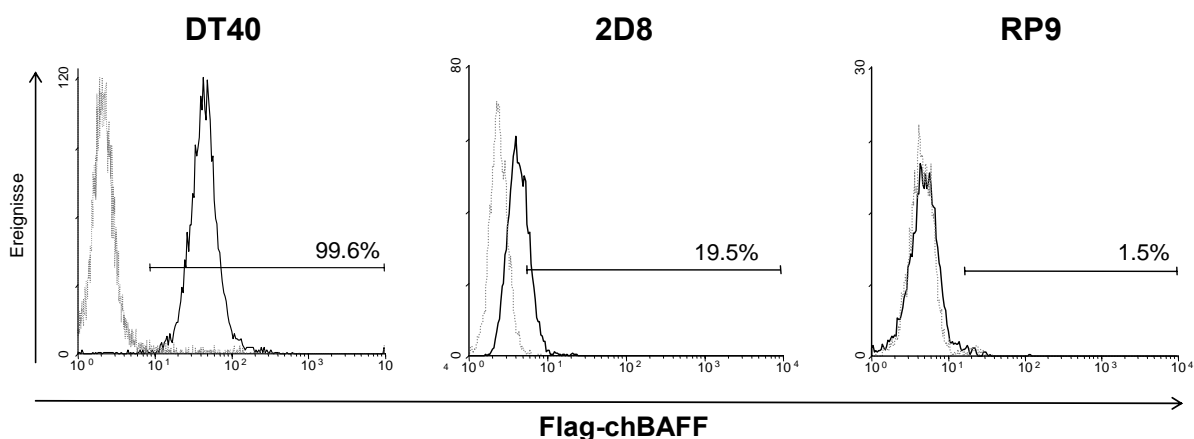


**Abb. 5.11 Inhibition der Flag-chBAFF-Bindung durch huBCMA-Fc**

Flag-chBAFF Zellkulturüberstände, wurden 1:2 verdünnt und für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen (0,65 µg – 2,5 µg) an huBCMA-Fc vorinkubiert. Im Anschluss daran wurden Bursalymphozyten eines sechs Wochen alten Tieres mit diesen Proben gefärbt und im FACS gemessen.

## 5.6 chBAFF-Rezeptoren auf Hühner-Zelllinien

Für die oben beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen wurden ausschließlich primäre Zellen verwendet. Da für weiterführende Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Interaktion die Verfügbarkeit einer Zelllinie mit Expression der entsprechenden Rezeptoren von großem Nutzen wäre, wurden verschiedene im Labor vorhandene Hühner-B-Zelllinien im Durchflusszytometer auf ihre BAFF-Rezeptoren Expression getestet (siehe Abb. 5.12). Hierbei zeigte sich, dass DT40-Zellen, eine aus Hühner-Bursazellen generierte und in der Molekularbiologie vielfach verwandte Zelllinie, in der Färbung mit Flag-chBAFF deutlich positiv war, also einen oder mehrere Rezeptoren für chBAFF in der Zellmembran trägt. Die Fluoreszenzintensität mit der ein Molekül im Durchflusszytometer angefärbt werden kann ist ein Maß für seine Expressionsdichte auf der Zelloberfläche. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten von DT40-Zellen und primären B-Zellen (s. Abb. 5.8), deutet auf eine annähernd gleich hohe Rezeptordichte hin. Bei 2D8-Zellen handelt es sich um eine, in unserem Labor durch REV-Transformation etablierte B-Zelllinie, die eine geringgradige Bindung von Flag-chBAFF zeigte. Dagegen sind die durch Transformation mit aviärem Leukose Virus entstandenen RP9-Zellen eindeutig Flag-chBAFF negativ und exprimieren somit keinen BAFF-Rezeptor auf der Zelloberfläche.



**Abb. 5.12 chBAFF-Bindung an Hühner-B-Zelllinien**

Die Hühner-B-Zelllinien DT40, 2D8 und RP9 wurden wie in 4.16.2 beschrieben mit Flag-chBAFF gefärbt und im Durchflusszytometer auf ihre BAFF-Rezeptorexpression hin analysiert. Als Kontrolle diente Überstand von 293T-Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden (gestrichelte Histogramme).

## 5.7 Ontogenese der chBAFF-Rezeptor(en)-Expression

Die B-Zellentwicklung lässt sich beim Huhn in eine präbursale, eine bursale und eine postbursale Phase einteilen. Dabei vermehren sich die Vorläufer-B-Zellen zunächst außerhalb der Bursa in Milz, Dottersack und Knochenmark, bevor sie in die Bursa einwandern und die

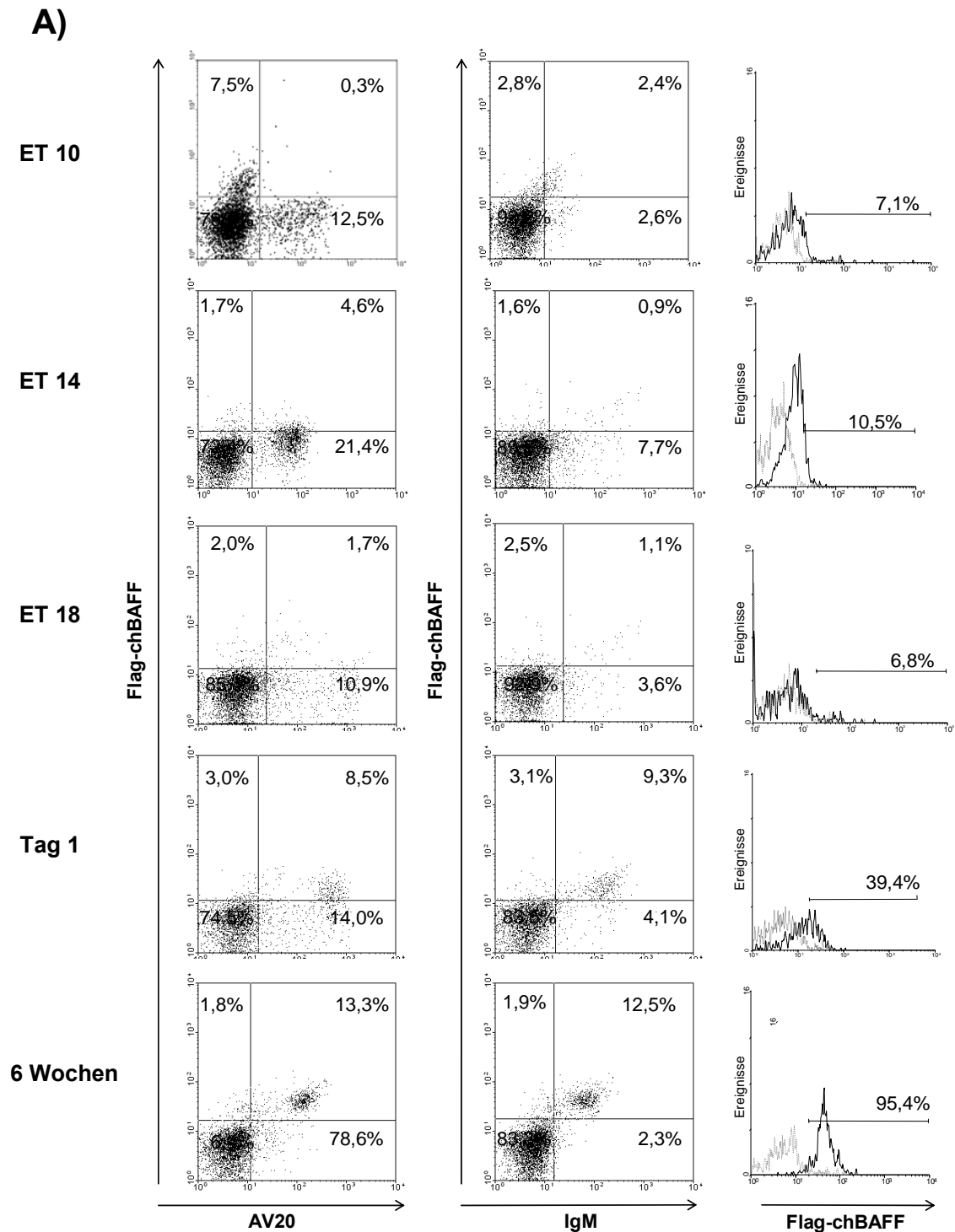


Variabilität des BCR mittels „gene conversion“ generieren. Das Rearrangement des Immunglobulinmoleküls erfolgt unabhängig vom an die Bursa gebundenen Mechanismus der „gene conversion“, sodass z.T. schon in präbursalen Zellen Immunglobulin in der Zellmembran (sIg) exprimiert wird. All dies findet beim Huhn während der embryonalen Entwicklung statt. Erst ab dem Tag des Schlupfes wandern die naiven B-Zellen aus der Bursa wieder in die Peripherie.

Dass alle B-Zellen von mehreren Wochen alten Tieren BAFF-Rezeptoren exprimieren, konnte durch die bisherigen Versuche klar belegt werden. Im Weiteren stellte sich die Frage, ob dies auch für B-Zellen und B-Zellvorläufer in Hühnerembryonen und frisch geschlüpften Tieren zutrifft. Hierzu wurde die Milz von 10, 14 und 18 Tage alten Hühnerembryonen und Küken am ersten Lebenstag entnommen. Ab Embryonaltag (ET) 14 war auch die Entwicklung der Bursa so weit fortgeschritten, dass sie entnommen werden konnte. Aus den Organen wurden die Lymphozyten isoliert und nach einer Doppelfärbung mit Flag-chBAFF und Antikörpern gegen Bu1 und IgM im Durchflusszytometer analysiert. Das vom Antikörper AV20 erkannte Antigen Bu1 (chB6) wird bereits von frühen Vorläufer-B-Zellen exprimiert, weshalb die B-Zellfrequenz in den Organen durch Färbung mit AV20 bestimmt wurde. Zwar wird chB6 auch von einer kleinen Subpopulation der Bursa-Stromazellen exprimiert, diese wurden jedoch durch die vorhergehende Dichtezentrifugation entfernt. Zum Nachweis der sIg-Expression diente die Färbung mit einem Antikörper gegen IgM, die BAFF-R-Expression wurde wieder über die Bindung von Flag-chBAFF ermittelt.

Für die verschiedenen Zeitpunkte ergab sich dabei das in Abb. 5.13 dargestellte Bild.

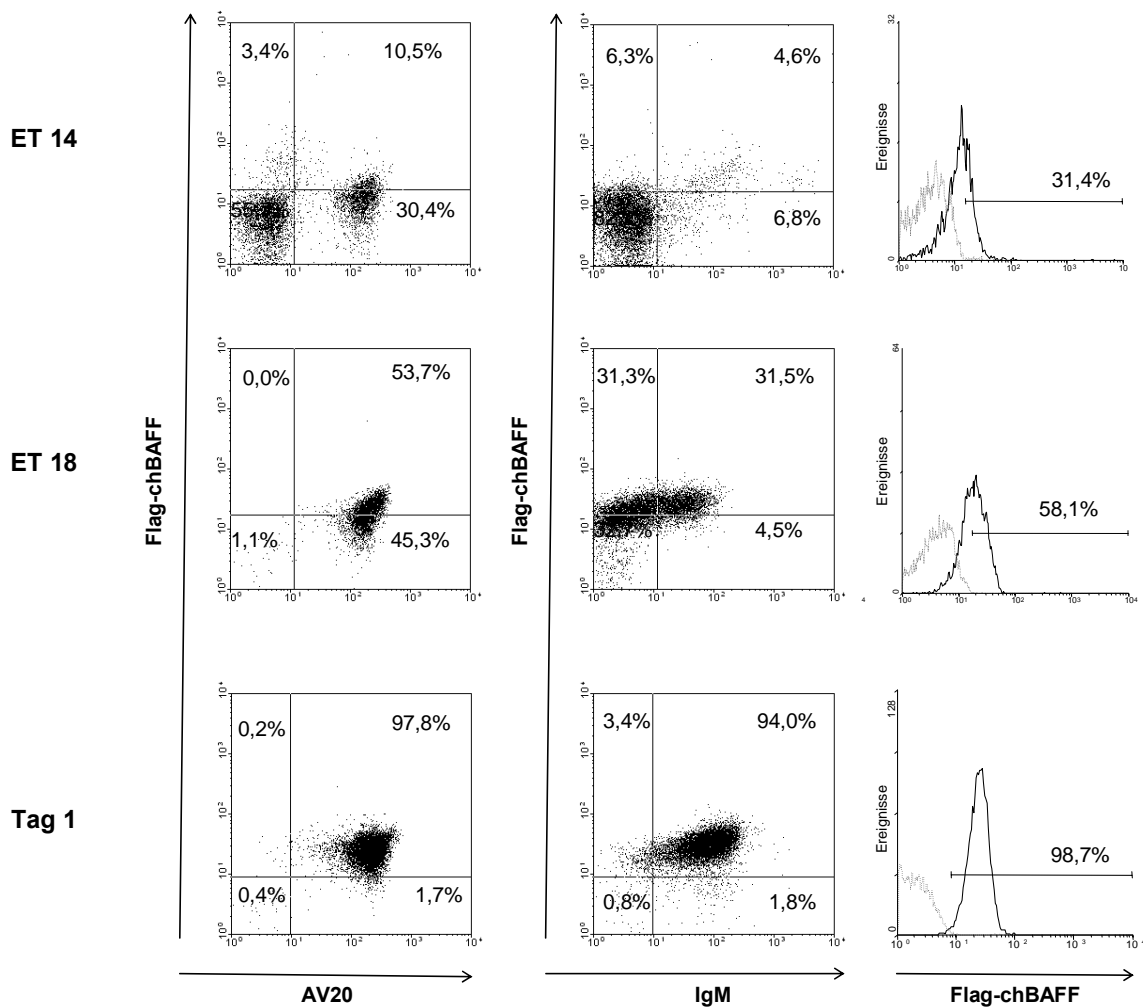
Am Embryonaltag 10 waren in der Milz bereits 15% AV20<sup>+</sup> Zellen nachweisbar. Diese B-Zellvorläufer waren IgM<sup>-</sup> und konnten kein Flag-chBAFF binden. Bis zum Embryonaltag 14 stieg die Frequenz der AV20<sup>+</sup> Zellen in der Milz weiter an (21,4%), wobei ein geringer Teil dieser Zellen auch IgM<sup>+</sup> war. Flag-chBAFF scheint zu diesem Entwicklungs-Zeitpunkt sehr schwach an die B-Zellen der Milz zu binden. Zur selben Zeit waren in der Bursa bereits 30% der Zellen AV20<sup>+</sup>. Hierbei handelt es sich um aus der Peripherie in die Bursa eingewanderte B-Zellen, die ebenfalls alle eine schwache BAFF-Rezeptor(en)-Expression zeigten. Ein Teil dieser Zellen war IgM<sup>+</sup> und diese Population zeigte bereits eine deutliche Bindung von Flag-chBAFF. Während die Frequenz der AV20<sup>+</sup> Zellen bis zum 18. Embryonaltag in der Milz auf 10% abnahm und diese Zellen weder den BCR noch einen BAFF-Rezeptor exprimierten, waren die aus der Bursa gewonnenen Lymphozyten beinahe vollständig AV20<sup>+</sup> und zeigten erstmals alle eine deutliche Flag-chBAFF-Bindung. Der Einbau von Ig in die Zellmembran war dabei schon bei gut einem Drittel der Zellen nachweisbar.



### Abb. 5.13 Ontogenese der chBAFF-Rezeptor-Expression

Lymphozyten aus Milz (A) bzw. Bursa (B) (s. nächste Seite) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (ET= Embryonaltag) aus den jeweiligen Organen von Hühnern der Linie M11 gewonnen und im Durchflusszytometer auf B-Zellfrequenz (AV20<sup>+</sup>), sIg-Expression (IgM<sup>+</sup>) und Flag-chBAFF-Bindung analysiert. Während in der linken und mittleren Spalte alle Zellen dargestellt sind, zeigen die Histogramme in der rechten Spalte lediglich die Bindung von Flag-chBAFF an AV20<sup>+</sup> Zellen, im Vergleich zur Färbung mit Kontrollübeständen (gestrichelte Histogramme). Um die einzelnen Färbungen vergleichen zu können, wurden zu jedem Zeitpunkt PBL eines adulten Tieres als Kontrolle mitgefärbt (nicht abgebildet).

B)



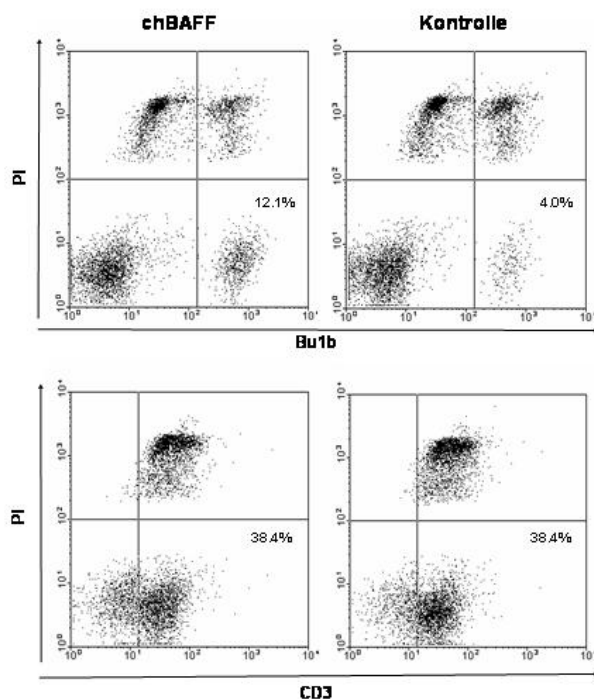
Diese Entwicklung setzte sich bis zum Schlupf fort, sodass bei Eintagsküken annähernd alle Lymphozyten der Bursa  $AV20^+$  und  $IgM^+$  waren und nochmals eine Zunahme der BAFF-Rezeptor(en)-Expression aufwiesen. Auch in der Milz fanden sich an Tag 1 nur noch  $AV20^+$  Zellen, die gleichzeitig  $IgM^+$  waren, alle eine deutliche Färbung mit Flag-chBAFF erkennen ließen und B-Zellen repräsentieren, die bereits aus der Bursa in die peripheren lymphatischen Organe ausgewandert sind. Im Alter von sechs Wochen lag die Frequenz der B-Zellen ( $AV20^+/IgM^+$ ) in der Milz bei verschiedenen Tieren zwischen 12 und 35%. Im Unterschied zu Tag 1 ist jedoch nochmals eine Zunahme der BAFF-Rezeptor(en) Expression erkennbar.

## 5.8 Biologische Aktivität von chBAFF: *in vitro* Studien

Nachdem die zuvor beschriebenen Versuche gezeigt hatten, dass chBAFF ausschließlich an B-Lymphozyten bindet, sollte nachfolgend die biologische Funktion des Zytokins charakterisiert werden. Die Untersuchungen hierzu erfolgten zunächst *in vitro*.

### 5.8.1 Wirkung von chBAFF auf B-Zellen der Milz

Dazu wurden Lymphozyten aus der Milz isoliert und für 72 Stunden mit rekombinantem Flag-chBAFF oder Kontrollüberstand inkubiert. Anschließend wurde mittels einer kombinierten Färbung mit einem B-Zell spezifischen Antikörper (Bu1b) und Propidium Iodid (PI), einem Fluoreszenzfarbstoff der tote Zellen anfärbt, die Frequenz lebender B-Zellen in den Kulturen durchflusszytometrisch bestimmt (s. 4.16.5). Hierbei zeigte sich (s. Abb. 5.14), dass die Frequenz lebender B-Zellen (Bu1b<sup>+</sup>/PI) in Kulturen mit chBAFF dreimal höher war als in Kontrollkulturen (12,1% vs. 4%). Auf die Frequenz lebender CD3<sup>+</sup> T-Zellen hatte die Inkubation mit chBAFF dagegen keinen Einfluss (38,4% vs. 38,4%).

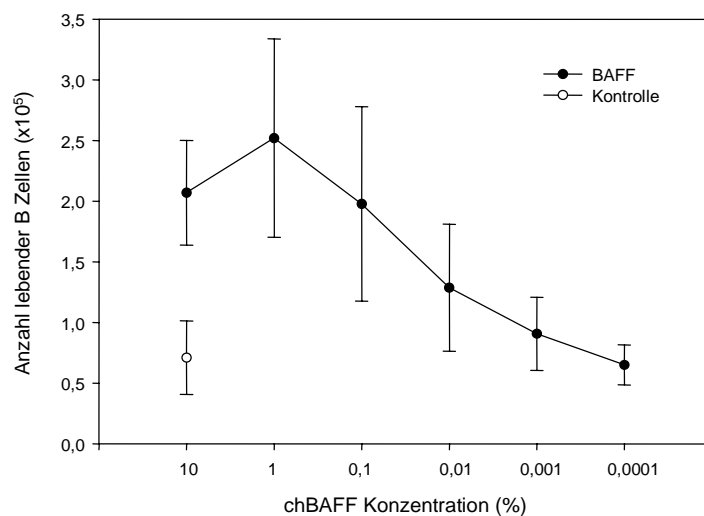


**Abb. 5.14 chBAFF erhöht in Milz-Lymphozyten-Kulturen die Frequenz lebender B-Zellen**

Milzlymphozyten wurden für 72 Stunden mit 5% Flag-chBAFF haltigem Medium oder Kontrollmedium inkubiert und zur Bestimmung der Frequenz lebender B-Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen spezifische Marker für B-Zellen (Bu1b) und T-Zellen (CD3) gefärbt. Die Diskriminierung zwischen toten und lebenden Zellen erfolgte über eine Färbung mit PI.

Zur genaueren Charakterisierung dieses Effekts, wurden  $5 \times 10^6$  Milzlymphozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von 10 bis 0,0001% Flag-chBAFF kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zahl lebender B-Zellen in den Kulturen bestimmt. Hierzu wurde zunächst nach einer Färbung mit Trypanblau die Gesamtzahl lebender Zellen im Mikroskop gezählt. Anschließend erfolgte, wie beschrieben, die durchflusszytometrische Bestimmung der Frequenz

lebender B-Zellen in den Proben. Aus diesen beiden Werten konnte daraufhin die absolute Zahl lebender B-Zellen in den Kulturen berechnet werden. Wie Abb. 5.15 zeigt, wurde durch den Zusatz von chBAFF nicht nur die Frequenz, sondern auch die Gesamtzahl lebender B-Zellen erhöht, d.h. der chBAFF-Effekt wurde nicht durch den schnelleren Tod anderer Zellpopulationen vermittelt. Dieser Effekt war eindeutig dosisabhängig, wobei die maximale Wirkung, mit einer Erhöhung der B-Zellzahl um das 3–4fache, ab einer Zugabe von 1% chBAFF erreicht wurde. Identische Ergebnisse wurden bei Einsatz von humanem und murinem BAFF in einer Konzentration von 2 mg/ml erzielt.



**Abb. 5.15 Dosis-Abhängigkeit der chBAFF-Wirkung**

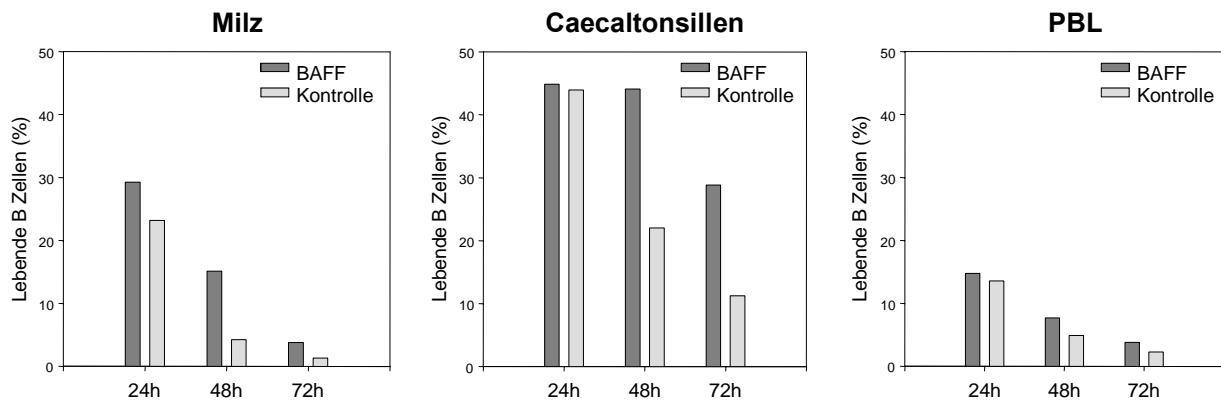
$5 \times 10^6$  Milzlymphozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10–0,0001%) von Flag-chBAFF haltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Der Kontrollansatz enthielt 10% Überstand von mit leerem Plasmid transfizierten Zellen. Nach 48 Stunden wurde die Zahl der lebenden Zellen in den Proben über eine Trypanblau Färbung ermittelt und die Frequenz lebender B-Zellen ( $Bu1b^+$  / PI) im FACS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert ( $MW$ ) und Standardabweichung ( $SD$ ) aus drei unabhängigen Versuchen.

### 5.8.2 Wirkung von chBAFF auf periphere B-Zellen

Da alle peripheren B-Zellen-Rezeptoren für chBAFF exprimieren, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob chBAFF die bisher gezeigte Wirkung auf B-Zellen aus der Milz auch auf andere periphere B-Zellpopulationen ausübt. Hierzu wurden neben Milzlymphozyten zusätzlich Lymphozyten aus Blut und Caecaltonsillen isoliert und mit 5% Flag-chBAFF-Überstand bzw. Kontrollüberstand kultiviert. Um den Effekt von chBAFF in den einzelnen Proben besser vergleichen zu können, wurde noch vor Kultivierung der Zellen die B-Zellfrequenz im Durchflusszytometer ermittelt. Nach 24-, 48- und 72-stündiger Kultur der Zellen unter den oben (s. 5.8.1) beschriebenen Bedingungen, wurde die Zahl lebender B-Zellen in den Kulturen bestimmt. Abb. 5.16 stellt den Anteil der zu den jeweiligen Zeitpunkten noch lebenden B-Zellen an der Gesamtzahl der ursprünglich in den Kulturen enthaltenen B-Zellen dar. Zu erkennen ist, dass auf Milzlymphozyten bereits nach 24 Stunden ein schwacher Effekt feststellbar, der nach 48 Stunden voll ausgeprägt zu einer beinahe 4-fachen Erhöhung der lebenden B-Zellen führte (15% vs. 4%) und auch nach 72 Stunden noch nachzuweisen war. Eine Steigerung der

Zahl lebender B-Zellen zeigte sich auch in den Caecaltonsillen. Dabei wiesen die B-Zellen aus diesen speziellen sekundären lymphatischen Organen insgesamt eine deutlich höhere Viabilität auf, als diejenigen aus Milz und PBL. So waren mit 45% (chBAFF) bzw. 44% (Kontrolle) nach 24 Stunden in beiden Gruppen noch fast die Hälfte der B-Zellen am Leben, während dieser Prozentsatz in Milz und PBL deutlich niedriger lag. Die Wirkung von chBAFF auf Lymphozyten aus Caecaltonsillen trat erst nach 48 Stunden deutlich zutage (44% vs. 22%), war aber mit einer annähernd 3-fachen Erhöhung des B-Zellanteils (29% vs. 11%) nach 72 Stunden, der Wirkung auf B-Zellen aus der Milz vergleichbar.

Auf die im Blut zirkulierenden B-Zellen war, wenn überhaupt, nur ein äußerst schwacher Einfluss von chBAFF erkennbar. Lediglich nach 48 Stunden konnte in dieser rasch sterbenden B-Zellpopulation eine geringe Steigerung der B-Zellzahl (8% vs. 4%) gefunden werden.



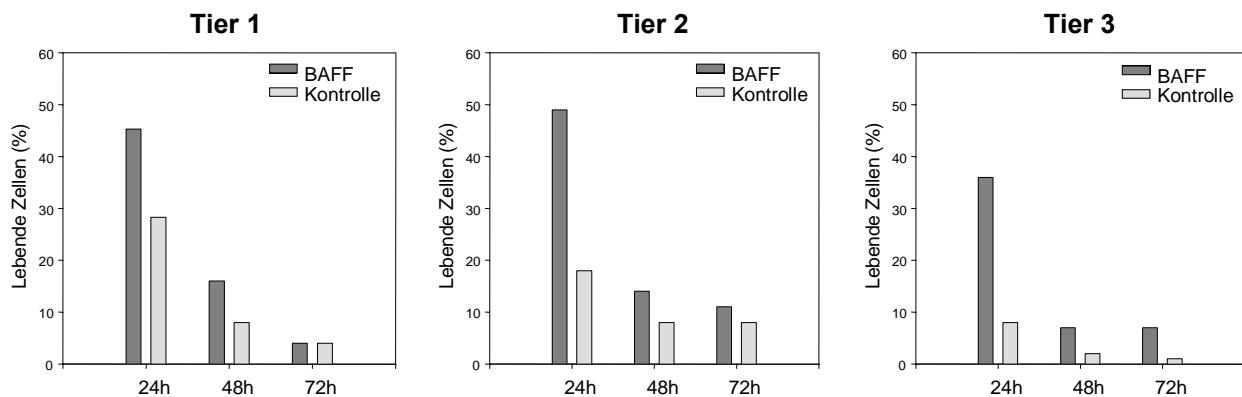
**Abb. 5.16 chBAFF-Wirkung auf periphere B-Zellpopulationen**

Aus Milz, Caecaltonsillen und Blut wurden Lymphozyten isoliert und mit 5% Flag-chBAFF bzw. Kontrollüberstand für die angegebene Zeitdauer kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde dann mittels Trypanblau-Färbung die Gesamtzahl lebender Zellen ermittelt, die Frequenz lebender B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und aus den beiden Werten die absolute Zahl lebender B-Zellen berechnet. Um die verschiedenen Organe miteinander vergleichen zu können, wurde diese Gesamtzahl mit dem vor Kultivierung der Zellen bestimmten Ausgangswert verglichen, sodass in den Abbildungen für die einzelnen Organe der relative Anteil (%) der lebenden B-Zellen am Ausgangswert dargestellt ist.

### 5.8.3 Wirkung von chBAFF auf Bursalymphozyten

Das durch BAFF vermittelte Überleben von Apoptosesignalen konnte beim Säuger erst für B-Zellen in späteren Differenzierungsstadien gezeigt werden. Da neben den peripheren B-Zellen beim Huhn aber auch die Lymphozyten der Bursa Rezeptoren für chBAFF exprimieren, stellte sich die Frage nach dem Effekt des Zytokins auf die Zellen dieses zentralen lymphatischen Organs. Um dies *in vitro* zu untersuchen, wurden von mehreren Tieren Bursalymphozyten isoliert und mit chBAFF oder Kontrollüberstand kultiviert. Bei der Ermittlung des Anteils lebender Zellen in den Kulturen war festzustellen, dass dieser durch Zugabe von chBAFF nach 24 Stunden bei allen Tieren eine deutliche Steigerung erfuhr. Hierbei variierte die Aus-

prägung des Effektes zwischen einer Erhöhung um das 1,5-fache (Tier 1) bis zu einer Steigerung um das 4-fache (Tier 3). Auch nach 48 und 72 Stunden waren in den meisten BAFF enthaltenden Kulturen noch mehr lebende Zellen zu finden als in den Kontrollansätzen, der, auch aus der Literatur bekannte, rasche Tod von Bursalymphozyten in Kultur, konnte jedoch auch durch Zugabe von chBAFF nicht verhindert werden (Abb. 5.17).



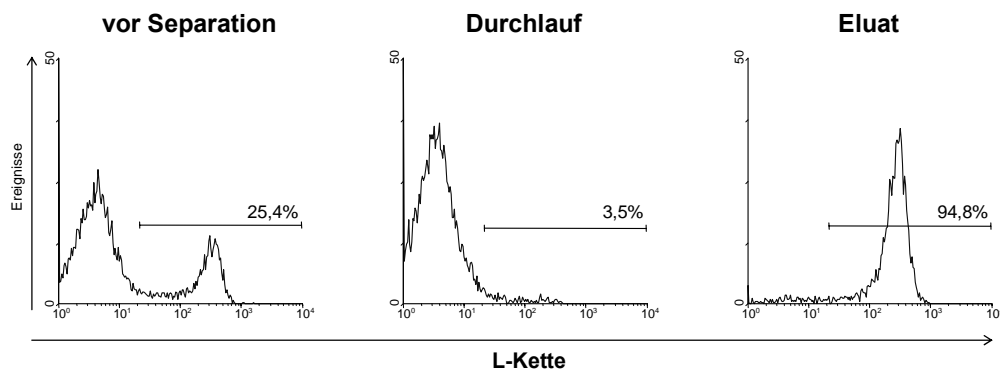
**Abb. 5.17 Wirkung von chBAFF auf Lymphozyten der Bursa**

Von 3 verschiedenen Tieren wurden aus der Bursa isolierte Lymphozyten in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml mit 5% Flag-chBAFF haltigem Zellkulturüberstand oder Kontrollüberstand kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch eine Trypanblau-Färbung die Frequenz lebender Zellen in den Proben bestimmt.

#### 5.8.4 Wirkung von chBAFF auf reine B-Zellpräparationen

Die bisherigen Versuche hatten zwar klar gezeigt, dass durch chBAFF die Zahl lebender B-Zellen in Kulturen gesteigert werden konnte, da es sich dabei jedoch immer um gemischte Lymphozytenpräparationen gehandelt hatte, war nicht mit Sicherheit zu sagen, ob dieser Effekt durch eine direkte Wirkung auf B-Zellen oder über die Stimulation einer weiteren Zellpopulation vermittelt wird. Um ausschließen zu können, dass die Versuchsergebnisse von solchen Sekundäreffekten beeinflusst werden, wurden B-Zellen aus Milzlymphozyten bis zu einer Reinheit von 95% angereichert.

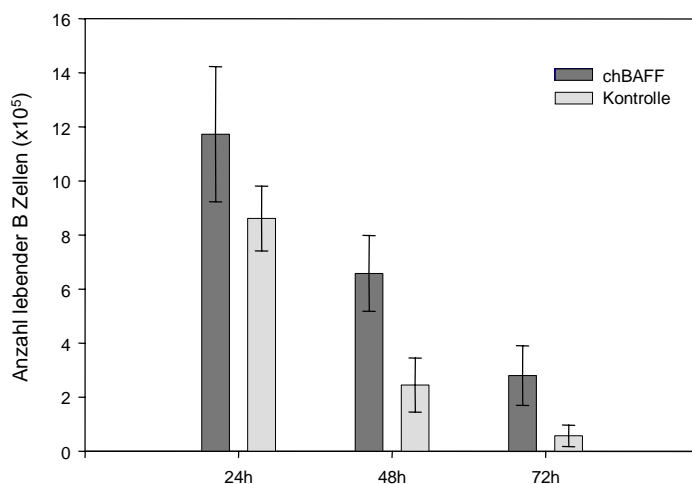
Dazu wurden die B-Zellen mittels MACS (Magnetic Cell Sorting) nach dem in 4.17 beschriebenen Protokoll mit einem Antikörper gegen die leichte Kette und paramagnetischen Partikeln markiert und mit Hilfe eines Magneten aus der gemischten Zellsuspension separiert. Die Frequenz der B-Zellen vor der Reinigung, wurde ebenso wie die Reinheit von Positivfraktion (Eluat) und Negativfraktion (Durchlauf) im Durchflusszytometer getestet. Ein Beispiel hierfür zeigt Abb. 5.18. Während die Lymphozytenpräparation vor der Aufreinigung nur 25,4% B-Zellen enthielt, konnten diese im Eluat auf beinahe 95% angereichert werden. Die 3,5% B-Zellen im Durchlauf zeigen, dass auch der Verlust von B-Zellen während der Waschschriffe relativ gering gehalten werden konnte.



**Abb. 5.18 Durchflusszytometrische Überprüfung einer MACS-Präparation**

Milzlymphozyten wurden, wie in 4.17 beschrieben, mit einem anti-L-Ketten Antikörper gefärbt und MACS gesortet. Die B-Zellfrequenz der Ausgangsprobe und die Sauberkeit der Aufreinigung konnten anschließend ohne weitere Färbeschritte im Durchflusszytometer überprüft werden.

Diese reinen B-Zellpräparationen wurden nun wieder mit Flag-chBAFF haltigem Zellkulturüberstand kultiviert und die Frequenz lebender B-Zellen in den Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hierbei zeigte sich derselbe Effekt, wie in Ansätzen mit gemischten Lymphozytenpopulationen. Obwohl die Zellen in allen Kulturen sehr schnell starben, war bereits nach 24 Stunden eine geringgradig höhere Zahl ( $11,7 \times 10^5$  vs.  $8,6 \times 10^5$ ) lebender B-Zellen in den chBAFF haltigen Kulturen zu finden, als in Kontrollen, die mit dem Überstand von mit leerem Plasmid transfizierten Zellen versetzt wurden. Nach 48 Stunden war die Wirkung von chBAFF mit einer 2- bis 3-fachen Erhöhung der Zahl lebender B-Zellen von durchschnittlich  $6,6 \times 10^5$  gegenüber  $2,5 \times 10^5$  Zellen bereits deutlich erkennbar und erreichte mit einem 4- bis 5-fach höheren Wert ( $2,8 \times 10^5$  vs.  $0,6 \times 10^5$  Zellen) ihre stärkste Ausprägung nach 72 Stunden (s. Abb. 5.19). Die Wirkung von chBAFF bedingt folglich keine Vermittlung über andere Zellpopulationen, sondern resultiert aus einer direkten Interaktion des Zytokins mit den B-Zellen.



**Abb. 5.19 Kinetik der Wirkung von chBAFF auf positiv sortierte B-Zellen**

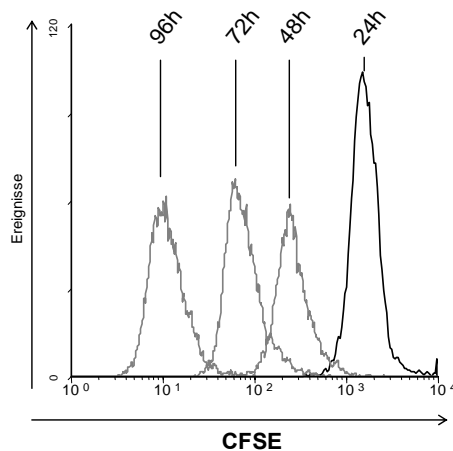
Gereinigte B-Zell-Präparationen aus der Milz ( $5 \times 10^6$  Zellen, Reinheit  $\geq 93\%$ ) wurden mit 5% Flag-chBAFF haltigem Medium oder Kontrollüberstand kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zahl lebender B-Zellen durch eine Kombination aus Trypanblau-Färbung und durchflusszytometrischer Bestimmung der Frequenz lebender B-Zellen ( $L\text{-Ketten}^+ / PI^-$ ) bestimmt. Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten.



### 5.8.5 ChBAFF induziert keine B-Zellproliferation

Die relative Vergrößerung einer Zellpopulation *in vitro* kann zum einen dadurch bedingt sein, dass diese Zellen in Kultur länger überleben oder dadurch, dass ein Teil der Zellen begonnen hat zu proliferieren. Da unter dem Einfluss von chBAFF die Zahl lebender B-Zellen erhöht ist, stellte sich auch hier die Frage, ob das Zytokin das Überleben der B-Zellen verlängert oder die Proliferation einiger weniger B-Zellen induziert. Um dies beantworten zu können, wurde eine Technik gewählt, bei der die Lymphozyten vor der Kultur mit chBAFF mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester, kurz CFSE, markiert werden. CFSE wird innerhalb von 24 Stunden in das Zytoskelett der Zelle eingebaut und bei einer Teilung der Zelle zur Hälfte an die Tochterzelle abgegeben. Die Halbierung der Fluoreszenz pro erfolgter Zellteilung kann dann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Da diese Technik beim Huhn bislang noch nicht etabliert war, wurden erste Vorversuche mit der Hühner-B-Zelllinie 2D8 durchgeführt. Wie Abb. 5.20 zeigt, konnte die Zelllinie, wie in 4.19 beschrieben, mit CFSE angefärbt werden, wobei sich die Fluoreszenz der Zellen alle 24 Stunden halbierte. Diese Abnahme der Fluoreszenz der Gesamtpopulation ist auf eine Teilung aller Zellen dieser schnell wachsenden Zelllinie zurückzuführen.

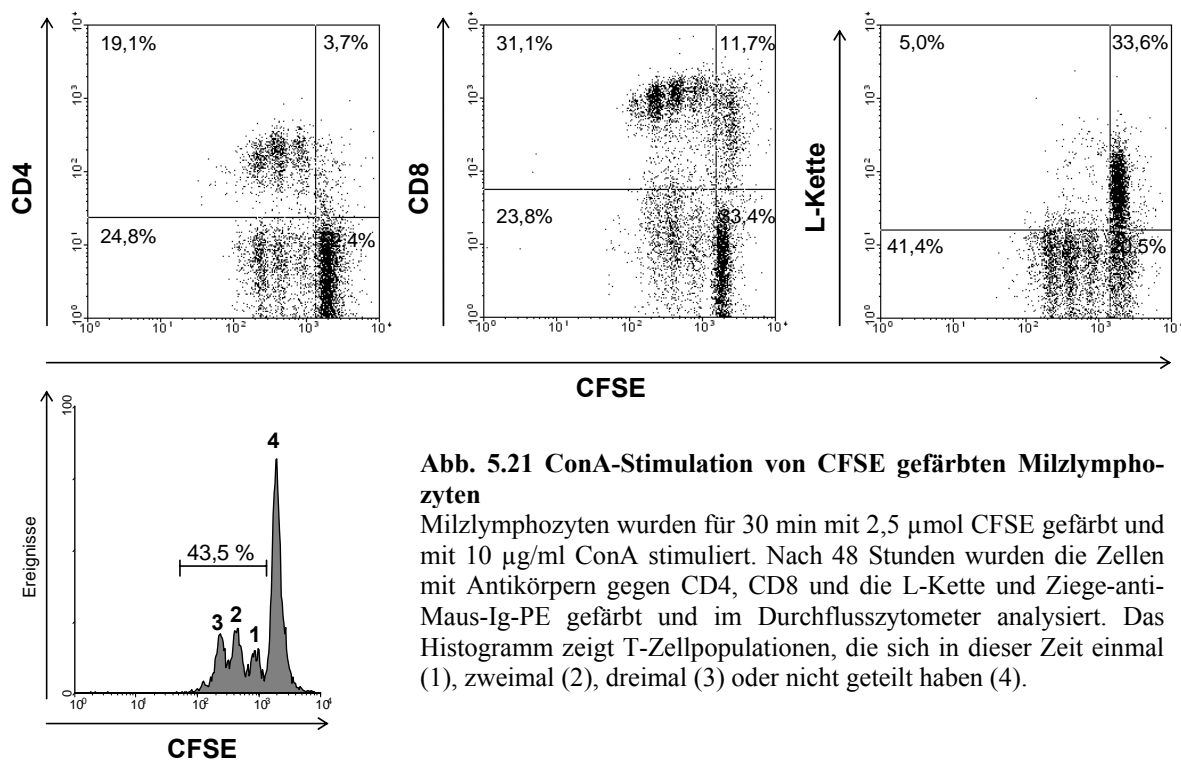


**Abb. 5.20 CFSE-Färbung von 2D8-Zellen**

2D8-Zellen wurden für 15 min bei 37°C mit 10 µM CFSE gefärbt und anschließend weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durchflusszytometrisch die verbliebene Fluoreszenz der Zellen bestimmt.

Zur Übertragung der Technik auf primäre Hühnerzellen wurden als nächstes Milzlymphozyten nach den Angaben in 4.19 mit CFSE gefärbt und kultiviert. Zur Induktion der Zellproliferation wurden die Kulturen mit Concanavalin A versetzt (s. 4.3.6) und nach 48 Stunden im Durchflusszytometer analysiert. Der große Vorteil der CFSE-Färbung gegenüber anderen Proliferations-Assays besteht darin, dass sich in einer gemischten Zellpopulation nicht nur über die CFSE-Fluoreszenz die Frequenz proliferierender Zellen bestimmen lässt, sondern über die Färbung mit spezifischen Antikörpern in einer zweiten Fluoreszenz auch, um welche Zellen es sich dabei handelt. So wurden die ConA stimulierten Zellen zusätzlich noch mit

Antikörpern gegen CD4, CD8 und die L-Kette gefärbt. Das Histogramm in Abb. 5.21 zeigt, dass sich in 48 Stunden 43,5% der Zellen in Kultur geteilt hatten, wobei sich neben der Population ungeteilter Zellen (4) drei Populationen mit ein (1) bis drei (3) erfolgten Zellteilungen unterscheiden lassen. Aus den Punktverteilungs-Diagrammen ist ersichtlich, dass es sich bei den auf ConA-Stimulation proliferierenden Zellen sowohl um CD4<sup>+</sup> als auch um CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelt, während die B-Zellen (L-Ketten<sup>+</sup>) noch keine Abnahme der CFSE-Fluoreszenz zeigten, sich also nicht geteilt haben.

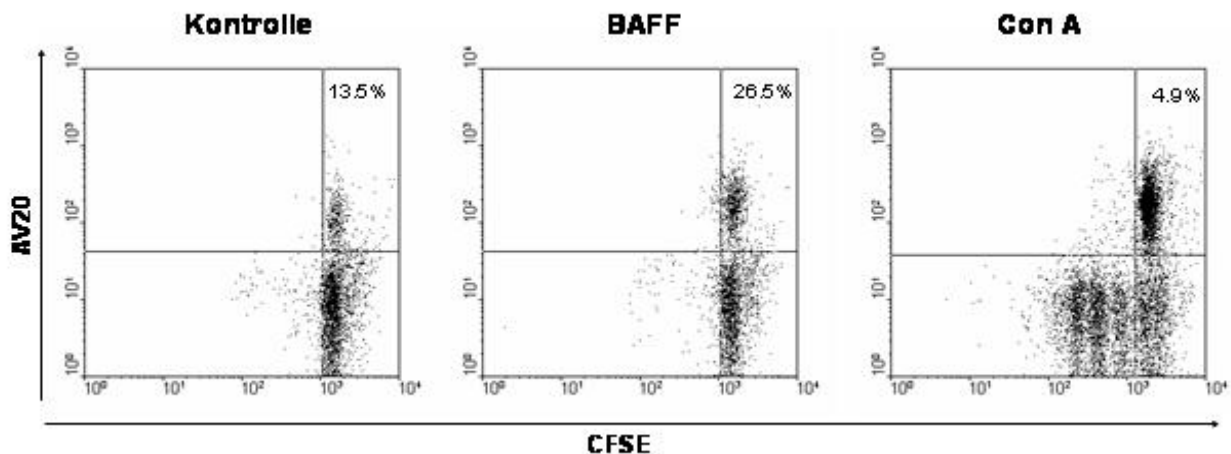


**Abb. 5.21 ConA-Stimulation von CFSE gefärbten Milzlymphozyten**

Milzlymphozyten wurden für 30 min mit 2,5 µmol CFSE gefärbt und mit 10 µg/ml ConA stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und die L-Kette und Ziege-anti-Maus-Ig-PE gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm zeigt T-Zellpopulationen, die sich in dieser Zeit einmal (1), zweimal (2), dreimal (3) oder nicht geteilt haben (4).

Nach Etablierung des CFSE-Markierungsverfahrens für Hühnerlymphozyten, konnte nun überprüft werden, ob CFSE markierte B-Zellen aus der Milz unter Zusatz von chBAFF proliferieren. Dazu wurden Milzlymphozyten mit CFSE gefärbt und mit 5% Flag-chBAFF haltigem Medium oder Kontrollüberstand für 48 Stunden kultiviert. Als Proliferationskontrolle wurde ein Ansatz mit ConA stimuliert. Daraufhin wurden die B-Zellen aus den Kulturen mit AV20 und Ziege-anti-Maus-PE angefärbt und die Proben im FACS analysiert. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde zusätzlich 7-AAD verwendet (Abb. 5.22). Während in den ConA stimulierten Proben AV20-negativen Zellen zu sehen waren, die sich in dieser Zeit bereits zwei bis dreimal geteilt haben, waren weder in der Kultur mit chBAFF noch in der Kontrolle Anzeichen für Zellproliferation der B-Zellen (AV20<sup>+</sup>) oder „Nicht-B-Zellen“ (AV20<sup>-</sup>) zu finden, obwohl die Frequenz lebender B-Zellen (AV20<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) durch chBAFF erhöht wurde. Dass diese Erhöhung mit 26,5% gegenüber 13,5% in der

Kontrolle nur 2-fach war und der Effekt von chBAFF damit vergleichsweise gering ausfiel, könnte damit zusammenhängen, dass gerade die sehr empfindlichen B-Zellen durch die Färbung mit CFSE geschädigt werden. Die im Vergleich zur Kontrolle erniedrigte B-Zellfrequenz in der ConA stimulierten Kultur (4,9% vs. 13,5%), kann durch die Proliferation der T-Zellen erklärt werden. Somit zeigt dieser Versuch deutlich, dass chBAFF keine Proliferation der B-Zellen induziert, sondern vielmehr deren Überleben in Kultur verlängert.



**Abb. 5.22 Wirkung von chBAFF auf CFSE gefärbte Milzlymphozyten**

CFSE gefärbte Milzlymphozyten wurden, wie in 4.18 beschrieben, mit und ohne chBAFF, bzw. als Positivkontrolle mit 10 µg/ml ConA kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die B-Zellen mit AV20 und Ziege-anti-Maus-PE angefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Diskriminierung der toten Zellen mit 7-AAD, sodass die folgende FACS-Analyse nur die lebenden Zellen (7-AAD<sup>-</sup>) erfasste.

## 5.9 Biologische Wirkung von chBAFF: *in vivo* Studien

Wirklich gültige Aussagen über die biologische Funktion eines Zytokins lassen sich eigentlich nur durch *in vivo* Versuche treffen, da nur in diesen die Wirkung auf den Gesamtorganismus überprüft werden kann. Als Methode stehen hierfür beim Huhn zum einen die Supplementierung des Zytokins und zum anderen seine Neutralisation zur Verfügung.

### 5.9.1 Erhöhung der B-Zellzahl in chBAFF behandelten Hühnern

Zur Bestimmung des Effekts einer Supplementierung von chBAFF wurde 3 Tage alten Küken für 7 Tage zweimal täglich i.p. 2 mg/kg Körpergewicht His-chBAFF oder die gleiche Menge an Kontrollprotein (His-MxA) injiziert. Diese Dosierung entspricht der bei der Maus als wirksam bekannten Menge [173]. Pro Gruppe wurden sieben Tiere behandelt, die Herstellung und Aufreinigung des Proteins erfolgte, wie in 4.9 beschrieben. Am achten Tag nach Beginn der Behandlung wurden die Tiere getötet und Milz und Caecaltonsillen entnommen. Wie in Tab. 5.1 dargestellt, war das durchschnittliche Milzgewicht der chBAFF behandelten Tiere mit

76,8 mg höher, als das der mit MxA behandelten Kontrollgruppe (55,3 mg). Da beim durchschnittlichen Körpergewicht beider Gruppen kein Unterschied festzustellen war, ist davon auszugehen, dass die Verabreichung von chBAFF keinen Einfluss auf das Wachstum der Tiere hatte. Um die Unterschiede im Milzgewicht unabhängig vom Körpergewicht beurteilen zu können, wurde aus Körpergewicht (KG) und Milzgewicht der Tiere der Milz/KG-Index (mg/g) berechnet. Dieser war mit 1,2 in der chBAFF behandelten Gruppe gegenüber 0,8 in der Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $P < 0,05$  im Student's T-Test), woraus auf eine Erhöhung der Gesamtlymphozytenzahl in der Milz geschlossen werden kann.

	Milzgewicht (mg)	Körpergewicht (g)	Milz/Körpergewichts-Index (mg/g) <sup>1)</sup>
<b>chBAFF</b>	76,8 ± 24,0	64,2 ± 2,1	1,2 ± 0,3
<b>Kontrolle</b>	55,3 ± 22,8	66,5 ± 11,9	0,8 ± 0,2

**Tab. 5.1 chBAFF abhängige Erhöhung des Milzgewichts**

Sieben Tiere pro Gruppe wurden für sieben Tage entweder mit chBAFF oder Kontrollprotein (2mg/kg, 2x täglich) behandelt. Milz und Körpergewicht wurden bestimmt und der Milz/KG-Index berechnet. Für jede Gruppe sind Mittelwerte ± SD angegeben.

\* diese Werte weisen einen signifikanten Unterschied auf ( $P < 0,05$ , T-Test)

Frequenz positiver Zellen (%)								
	L Kette	Bu1b	IgM	CD3	CD4	CD8	TCRγδ	TCRα/Vβ1
<b>Milz</b>								
<b>chBAFF</b>	42,0 ± 7,5**	41,5 ± 5,0**	43,0 ± 6,6**	51,9 ± 6,5*	29,0 ± 2,3	22,8 ± 5,2	12,1 ± 11,8	33,9 ± 3,4*
<b>Kontrolle</b>	20,8 ± 7,0	22,6 ± 6,0	21,4 ± 6,6	64,9 ± 6,0	32,1 ± 1,8	30,6 ± 5,7	12,3 ± 3,3	41,6 ± 4,8
<b>Caecaltonsillen<sup>#</sup></b>								
<b>chBAFF</b>	37,9	38,5	37,2	54,9	34,8	26,2	6,0	35,7
<b>Kontrolle</b>	14,0	23,5	22,6	67,7	45,9	24,1	7,3	48,9

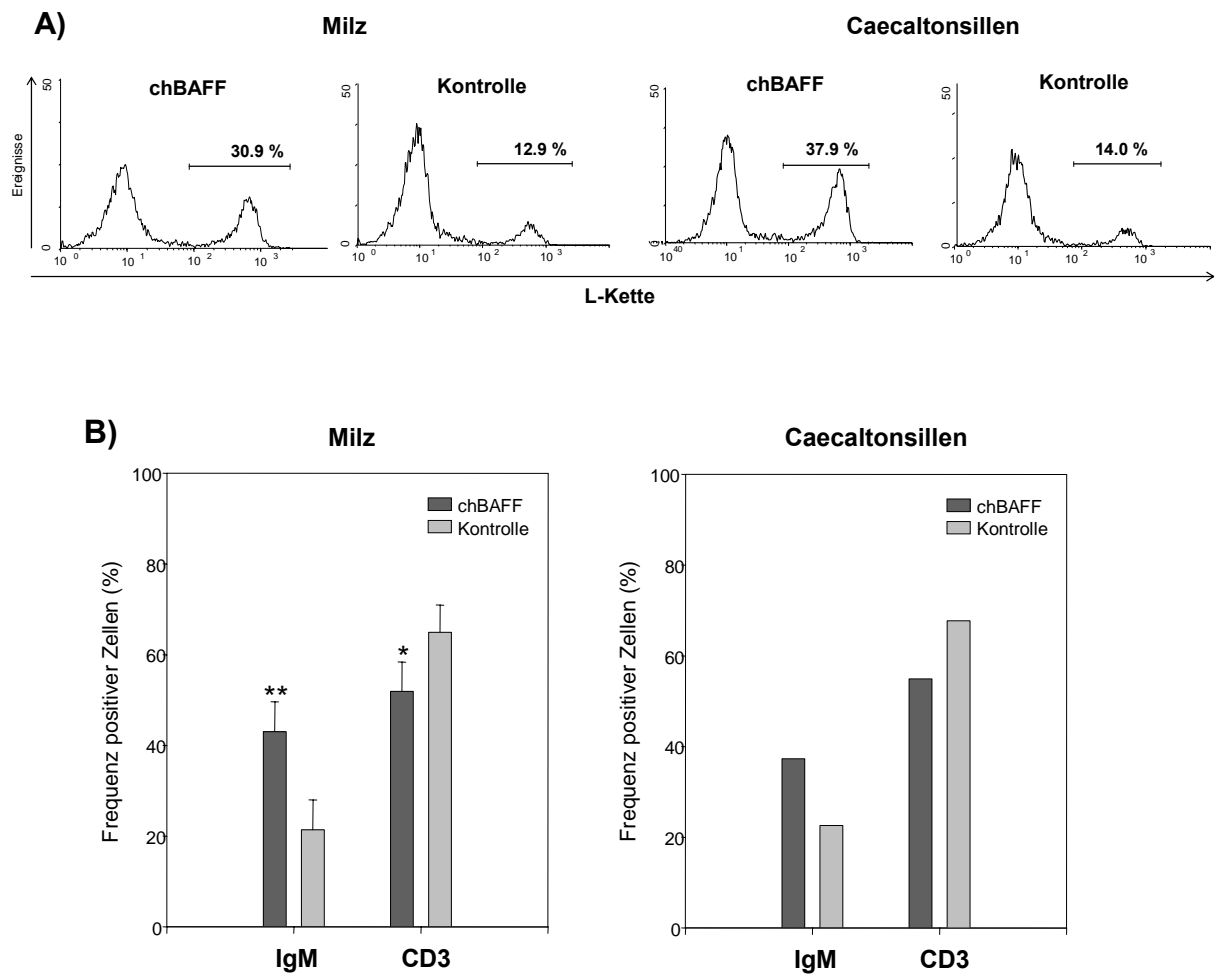
**Tab. 5.2 Selektive Expansion der B-Zellpopulation von chBAFF behandelten Tieren.**

Fünf Tiere pro Gruppe wurden für sieben Tage entweder mit chBAFF oder Kontrollprotein (2 mg/kg, 2x täglich) behandelt. Gezeigt sind die durchschnittlichen Prozentsätze ± SD der Zellen, die die angegebenen Oberflächenmarker exprimieren. Die Caecaltonsillen jeder Gruppe wurden zur Isolation der Lymphozyten vereinigt.

\*/\*\* diese Werte weisen einen signifikanten Unterschied auf (\* $P < 0,05$ ; T-Test / \*\*  $P < 0,01$ ; T-Test)

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden aus Milz und Caecaltonsillen die Lymphozyten isoliert, wobei die Caecaltonsillen jeder Gruppe zur Erlangung einer ausreichenden Zellzahl vereinigt wurden. Die Färbungen ergaben dabei für die verschiedenen Antikörper die in Tab. 5.1 aufgeführten Frequenzen. In der Milz waren die Frequenzen aller B-Zell spezifischen

Oberflächenmarker (L-Kette, Bu1b und IgM) signifikant erhöht und zeigten eine zweifache Zunahme der B-Zellen bei den chBAFF behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe an, während die Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in dieser Gruppe signifikant niedriger war. Auch in den Caecaltonsillen führte die Verabreichung von chBAFF je nach verwendetem Antikörper zu einer 1,5 bis 2,7fachen Erhöhung der B-Zellfrequenz.



#### Abb. 5.23 Erhöhung der B-Zellfrequenz in chBAFF behandelten Tieren

Effekt der i.p. Verabreichung von chBAFF oder Kontrollprotein auf die Frequenz der B-Zellen in Milz und Caecaltonsillen von 10 Tage alten Tieren nach 7-tägiger Behandlung (2mg/kg, 2x täglich). A) Gezeigt ist das durchflusszytometrische Färbemuster für die L-Kette eines repräsentativen Datenpaares für die Milz und die vereinigten Caecaltonsillen. B) Mittelwert  $\pm$  SD der durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen der B-Zellen (IgM<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) in den Milzen und die Werte für die vereinigten Caecaltonsillen der mit chBAFF oder Kontrollprotein behandelten Tiere.

\*/\*\* diese Werte sind signifikant unterschiedlich (\*P < 0,05; T-Test / \*\* P < 0,01; T-Test)

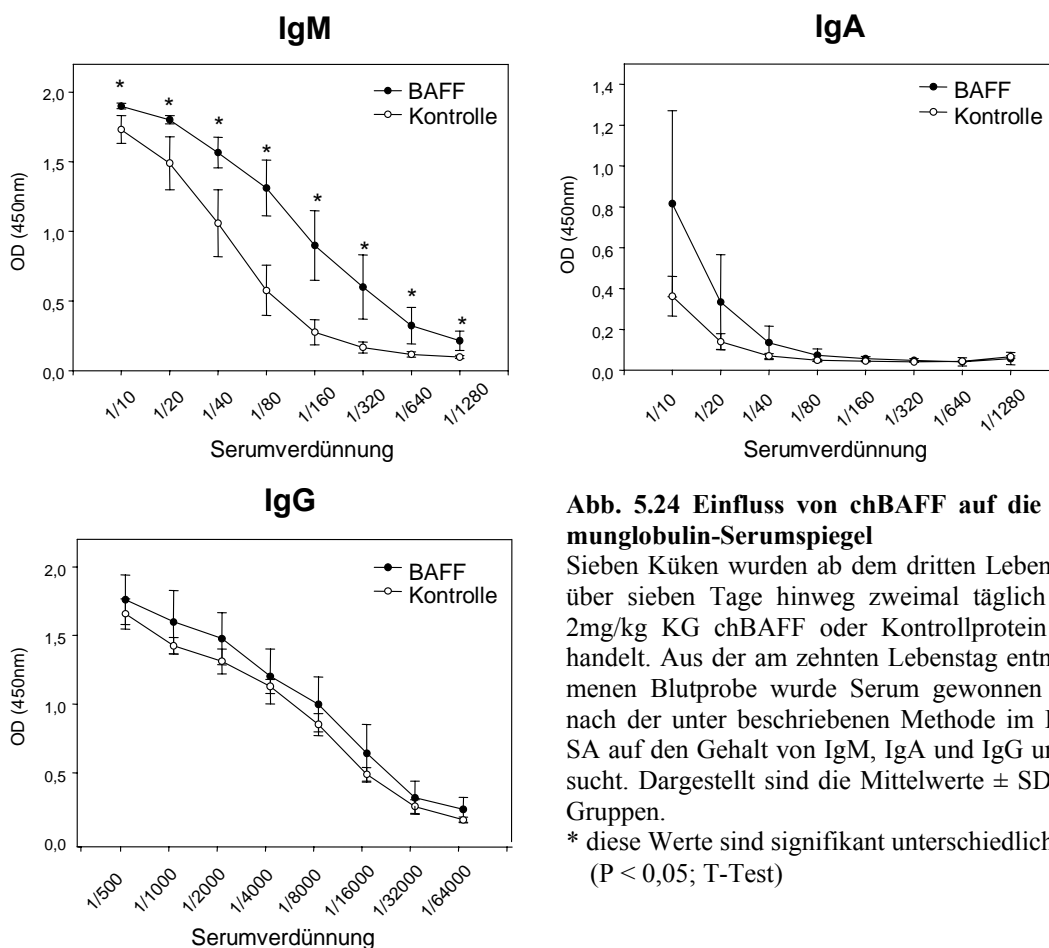
Abb. 5.23 (A) zeigt das durchflusszytometrische Färbemuster für einen Antikörper gegen die L-Kette in Milz und Caecaltonsillen eines repräsentativen Tierpaares (Milz) bzw. der vereinigten Organe beider Gruppen (Caecaltonsillen). Hierbei wird ersichtlich, dass sich die durch

die BAFF-Supplementierung hervorgerufenen Änderungen nur auf die B-Zellfrequenz bezogen, die Färbeintensität zwischen beiden Gruppen aber keine Unterschiede aufwies. Die durchschnittlichen Frequenzen von T-Zellen und B-Zellen in Milzen und Caecaltonsillen der mit chBAFF oder Kontrollprotein behandelten Gruppen sind Abb. 5.23 (B) vergleichend dargestellt.

Da in den Milzen der chBAFF behandelten Tiere sowohl die Lymphozytenzahl, als auch die Frequenz der B-Zellen erhöht war, kann daraus geschlossen werden, dass chBAFF entweder das Überleben der B-Zellen in Milz und Caecaltonsillen der mit dem Zytokin behandelten Tiere verlängert oder eine selektive Proliferation von B-Zellen in diesen Organen induziert.

### 5.9.2 Erhöhung der IgM-Serumspiegel durch chBAFF

Die Hauptfunktion der B-Zellen ist die Produktion von Immunglobulinen. Da die Behandlung von Hühnern mit chBAFF einen deutlichen Effekt auf die Zahl der B-Zellen in den Tieren zeigte, wurde zusätzlich der Einfluss des Zytokins auf die Serumspiegel der 3 Immunglobulin-Klassen IgG, IgM und IgA untersucht. Hierzu wurde den 10 Tage alten Tieren im unter 5.9.1 beschriebenen *in vivo* Experiment nach siebentägiger Behandlung mit chBAFF oder Kontrollprotein (2 mg/kg; 2 x täglich; i.p) Blut entnommen und aus diesem Serum gewonnen.



**Abb. 5.24 Einfluss von chBAFF auf die Immunglobulin-Serumspiegel**

Sieben Küken wurden ab dem dritten Lebenstag über sieben Tage hinweg zweimal täglich mit 2mg/kg KG chBAFF oder Kontrollprotein behandelt. Aus der am zehnten Lebenstag entnommenen Blutprobe wurde Serum gewonnen und nach der unter beschriebenen Methode im ELISA auf den Gehalt von IgM, IgA und IgG untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der Gruppen.

\* diese Werte sind signifikant unterschiedlich ( $P < 0,05$ ; T-Test)

Die Analyse der Seren (siehe Abb. 5.24) im ELISA auf ihren Gehalt an IgM, IgA und IgG (zur Durchführung s. 4.15.3) ergab eine signifikante Erhöhung des IgM-Serumspiegels der chBAFF behandelten Tiere um zwei Titerstufen. IgA ist im Serum dieser jungen Tiere nur in sehr geringen Mengen vorhanden, aber auch hier konnte eine leichte Erhöhung des Serumspiegels gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden, die Werte der mit chBAFF behandelten Tiere variierten jedoch sehr stark. Beim Gehalt des Serums an IgG waren dagegen so gut wie keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen, nach 10 Lebenstagen handelt es sich jedoch beim weitaus größten Teil des IgG im Serum ohnehin um aus dem Dotter aufgenommenes, maternales und nicht um endogen produziertes IgG.

### 5.10 *in vivo* Neutralisation von chBAFF durch huBCMA-Fc

Die *in vivo* Supplementierung von chBAFF führte zur Erhöhung der B-Zellzahl und des IgM-Serumspiegels der behandelten Tiere. In Zusammenhang damit stellte sich die Frage nach dem Effekt einer Reduktion der endogen vorhandenen BAFF-Menge. Da in den vorausgegangenen *in vitro* Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass humanes BCMA-Fc chBAFF bindet und dosisabhängig in der Lage ist, dessen Interaktion mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche zu verhindern (s. 5.5), wurden Küken mit huBCMA-Fc behandelt und die Auswirkungen dieser BAFF-Neutralisation auf das B-Zellsystem analysiert.

	Körpergewicht (g)	Milzgewicht (mg)	Bursagewicht (mg)	Milz/Körpergewichts-Index (mg/g)	Bursa/Körpergewichts-Index (mg/g)
<b>BCMA</b>	65,6 ± 7,1	66,0 ± 55,7	249,3 ± 138,4	1,8 ± 1,5	6,9 ± 3,9
<b>Kontrolle</b>	70,7 ± 1,9	110,0 ± 87,8	323,0 ± 158,0	3,0 ± 2,5	8,6 ± 4,5

**Tab. 5.3 Einfluss der BCMA-Behandlung auf das Gewicht von Milz und Bursa**

5 Tiere pro Gruppe erhielten am zweiten, fünften und achten Lebenstag 300 µg humanes huBCMA-Fc oder PBS i.p.. Am zehnten Lebenstag wurden Körpergewicht, Milzgewicht und Bursagewicht bestimmt und die Indices für Milz-/Körpergewicht und Bursa-/Körpergewicht berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD.

Weil für das Huhn bislang keine Daten über die Neutralisation von Zytokinen mit löslichen Rezeptoren vorliegen, wurde zunächst ein bei der Maus bewährtes Behandlungsschema gewählt [149]. Diesem entsprechend wurde Eintagsküken entweder 300 µg huBCMA-Fc in 300 µl PBS oder das entsprechende Volumen an PBS i.p. injiziert. Diese Behandlung wurde am fünften und achten Lebenstag wiederholt. Zwei Tage später wurden die Tiere nach Bestimmung des Körpergewichts getötet und Blut, Milz, Bursa und Caecaltonsillen gewonnen.

Tab. 5.3 zeigt, dass die BCMA-Behandlung keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere hatte, wogegen das durchschnittliche Milzgewicht in der BCMA behandelten Gruppe mit 66,0 mg gegenüber 110,0 mg bei den Kontrolltieren deutlich reduziert war. Auch das durchschnittliche Bursagewicht lag mit 249,3 mg unter dem der Kontrollgruppe mit 323,0 mg. Sowohl die Werte für die Milz als auch diejenigen für die Bursa wiesen jedoch sehr starke Schwankungen auf. Die Gewichtsreduktion in Milz und Bursa spiegeln auch die vom Körpergewicht unabhängigen Milz-/Körpergewichts- und Bursa-/Körpergewichts-Indices wieder. Beide variieren sehr stark, fallen aber mit 1,8 vs. 3,0 für die Milz bzw. 6,9 vs. 8,6 für die Bursa bei den BCMA behandelten Tieren niedriger aus, so dass sich auf eine durch die Neutralisation von BAFF bedingte Abnahme der Lymphozytenzahl in Milz und Bursa schließen lässt.

Frequenz positiver Zellen (%)					
	L Kette	Bu1	IgM	CD3	K1
<b>Milz</b>					
<b>BCMA</b>	12,1 ± 7,3*	14,2 ± 8,1*	16,2 ± 5,9*	61,7 ± 7,0*	5,0 ± 3,4
<b>Kontrolle</b>	31,3 ± 6,5	34,7 ± 8,1	32,3 ± 7,7	40,8 ± 10,2	3,3 ± 1,3
<b>Caecaltonsillen</b>					
<b>BCMA</b>	32,5	34,5	31	51,8	1
<b>Kontrolle</b>	45,4	47,1	46,6	42	0,8

**Tab. 5.4 Einfluss der BCMA-Behandlung auf die Frequenz von B- und T-Zellen in Milz und Caecaltonsillen**

Je fünf Tieren pro Gruppe wurden am zweiten, fünften und achten Lebenstag 300µg huBCMA-Fc i.p. oder ein entsprechendes Volumen PBS injiziert. Am zehnten Lebenstag wurden Milz und Caecaltonsillen entnommen, die daraus isolierten Lymphozyten mit Antikörpern gegen die angeführten Oberflächenantigene gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zum Erhalt einer ausreichenden Zellzahl wurden die Caecaltonsillen jeder Gruppe vereinigt. Dargestellt sind die Frequenzen der positiven Zellen, für die Milzen Mittelwerte ± SD.

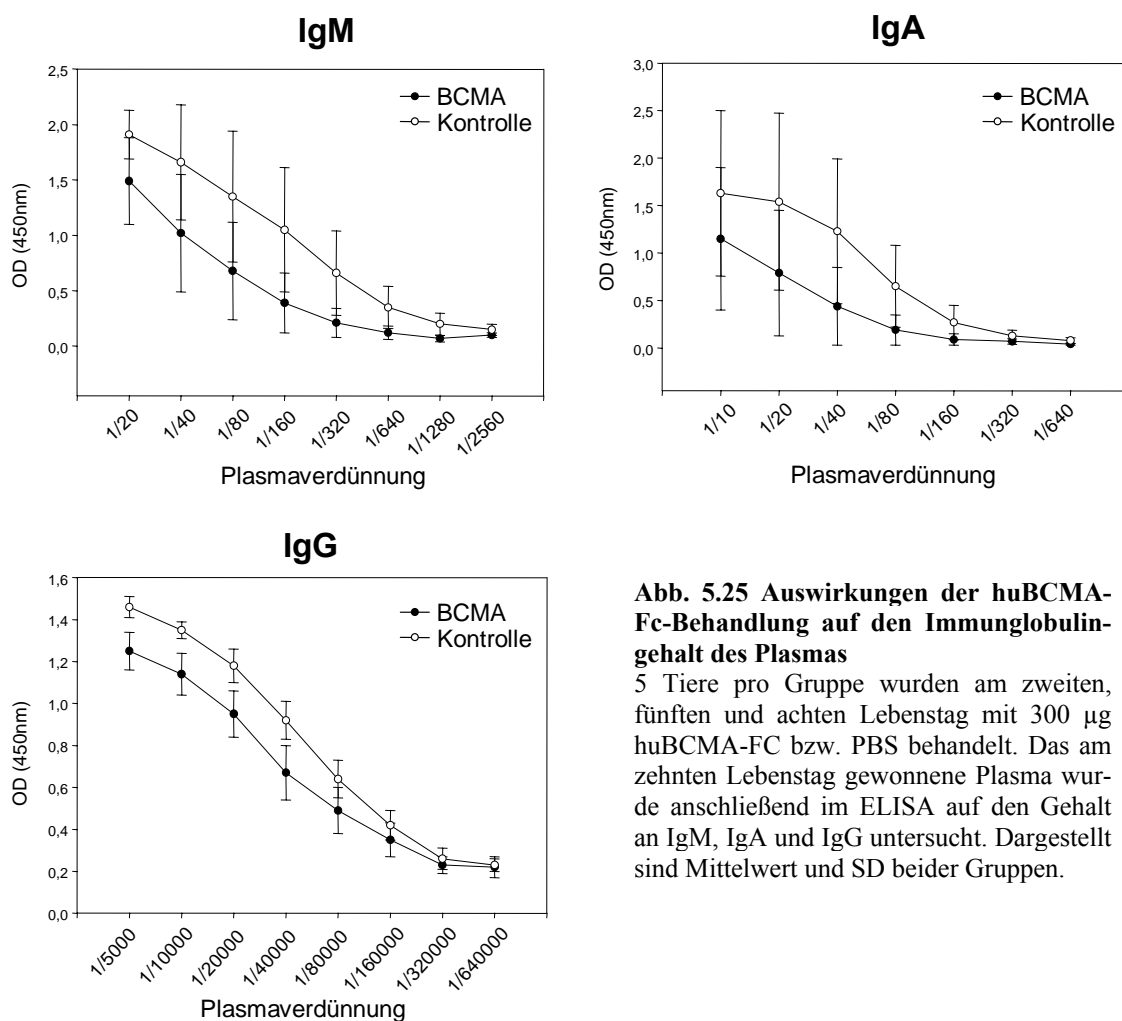
\* diese Werte weisen einen signifikanten Unterschied auf (\*P < 0,05; T-Test)

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus Milz und Caecaltonsillen zeigte für die Milzen der BCMA-Gruppe eine signifikant niedrigere B-Zellfrequenz. So enthielten Milzen dieser Tiere durchschnittlich nur 12,1% L-Ketten<sup>+</sup> Zellen, während in den Organen der Kontrollgruppe durchschnittlich 31,3% B-Zellen enthalten waren. Im Gegenzug war die Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit 61,7% gegenüber 40,8% bei den BCMA behandelten Tieren höher als die der Kontrollen. Die Injektion von huBCMA-Fc führte folglich zu einer Halbierung der B-Zellfrequenz in der Milz (s. Tab. 5.4). Der Effekt in den Caecaltonsillen fiel weniger deutlich aus, aber mit 32,5% gegenüber 45,4 % L-Ketten<sup>+</sup> Zellen war auch hier eine Re-



duktion der B-Zellfrequenz erkennbar. Die Frequenz  $K1^+$  Zellen, einem Marker für Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen des Huhnes, stellte hier ein Maß für den Blutgehalt der Milzen dar, da diese je nach Ausblutungsgrad mehr oder weniger Thrombozyten enthalten. Nachdem die Unterschiede im Thrombozytengehalt zwischen den beiden Gruppen und den einzelnen Tieren jeder Gruppe äußerst gering ausfielen, war beim Vergleich der Organ- gewichte eine Beeinflussung durch den Ausblutungsgrad auszuschließen.

Das direkt vor der Tötung der Tiere entnommene Blut wurde zur Gewinnung von Plasma verwendet. In diesem wurden anschließend mittels ELISA (s. 4.15.3) die Immunglobulin- spiegel bestimmt. Wie Abb. 5.25 zeigt, wies das Plasma der huBCMA-Fc behandelten Tiere geringere Mengen an IgM, IgA und IgG auf, als das der Kontrolltiere. In beiden Gruppen tra- ten bei den einzelnen Tieren jedoch sehr große Unterschiede im Gehalt des Plasmas an IgM und IgA auf. Daher lässt sich anhand dieser Daten noch keine endgültige Aussage zu den Auswirkungen der Neutralisation von endogenem chBAFF mit huBCMA auf die Menge der einzelnen Immunglobuline treffen, tendenziell scheint sie jedoch zu einer Reduktion der Im- munglobulinspiegel zu führen.



**Abb. 5.25 Auswirkungen der huBCMA-Fc-Behandlung auf den Immunglobulin- gehalt des Plasmas**

5 Tiere pro Gruppe wurden am zweiten, fünften und achten Lebenstag mit 300  $\mu$ g huBCMA-FC bzw. PBS behandelt. Das am zehnten Lebenstag gewonnene Plasma wurde anschließend im ELISA auf den Gehalt an IgM, IgA und IgG untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und SD beider Gruppen.

Um zu überprüfen, ob durch Variation des Behandlungsschemas eine noch stärkere Reduktion der B-Zellfrequenz erzielt werden kann, erhielten im folgenden Versuch vier Eintagsküken an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 300 µg huBCMA-Fc in 300 µl PBS i.p.. Als Kontrolle dienten vier Tiere, denen ein entsprechendes Volumen PBS injiziert wurde. Am sechsten Tag erfolgte die Analyse der verschiedenen Parameter.

Auch in diesem Versuch war das Körpergewicht in beiden Gruppen annähernd gleich. Das durchschnittliche Milzgewicht der BCMA-Gruppe war mit 18,8 mg gegenüber 22,0 mg bei den Kontrollen geringfügig niedriger, das Bursagewicht mit 63,4 mg im Vergleich zu 83,4 mg stärker reduziert. Dieses Verhältnis spiegeln auch die Indices für Milz-/Körpergewicht und Bursa-/Körpergewicht wider. Während durch die BCMA-Behandlung bei diesen jungen Tieren der Milz-/Körpergewichts-Index (mg/g) kaum beeinflusst wurde, war der Bursa-/Körpergewichts-Index mit 1,8 gegenüber 2,4 klar erniedrigt (Tab. 5.5). Da die Tiere bei Versuchsende deutlich jünger waren, lagen die Werte insgesamt um ein Vielfaches unter denjenigen des ersten Versuches (vgl. Tab. 5.3).

	Körpergewicht (g)	Milzgewicht (mg)	Bursagewicht (mg)	Milz/Körpergewichts-Index (mg/g)	Bursa/Körpergewichts-Index (mg/g)
<b>huBCMA-Fc</b>	42,9 ± 2,2	18,8 ± 2,1	63,4 ± 9,8	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3
<b>Kontrolle</b>	45,5 ± 4,5	22,0 ± 6,3	83,4 ± 29,9	0,6 ± 0,2	2,4 ± 0,8

**Tab. 5.5 Einfluss der huBCMA-Fc-Behandlung auf das Gewicht von Milz und Bursa**

Vier Tiere pro Gruppe wurden ab dem ersten Lebenstag über fünf Tage 1x täglich i.p. mit 300 µg huBCMA-Fc oder einem entsprechenden Volumen PBS behandelt. Am sechsten Lebenstag wurden Körpergewicht, Milzgewicht und Bursagewicht bestimmt und die Indices für Milz-/Körpergewicht und Bursa-/Körpergewicht berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD.

Die im Durchflusszytometer ermittelten Frequenzen der Lymphozytenpopulationen in den aus Milz und Caecaltonsillen gewonnenen Zellen sind in Tab. 5.6 aufgeführt. Hierbei zeigten in der Milz alle drei Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenmarker - L-Kette, Bu1 und IgM - eine massive Reduktion der B-Zellfrequenzen in der Gruppe der mit BCMA behandelten Tiere auf ein Viertel der Kontrollgruppe. Die Frequenzen der T-Zellmarker CD3 und TCR waren dagegen mit 70,6% bzw. 77,2 % signifikant erhöht. Zur Bestimmung der Frequenz T-Zellrezeptor (TCR) exprimierender Zellen wurde eine Kombination aus Antikörpern gegen TCR-1 (TCR $\gamma\delta$ ), TCR-2 (TCR $\alpha/V\beta$ 1) und TCR-3 (TCR $\alpha/V\beta$ 2) verwendet. In den vereinigten Caecaltonsillen der beiden Gruppen war die B-Zellfrequenz nach der Behandlung mit BCMA um

mehr als die Hälfte reduziert. Die T-Zellfrequenz dieser Gruppe war auch in den Caecaltonsillen deutlich erhöht. Die geringen Unterschiede in der Thrombozytenfrequenz (K1<sup>+</sup>) sprechen erneut für eine homogene Ausblutung und damit für eine gute Vergleichbarkeit der Organgewichte (siehe Tab. 5.5).

Frequenz positiver Zellen (%)						
	L Kette	Bu1	IgM	CD3	TCR	K1
	<b>Milz</b>					
<b>huBCMA-Fc</b>	5,7 ± 1,3 **	5,9 ± 1,4 **	4,5 ± 1,3 **	70,6 ± 6,8 *	77,2 ± 6,7 *	1,7 ± 0,9
<b>Kontrolle</b>	20,3 ± 3,7	26,2 ± 4,4	21,7 ± 3,4	48,6 ± 13,4	59,7 ± 6,9	3,0 ± 1,7
	<b>Caecaltonsillen</b>					
<b>huBCMA-Fc</b>	14,8	17,0	14,9	74,7	69,4	6,2
<b>Kontrolle</b>	34,5	36,4	32,1	56,2	56,7	3,6

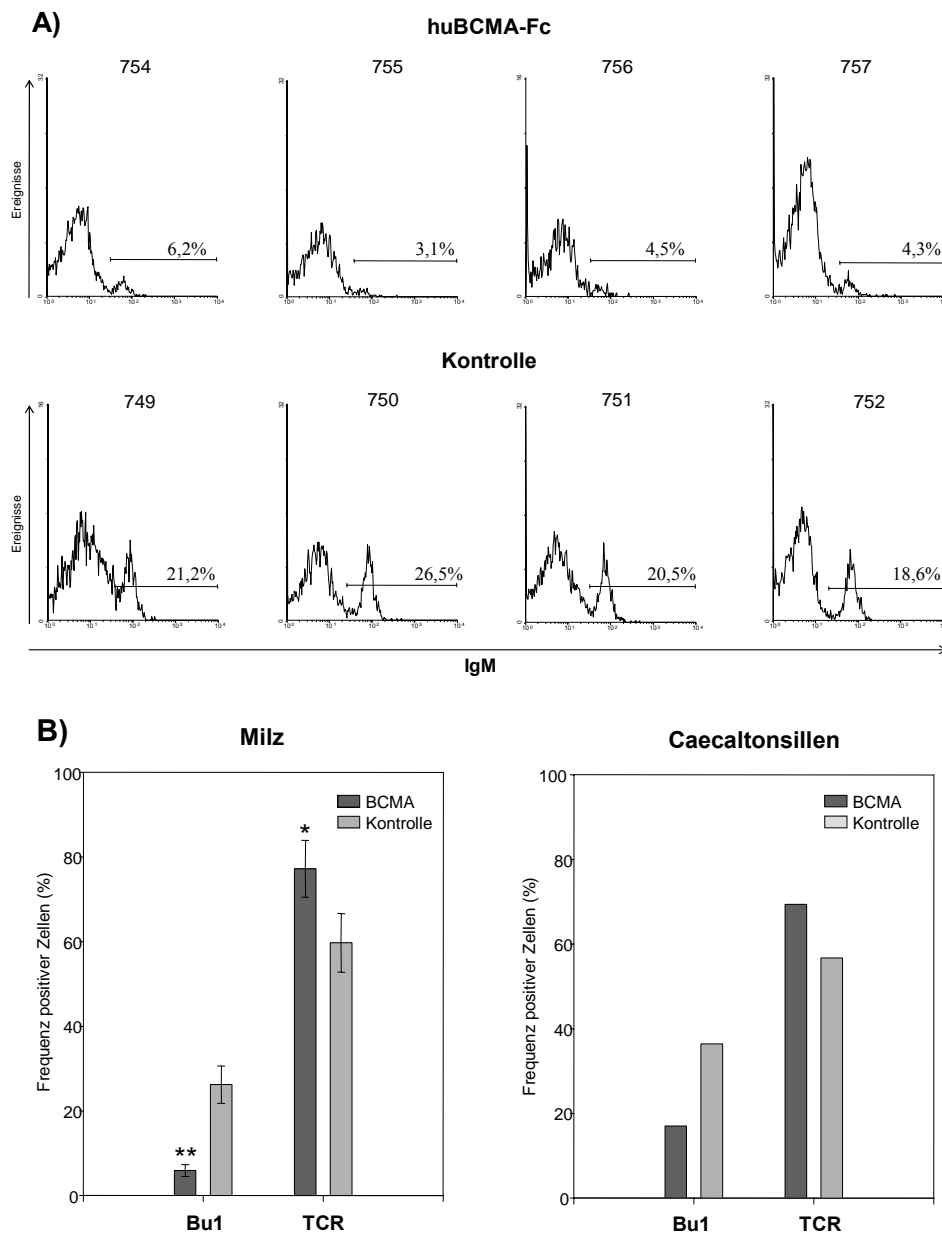
**Tab. 5.6 Einfluss der BCMA-Behandlung auf die Frequenz von B- und T-Zellen in Milz und Caecaltonsillen**

Vier Tiere pro Gruppe wurden ab dem ersten Lebenstag über fünf Tage 1x täglich i.p. mit 300 µg huBCMA-Fc oder einem entsprechenden Volumen PBS behandelt. Am sechsten Lebenstag wurden aus Milz und Caecaltonsillen die Lymphozyten isoliert und im Durchflusszytometer auf die Expression der angegebenen Oberflächenmarker untersucht. Zur Bestimmung der Frequenz TCR<sup>+</sup> Zellen wurde mit einer Kombination aus Antikörpern gegen TCR-1 (TCRγδ), TCR-2 (TCRα/Vβ1) und TCR-3 gearbeitet. Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

\*/\*\* diese Werte sind signifikant unterschiedlich (\*P < 0,05; T-Test / \*\* P < 0,01; T-Test)

Abb. 5.26(A) zeigt die durchflusszytometrischen Färbemuster für die Färbung gegen IgM aller Tiere des Versuches. Wie zu sehen ist, lagen die Frequenzen der IgM<sup>+</sup> B-Zellen bei allen Tieren, die huBCMA-Fc erhielten um ein vielfaches unter denen der Kontrolltiere. Bei Tier 755 konnte sogar eine Abnahme der B-Zellfrequenz auf lediglich 3,1% erzielt werden, während die Werte für die Kontrollen zwischen 18,6% und 26,5% lagen. Die Fluoreszenzintensität und damit die IgM-Oberflächenexpression der einzelnen Zellen blieb jedoch unverändert.

Die in diesem Versuch durch die Injektion von BCMA erzielte vier- bis fünffache Reduktion der B-Zellfrequenz in der Milz bzw. die Halbierung der B-Zellfrequenz in den Caecaltonsillen (Abb. 5.26(B)), weisen zusammen mit den gezeigten Gewichtsveränderungen in der Milz (Tab. 5.3, Tab. 5.5) auf eine Abnahme der peripheren B-Zellzahl als Folge der Neutralisation von endogenem chBAFF hin.

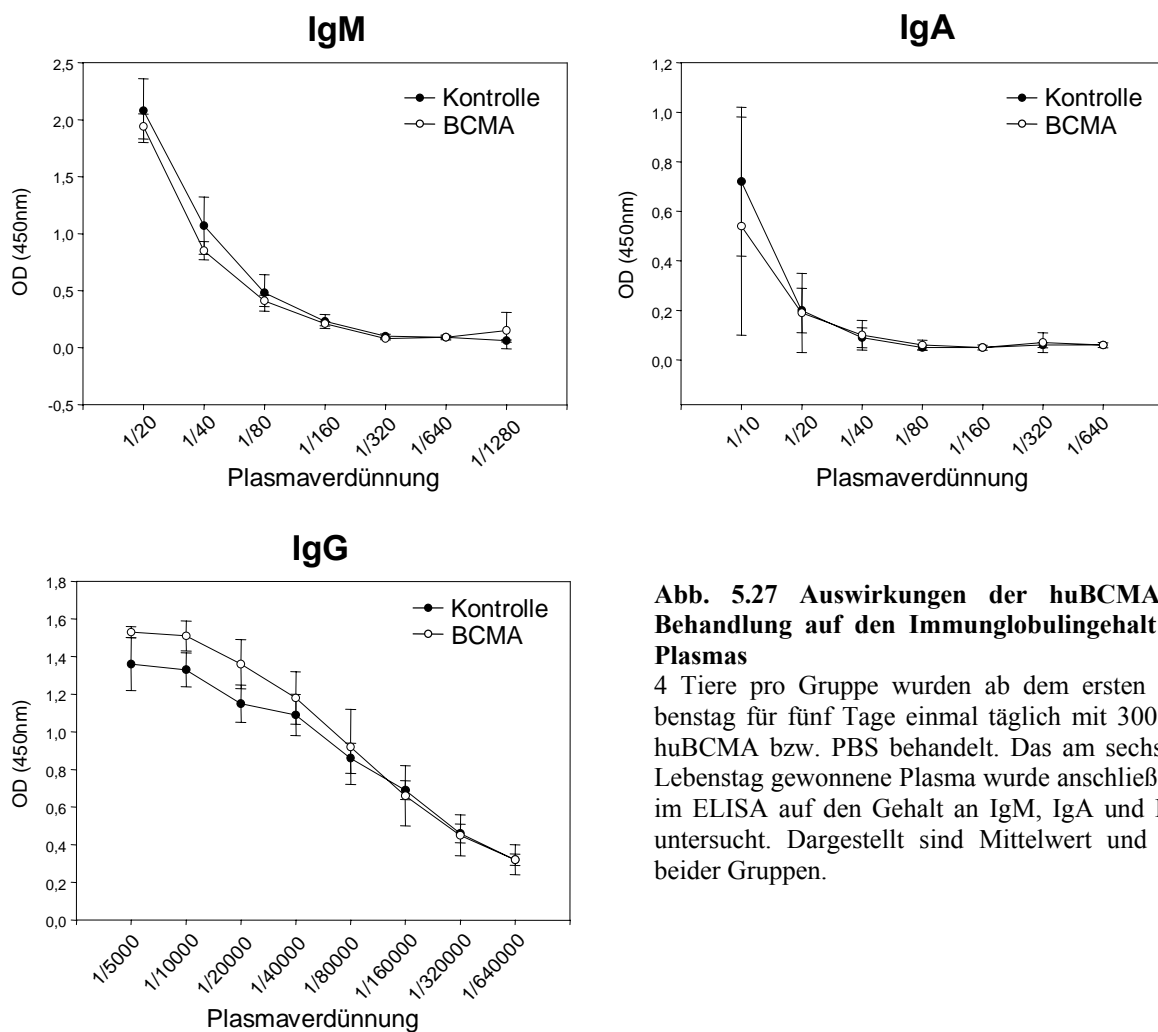


### Abb. 5.26 Reduktion der B-Zellfrequenz durch huBCMA-Fc

Vier Tiere pro Gruppe wurden ab dem ersten Lebenstag über fünf Tage 1x täglich i.p. mit 300 µg huBCMA-Fc in 300 µl PBS oder einem entsprechenden Volumen PBS behandelt. Am sechsten Lebenstag erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der B- und T-Zellfrequenz in Milz und Caecaltonsillen. (A) Vergleich der anti-IgM Färbung aller Tiere. Die Zahlen entsprechen den Tiernummern. (B) Vergleich der mit Antikörpern gegen Bu1 und TCR bestimmten B- und T-Zellfrequenzen in den Milzen und Caecaltonsillen beider Gruppen. Zur Ermittlung der Gesamtzahl TCR<sup>+</sup> Zellen wurde eine Kombination aus den Antikörpern gegen TCR-1 (TCRγδ), TCR-2 (TCRα/Vβ1) und TCR-3 (TCRα/Vβ2) verwendet. Die Caecaltonsillen jeder Gruppe wurden vor Isolation der Lymphozyten vereinigt.

\*/\*\* diese Werte sind signifikant unterschiedlich (\*P < 0,05; T-Test / \*\* P < 0,01; T-Test)

Da auch bei diesem Versuch die Auswirkungen der BCMA-Gabe auf die Antikörper-Produktion der B-Zellen bestimmt werden sollte, wurde den Tieren im Anschluss an die fünftägige BCMA-Behandlung am sechsten Lebenstag Blut zur Plasmagewinnung abgenommen. Im ELISA wurden dann die im Plasma enthaltenen Mengen an IgM, IgA und IgG bestimmt (Abb. 5.27). Im Gegensatz zum vorhergehenden Experiment (siehe Abb. 5.25) konnte bei den in diesem Fall um einiges jüngeren Tieren für keines der Immunglobuline ein deutlicher Unterschied im Plasmaspiegel nachgewiesen werden.



**Abb. 5.27 Auswirkungen der huBCMA-Fc-Behandlung auf den Immunglobulingehalt des Plasmas**

4 Tiere pro Gruppe wurden ab dem ersten Lebenstag für fünf Tage einmal täglich mit 300 µg huBCMA bzw. PBS behandelt. Das am sechsten Lebenstag gewonnene Plasma wurde anschließend im ELISA auf den Gehalt an IgM, IgA und IgG untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und SD beider Gruppen.

## 6 Diskussion

Arbeiten am B-Zellsystem des Huhnes haben zur Entdeckung einiger grundlegender Mechanismen in der Entwicklung und Funktionsweise des Immunsystems geführt. So wurde die Dichotomie des Immunsystems zunächst im Huhn beschrieben [3, 5, 236]. Viele der Untersuchungen wurden durch die Tatsache ermöglicht, dass die Reifung von B- und T-Zellen beim Vogel, im Gegensatz zum Säugetier, in zwei separaten und gut zugänglichen Organen, der Bursa Fabricii und dem Thymus, stattfindet und durch die embryonale Entwicklung im Ei auch die gesamte Ontogenese wesentlich leichter erforscht werden konnte [41, 237]. Später verlagerte sich das Interesse auf die Untersuchungen der molekularen Vorgänge bei der Bildung des Antikörperrepertoires. Dieser als „gene conversion“ bezeichnete Mechanismus wurde zunächst beim Huhn beschrieben und erst viel später bei mehreren Säugerspezies nachgewiesen [43, 238]. Auf der anderen Seite stand von jeher die diagnostisch orientierte Arbeit im Mittelpunkt des Interesses, in welcher beim Huhn wie bei vielen anderen Spezies Antikörperspiegel als Reaktion des Immunsystems auf antigene Stimuli, wie Infektionen oder Impfungen, bestimmt wurden [239, 240].

Zur Differenzierung eines Organs sind zum einen Zell-Zell-Interaktionen über membranständige Rezeptoren und Liganden nötig, andererseits kommt auch löslichen Faktoren wie den Zytokinen eine essentielle Funktion zu. Da die Bursa Fabricii ein nur beim Vogel vorkommendes einzigartiges B-Zellreifungsorgan ist, erhalten neue Erkenntnisse zu ihrer Ontogenese einen besonderen Stellenwert [32, 236]. Bislang war jedoch über beteiligte Zell-Zell-Interaktionen oder Zytokine äußerst wenig bekannt. Mit dem Tripeptid Bursin wurde zwar ein für die Differenzierung der B-Zellen in der Bursa notwendiges Zytokin beschrieben, allerdings fehlen bis heute genauere Analysen zu seiner Funktion [17]. Von den beim Säuger bekannten B-Zell-Zytokinen wurde beim Huhn bisher nur IL-6 kloniert und einige wenige seiner biologischen Aktivitäten charakterisiert [114]. Daten zur Wirkung von IL-6 auf Hühner-B-Zellen liegen dagegen nicht vor. Ein Grund für das geringe Wissen in diesem Bereich ist sicher das Fehlen von „Werkzeugen“, wie sie bei Studien in Mensch und Maus seit langem vorhanden sind. Die Etablierung frei verfügbarer EST-Datenbanken eröffnete jedoch auch im Hühnersystem neue experimentelle Möglichkeiten [241, 242]. Da die Zytokinforschung seit einiger Zeit einen Schwerpunkt dieses Labors bildet [114, 243-245], werden die Datenbanken routinemäßig nach Sequenzen mit Homologie zu Säugerzytokinen durchsucht. Dies geschah auch nachdem mit BAFF ein neues Mitglied der TNF-Familien von Mensch und Maus publiziert wurde [116, 117] und führte zur Identifizierung einer hoch homologen Sequenz beim

Huhn. Hieraus erwuchs die Fragestellung, ob diese Sequenz für ein funktionelles Zytokin kodiert, und wenn ja, welche Rolle ihm beim Huhn zukommt.

## 6.1 Charakterisierung von chBAFF

### 6.1.1 Identifizierung und Analyse der chBAFF-Sequenz

Die Grundlage dieser Arbeit bildete die Identifikation eines Hühnerhomologs zu murinem und humanem BAFF, die durch die Analyse der BLAST-Suchergebnisse von zwei Hühner-EST-Datenbanken erfolgte. Hierbei konnten schließlich zwei überlappende cDNA-Klone gefunden werden, die für den kompletten offenen Leserahmen von chBAFF kodieren. Wie bei seinen Gegenstücken von Mensch und Maus ist die Proteinstruktur von chBAFF als Typ-II-Membranprotein organisiert. Beim Säuger ist bekannt, dass BAFF nach einem charakteristischen Sequenzmotiv von einer Furin-Typ-Protease prozessiert wird und dies zur Freisetzung der biologisch aktiven, löslichen Form führt [116]. Da auch in der Sequenz von chBAFF das Motiv für diese mögliche Furin-Schnittstelle an entsprechender Position gefunden wurde, ist eine ähnliche Prozessierung zu vermuten. Erstaunlich sind die hohen Sequenzähnlichkeiten zwischen den löslichen Formen des Zytokins von Huhn und Säuger. So ist lösliches chBAFF auf der Aminosäuren-Ebene zu 70% bzw. 76% mit murinem bzw. humanem BAFF identisch, wogegen die meisten anderen Zytokine des Huhnes weniger als 30% Identität zeigen [244]. Eine Ausnahme hiervon bildet chIL-6, das, unter Berücksichtigung konservativer Aminosäuren-Substitutionen, eine Ähnlichkeit von mehr als 50% zu humanem IL-6 zeigt. Interessanterweise führt diese Ähnlichkeit auch zur funktionellen Austauschbarkeit der Zytokine in einigen Bioassays, wie dem Proliferationstest mit 7TD1-Zellen [114, 246].

### 6.1.2 Herstellung von rekombinantem chBAFF

Zur Herstellung von rekombinantem Protein wurden sowohl ein prokaryotisches als auch ein eukaryotisches Expressionssystem genutzt. Für die prokaryotische Expression wurde die chBAFF-Sequenz in den Expressionsvektor pQE9 kloniert. Durch Expression dieses Konstruktes in *E.coli* konnte ein Protein gewonnen werden, welches am aminoterminalen Ende mit sechs Histidinen versehen ist. Mittels dieses „His-Tags“ war es möglich, das Protein über eine Nickel-Agarose-Säule aufzureinigen. Dies führte zu Zytokinpräparationen von mehr als 95% Reinheit. Für die eukaryotische Expression in 293T-Zellen wurde die Sequenz des löslichen Teiles von chBAFF so in einen modifizierten PCR-3-Vektor [235] kloniert, dass das Produkt neben einem Hämagglutinin-Signalpeptid zusätzlich ein Flag-Tag trägt. Der Vorteil der prokaryotischen Expression ist die Möglichkeit, rasch größere Mengen an rekombinantem

Protein herstellen zu können. Nachteilig kann sich dabei jedoch die im Vergleich zur eukaryotischen Zelle unterschiedliche Prozessierung der Proteine auswirken.

Um neben Antikörpern gegen Histidin bzw. das Flag-Epitop eine weitere Nachweismöglichkeit für BAFF zu erhalten, wurde ein Kaninchenserum gegen His-chBAFF generiert und aufgereinigt. Wie im Western Blot gezeigt werden konnte, ermöglicht die aus dem Serum gereinigte IgG-Fraktion die Detektion von prokaryotisch und eukaryotisch exprimiertem Protein, wodurch die anschließende Etablierung eines ELISA-Testsystems zur Quantifizierung des Flag-chBAFF-Gehalts in 293T-Überständen möglich wurde.

### **6.1.3 Rezeptoren für chBAFF finden sich exklusiv auf B-Zellen**

Die Erkenntnisse der letzten Jahre über Mitglieder der verschiedenen Zytokin- und Zytokinrezeptoren-Familien haben immer wieder deutlich gemacht, dass die Funktion eines Zytokins nur verstanden werden kann, wenn auch sein Rezeptor bekannt ist [247]. Für BAFF fanden sich bei Mensch und Maus mit BAFF-R, BCMA und TACI bislang drei Rezeptoren [151, 155], wobei die Funktion von BAFF als B-Zell-Überlebensfaktor offensichtlich ausschließlich über den BAFF-R vermittelt wird [139]. Aufgrund der hohen Homologie zwischen chBAFF und den Säuger-Analogen bot sich als erste Versuchsreihe die Überprüfung einer möglichen Bindung des Hühnerzytokins an die bekannten humanen und murinen Rezeptoren an. Die hierzu von Schneider et al. durchgeführte Ko-Immunopräzipitation und der Rezeptor-Ligand-Interaktions-ELISA konnten tatsächlich demonstrieren, dass chBAFF spezifisch an BAFF-R, TACI und BCMA von Mensch und Maus bindet [221]. Beim Säuger finden sich die Rezeptoren für BAFF vorrangig auf B-Zellen und in geringem Maß auf einigen T-Zellen [151, 153, 155]. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Mitglieder der TNF-Familie Trimere mit hoher Affinität zu ihren Rezeptoren bilden [136], ist es häufig möglich, ihre Bindung an membranständige Rezeptoren über entsprechende Antikörper nachzuweisen, eine Technik, die in dieser Weise für andere Zytokinfamilien aufgrund ihrer niedrigeren Affinität nicht durchführbar ist. Nachdem die Interaktion von chBAFF mit den Säugerrezeptoren belegt werden konnte, wurden in dieser Arbeit umfangreiche durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bindung von Flag-chBAFF an Hühnerlymphozyten durchgeführt. Diese zeigten zunächst, dass Flag-chBAFF an eine in Milz, Caecaltonsillen, Blut und Bursa vorhandene Zellpopulation band, die in der Bursa annähernd 100% der isolierten Lymphozyten beinhaltete, im Thymus dagegen so gut wie nicht nachweisbar war. Da es sich bei ungefähr 98% der Zellen aus der Bursa um B-Zellen handelt, legten diese Daten die Vermutung nahe, dass es sich bei den von Flag-chBAFF gebundenen Zellen vorrangig oder ausschließlich um B-Zellen handelt. In nachfol-



genden Zwei-Farben-Immunfluoreszenz-Analysen konnte eindeutig gezeigt werden, dass chBAFF in Blut, Milz, Caecaltonsillen und Bursa nur an B-Zellen bindet, Rezeptoren für das Zytokin beim Huhn folglich ausschließlich auf B-Zellen exprimiert werden.

Hierbei konnte die Bindung von BAFF nicht nur an die differenzierten B-Zellen in der Peripherie, sondern auch an die B-Zellen der Bursa nachgewiesen werden. Interessant dabei ist, dass damit beim Huhn auch unreife B-Zellen Rezeptoren für BAFF exprimieren, wogegen beim Säuger ein Einfluss von BAFF bislang immer nur auf den peripheren Pool reifer B-Zellen beschrieben und eine Wirkung auf sich entwickelnde B-Zellen stets negiert wurde [117, 158]. Die Feststellung, dass murines und humanes BAFF in der selben Intensität wie chBAFF an Hühner-B-Zellen binden, war aufgrund der hohen Homologie und der bereits beschriebenen Bindung von chBAFF an die Rezeptoren des Säugers beinahe zu erwarten. Von großer Bedeutung für die späteren funktionellen Untersuchungen war jedoch die ebenfalls durchflusszytometrisch verifizierte Möglichkeit, dass die Interaktion von chBAFF mit seinen Rezeptoren auf B-Zellen durch Zugabe von löslichem humanem BCMA-Fc inhibierbar ist.

Für zukünftige Arbeiten äußerst hilfreich könnte die nachgewiesene Expression der BAFF-Rezeptoren auf DT40-Zellen werden. Diese bursale Hühner-B-Zelllinie wird weltweit für zahllose molekularbiologische Untersuchungen zur Signaltransduktion verwendet [248, 249] und stellt damit sicherlich die am besten charakterisierte Hühner-Zelllinie überhaupt dar. Da aus diesem Grund auch eine große Palette molekularbiologischer Werkzeuge für DT40-Zellen etabliert wurde, werden Untersuchungen zum Wirkmechanismus von chBAFF dadurch deutlich vereinfacht.

#### **6.1.4 chBAFF-Rezeptor-Ontogenese**

Wie die Durchflusszytometrie gezeigt hatte, werden Rezeptoren für BAFF beim Huhn auch von den unreifen B-Zellen der Bursa exprimiert. In Zusammenhang mit der zusätzlich gezeigten chBAFF-Expression in diesem B-Zellreifungsorgan ergab sich daraus die Frage, ab welchem Zeitpunkt der B-Zellentwicklung die Zellen diese Rezeptoren tragen. Hierzu wurden Analysen zur Expression von BAFF-Rezeptoren und membranständigem Immunglobulin auf B-Zellen aus Milz und Bursa zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung und nach dem Schlupf durchgeführt. Interessanterweise ließen sich dabei die im Literaturteil (s. auch Abb. 2.2) ausführlich beschriebenen einzelnen Phasen der B-Zellreifung beim Huhn sehr gut nachvollziehen. So waren bereits an Embryonaltag 10  $Bu1^+$  Zellen in der Milz zu finden, die jedoch weder eine Expression von BAFF-Rezeptoren noch von Immunglobulinmolekülen in ihrer Zellmembran zeigten [12]. An Embryonaltag 14 war eine deutliche Zu-

nahme dieser Vorläufer-B-Zellen in der Milz zu beobachten. Wie erwartet, exprimierten einige wenige dieser Zellen IgM [13], eine klare BAFF-Rezeptoren-Expression lies sich dagegen nicht feststellen. Die zum selben Zeitpunkt schon aus der Peripherie in die Bursa eingewanderten B-Zellen [26] wiesen insgesamt eine schwache Bindung von BAFF auf, die Zellen, die bereits den BCR in ihrer Zellmembran trugen [31], zeigten dagegen eine stärkere BAFF-Rezeptoren-Expression. Am Embryonaltag 18 waren in der Milz nur noch wenige B-Zellvorläufer zu finden [29], während in der Bursa zu diesem Zeitpunkt, an dem „gene conversion“ und Zellproliferation ihre volle Ausprägung finden [41], fast alle isolierten Zellen  $Bu1^+$  waren, zu einem großen Teil IgM exprimierten und in ihrer Gesamtheit eine deutliche Bindung von chBAFF zeigten. Diese Rezeptordichte nimmt auf den B-Zellen in der Bursa bis zum ersten Lebenstag noch einmal zu und scheint sogar höher zu sein als diejenige auf B-Zellen aus der Milz von Eintagsküken. Bei den am ersten Lebenstag in der Milz gefundenen B-Zellen handelt es sich um Zellen, die um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnen, aus der Bursa in die Peripherie auszuwandern [32, 79]. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Expression von Rezeptoren für chBAFF eng mit dem Einbau von Immunglobulin in die Zellmembran korreliert und folglich schon zu einem sehr frühen Stadium der B-Zellentwicklung nachzuweisen ist. Im Einklang hiermit stehen neueste, bei der Maus gewonnene Daten, die ebenfalls eine Korrelation zwischen BAFF-R und sIg-Expression beschreiben und damit die BAFF-Wirkung auf ausschließlich reife B-Zellen beim Säuger erstmals in Frage stellen [208].

### 6.1.5 ChBAFF-Expression

Während die Expression des Rezeptors mit Hilfe des löslichen Zytokins untersucht werden konnte, stehen bisher entsprechende Werkzeuge für Expressionsstudien des Zytokins nicht zur Verfügung. Daher wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass BAFF beim Huhn hauptsächlich in der Bursa Fabricii exprimiert wird. Zur Klärung der Frage, welche Zellen in diesem für die Klasse der Vögel charakteristischen B-Zellreifungsorgan BAFF produzieren, wurde zusätzlich eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Die Bursa enthält neben B-Zellen verschiedener Reifungsstadien in Cortex und Medulla der Bursafollikel noch einige andere Zellpopulationen, über deren Funktion bis heute wenig bekannt ist [20]. So finden sich in der Follikelmedulla neben unreifen und reifen B-Zellen auch Makrophagen, einige wenige T-Zellen und ein Netzwerk von sog. bursalen sekretorischen Dendritischen Zellen (BSDC) [250]. Die durch die Hybridisierung mit  $^{33}\text{P}$  markierter antisense-BAFF-cDNA sichtbar gemachte BAFF-RNA wies ein Verteilungsmuster auf, das keiner distinkten Zellpopula-

tion in Cortex oder Medulla zuzuordnen war, sondern sich gleichmäßig über das gesamte Organ verteilte. Dies könnte sowohl für eine Expression des Zytokins durch die B-Zellen selbst als auch durch im gesamten Organ vorhandene Stromazellen sprechen. Gegen eine Expression von chBAFF durch reife B-Zellen spricht die Tatsache, dass im Northern Blot in peripheren lymphatischen Organen keine chBAFF-RNA oder wenn nur äußerst geringe Mengen in der Milz nachgewiesen werden konnten. Untersuchungen zum Genexpressionsprofil verschiedener B-Zell-Entwicklungsstadien beim Vogel zeigten aber eine vierfach erhöhte Expression von BAFF in bursalen B-Zellen im Vergleich zu TCR-2<sup>+</sup> T-Zellen. [251]. Da die Anreicherung der B-Zellen aus der Bursa hierfür jedoch mit einem Antikörper gegen das Bu1-Antigen durchgeführt wurde und dieses Antigen in der Bursa neben den B-Zellen auch auf einem kleinen Prozentsatz medullärer Makrophagen zu finden ist [252], könnte die nachgewiesene chBAFF-mRNA durchaus auch von diesen Zellen stammen. Neueste bei der Maus gewonnene Daten zeigen, dass BAFF zwar unter anderem von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird, der Hauptteil jedoch von bestrahlungsresistenten Stromazellen stammt [206]. Dies würde bei einer Übertragung auf die Bursa bedeuten, dass sowohl medulläre Bu1<sup>+</sup> Makrophagen als auch Stromazellen das Zytokin exprimieren könnten. Einen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage könnte die Behandlung von Hühnerembryonen mit Cyclophosphamid bieten. Hierdurch wird der lymphoide Anteil der Bursa vollständig zerstört [24], womit die B-Zellen als Quelle für nach der Gabe von Cyclophosphamid gegebenenfalls noch vorhandenes BAFF ausgeschlossen wären.

Bislang steht aber lediglich fest, dass chBAFF vorrangig in der Bursa exprimiert wird. Ob dies in autokriner Weise von den B-Zellen des Organs geschieht oder Bursa-Stromazellen und Makrophagen dafür verantwortlich sind, bedarf weiterer Klärung.

In Zusammenhang mit den vorliegenden Daten zur Ontogenese der BAFF-Rezeptor-Expression bietet es sich an, auch die Ontogenese der Expression des Zytokins selbst genauer zu analysieren. Hiermit könnte der früheste Zeitpunkt bestimmt werden, an dem Rezeptor-Ligand-Interaktionen möglich sind, woraus wiederum Rückschlüsse auf die hiervon beeinflussten B-Zell-Reifungsstadien gezogen werden könnten.

## 6.2 Untersuchungen zur Funktion von chBAFF

Wie die vorausgegangenen Versuche gezeigt hatten, kodiert die gefundene, zu humanem und murinem BAFF hoch homologe Sequenz in der Tat für ein funktionelles Zytokin, dessen Rezeptoren beim Huhn ausschließlich von B-Zellen exprimiert werden. Nachdem es möglich

war, rekombinantes Protein sowohl pro- als auch eukaryotisch herzustellen, stellte sich selbstredend die Frage nach der eigentlichen Funktion des Zytokins. Erste Erkenntnisse hierzu lieferten Untersuchungen zur Wirkung von chBAFF auf kultivierte primäre Zellen, welche anschließend durch *in vivo* Versuche erweitert werden konnten.

### 6.2.1 ChBAFF als Überlebensfaktor für kultivierte B-Zellen

Bei Mensch und Maus wurde die Hauptfunktion von BAFF als Überlebensfaktor für reife B-Zellen beschrieben [161]. In verschiedenen Publikationen wird auch eine proliferative Wirkung des Zytokins auf B-Zellen postuliert, allerdings nicht alleine, sondern lediglich als Kofaktor zusammen mit weiteren Stimuli, wie der Quervernetzung des BCR oder der Zugabe von CD40L [116, 117].

In einer ersten Versuchsreihe konnten, nach mehrtägiger Kultivierung von Milzlymphozyten in Anwesenheit von Flag-chBAFF, im Durchflusszytometer gegenüber den Kontrollansätzen mehrfach erhöhte Frequenzen lebender B-Zellen gemessen werden. Da hierfür neben einer vergrößerten B-Zellpopulation auch eine Abnahme der übrigen Zellpopulationen (T-Zellen) in Frage gekommen wäre, wurde im folgenden die Gesamtzahl lebender B-Zellen in den Kulturen bestimmt. Diese zeigte eine eindeutige Abhängigkeit der Erhöhung der B-Zellzahl von der zugesetzten Menge an Flag-chBAFF. Bei Einsatz der optimalen Dosierung konnte eine drei- bis vierfache Zunahme der Gesamtzahl lebender B-Zellen beobachtet werden. Bei den B-Zellen der Milz handelt es sich um spezielle Formen peripherer B-Lymphozyten, die funktionell nicht in jeder Hinsicht den B-Lymphozyten aus anderen Organen gleichzusetzen sind [253, 254]. Auf die B-Zellen aus den Caecaltonsillen konnte jedoch derselbe Effekt von chBAFF nachgewiesen werden, wohingegen diese Wirkung auf die B-Zellen aus dem peripheren Blut, wenn überhaupt, nur in deutlich abgeschwächter Form zu finden war. Auffällig war daneben die Beobachtung, dass die Überlebensdauer der verschiedenen B-Zellen in Kultur stark differiert. Während von den aus Caecaltonsillen isolierten B-Zellen nach 24-stündiger Kultur noch knapp die Hälfte der Zellen lebten, standen diesem Wert in der Milz 30% und in den PBL-Kulturen nur noch 15% gegenüber. Der rasche Tod der aus dem Blut gewonnenen B-Zellen passt zu Angaben in der Literatur [77, 79]. Danach können im Blut drei verschiedene B-Zellpopulationen unterschieden werden, von denen die Größte nach ihrer Emigration aus der Bursa mit einer Halbwertszeit von nur 30 Stunden bereits *in vivo* extrem kurzlebig ist, eine zweite, ungefähr 35% der B-Zellen einnehmende Population mit 12 Tagen Halbwertszeit etwas länger lebt und nur ein kleiner Anteil von 5%, mit einer Halbwertszeit von 100 Tagen wirklich als langlebig zu bezeichnen ist. Diese langlebigen B-Zellen sind vermutlich in der Lage, sich außerhalb der Bursa selbst zu erneuern. Abgesehen von diesen, also

auch unter *in vivo* Bedingungen sehr schnell sterbenden B-Zellen aus dem Blut, bewirkt chBAFF folglich in Kulturen peripherer Lymphozyten eine Zunahme der Gesamtzahl lebender B-Zellen.

Da die gezeigten Effekte bis zu diesem Zeitpunkt mit gemischten Zellpräparationen nachgewiesen wurden, war eine Beeinflussung der Ergebnisse durch sekundäre Nebeneffekte von chBAFF auf „Nicht-B-Zellen“ nicht auszuschließen. Für weitere Versuche erfolgte daher eine Anreicherung der B-Zellen aus Milzlymphozyten über eine MACS-Säule. Um Veränderungen des Aktivierungszustandes der B-Zellen durch die Anreicherung möglichst gering zu halten, wurde zur Markierung der B-Zellen ein Antikörper gegen die leichte Kette verwendet, dessen Bindung nicht zur Quervernetzung und damit Aktivierung des BCR führt. In den wenigen bislang in der Literatur beschriebenen Experimenten mit sortierten B-Zellen des Huhnes wurden mehrfach Antikörper gegen Bu-1 eingesetzt [251]. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Aktivierung dieses Antigens zur signifikanten Steigerung der Apoptoserate der B-Zellen führt [74], weshalb anti-Bu-1-Antikörper für Untersuchungen zur Viabilität von B-Zellen gänzlich ungeeignet sind. Ansätze mit mittels L-Ketten-Antikörper auf eine Reinheit von mehr als 93% angereicherten B-Zellen bestätigten die bisher erhobenen Daten mit einer fünf-fachen Erhöhung der Zahl lebender B-Zellen durch chBAFF und belegten damit eine, von anderen Zellpopulationen unbeeinflusste, direkte Wirkung des Zytokins auf B-Zellen.

Die Verwendung von humanem oder murinem BAFF führte zu Effekten, die mit denen von chBAFF identisch waren. Damit konnte eine funktionelle Kreuzreaktivität zwischen Säuger- und Vogelzytokin belegt werden, wie sie in dieser Form bislang lediglich für IL-6 gezeigt wurde [114]. Beim Säuger ist bereits bekannt, dass BAFF nicht proliferativ wirkt, sondern die Apoptose der B-Zellen hemmt [173, 255]. Aufgrund der vorhandenen Kreuzreaktivität war es daher wahrscheinlich, dass auch chBAFF eher das Überleben der B-Zellen in den Kulturen verlängert, als durch Induktion der Proliferation von wenigen Zellen die Gesamtzahl der B-Zellen erhöht. Zur Absicherung dieser Vermutung wurde die Technik der CFSE-Färbung bei Hühnerzellen etabliert. Wie bereits ausgeführt (s. 4.19), kann bei CFSE markierten Zellen die Proliferation durch Reduktion der Fluoreszenz nachgewiesen und gleichzeitig durch zusätzliche Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern bestimmten Zellpopulationen zugeordnet werden. CFSE markierte Milzlymphozyten konnten zwar durch Stimulation mit ConA zur Proliferation angeregt werden, nicht jedoch durch die Zugabe von chBAFF. Unter dem Einfluss des Zytokins kam es auch bei den markierten Zellen zur Erhöhung der B-Zellfrequenz, obwohl diese niedriger ausfiel als bei unmarkierten Zellen. Ursache hierfür könnte eine mög-

liche Schädigung der - beim Huhn besonders empfindlichen - B-Zellen durch den Fluoreszenzfarbstoff sein, da es beim Einbau von CFSE in das Zytoskelett zur Bildung von Formaldehyd und Essigsäure kommen kann [256]. Insgesamt zeigten die Versuche mit CFSE gefärbten Zellen aber klar, dass chBAFF, ebenso wie das murine und humane Zytokin, nicht zur Proliferation der B-Zellen in Kultur führt, sondern vielmehr das Überleben peripherer B-Zellen in Kultur zu verlängern scheint. Ob dies wie beim Säuger über die vermehrte Expression von anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie vermittelt wird [70, 171, 174], ist aufgrund der hohen Homologie und Kreuzreaktivität zu vermuten, muss jedoch noch bestätigt werden.

Neben diesen Übereinstimmungen deuteten sich bereits durch die Expression von chBAFF in der Bursa und den Nachweis von chBAFF-Rezeptoren auf sehr frühen B-Zellstadien mögliche weitere Funktionen des Zytokins beim Vogel an, die im Unterschied zur bislang gültigen Interpretation seiner Wirkungsweise beim Säuger stehen. Hierfür sprechen auch die vorliegenden funktionellen Daten. So konnte der auch in der Literatur beschriebene [257] rasche Tod von Bursalymphozyten in Kultur durch Zugabe von chBAFF zwar nicht vollständig verhindert, aber doch stark verlangsamt werden. Hierzu passt die vor wenigen Monaten erfolgte Beschreibung einer nicht näher erläuterten Stimulation von Bursalymphozyten durch humanes BAFF [251]. Bislang war eine Steigerung der Viabilität von bursalen B-Zellen nur durch Zugabe von Phorbolestern zu erzielen [67]. Mit chBAFF als Zytokin ist nun erstmals ein physiologisch relevanter Faktor bekannt, der zu deutlich längerem Überleben dieser unreifen B-Zellen in Kultur führt.

Aus den bislang *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen lässt sich allerdings nur ein sehr grundsätzliches Bild über die Wirkung von chBAFF ableiten, schließlich erfolgt die Regulation des Immunsystems nicht durch die gesonderte Wirkung einzelner Zytokine, sondern durch die integrierte Informationsübermittlung eines ganzen Zytokin-Netzwerkes und zahlreicher Zell-Zell-Interaktionen. Für künftige *in vitro* Arbeiten wird daher, neben der Untersuchung der chBAFF-Signaltransduktion, sicherlich ein besonderes Augenmerk auf die Gewinnung von Kenntnissen zum möglichen Zusammenspiel von chBAFF mit anderen beim Huhn bekannten Faktoren wie IL-6, CD40L oder der Stimulation über den BCR gelegt werden.

### **6.2.2 Beeinflussung der B-Zell-Homöostase durch chBAFF**

Eine letztgültige Aussage über die Wirksamkeit eines Zytokins ist nur durch *in vivo* Versuche zu erhalten, in welchen heute üblicherweise entweder mit der Überexpression oder dem Knockout des entsprechenden Zytokingens gearbeitet wird. Doch während hierfür bei der

Maus vom transgenen Tier bis zum klassischen Gen-Knockout das gesamte Spektrum der funktionellen Genomanalyse zur Verfügung steht, ist dies bereits bei den meisten Haussäugetieren nicht mehr der Fall und aus naheliegenden Gründen beim Menschen überhaupt nicht möglich. Die Herstellung transgener Tiere stellt einen hochaktuellen Forschungsbereich dar und ist mittlerweile neben der Maus auch für Schwein, Schaf und einige andere Spezies etabliert [258, 259], beim Huhn jedoch noch nicht möglich. Aus diesem Grund muss, um eine funktionelle Überexpression zu erzielen, immer noch das Protein selbst durch Injektion zugeführt werden. In Zukunft könnte allerdings unter Umständen der Einsatz entsprechender Vektoren eine Möglichkeit bieten, die aufwendige Herstellung der großen Mengen an Protein für *in vivo* Studien zu ersetzen. Ein viel versprechendes Beispiel für einen erfolgreich durchgeführten Gentransfer beim Huhn stellt die durch einen retroviralen Vektor bewirkte Expression trunkierter Immunglobulinmoleküle in B-Zellen von Hühnerembryonen dar [34]. Um im Gegenzug zur Überexpression die Wirkung eines Zytokins vollständig zu eliminieren, ist die effektivste Technik sicherlich der Gen-Knockout. Doch während dies wiederum für die Maus eine Standardmethode darstellt und eine Vielzahl von Knockout-Modellen dieser Tierart käuflich zu erwerben ist, ist die Durchführung eines Gen-Knockouts beim Vogel bislang nicht möglich. Somit bleibt beim Huhn für diesen Zweck nur der Weg der Neutralisierung endogen gebildeten Zytokins, also eines funktionellen Knockouts oder besser Knockdowns, da diese Technik nicht zur vollständigen Eliminierung der Zielproteine führt. Hierfür bieten sich verschiedene experimentelle Möglichkeiten. Klassischerweise wurden den Tieren neutralisierende Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz injiziert. Diese Methode wurde nicht zuletzt zur Elimination ganzer Zellpopulationen angewandt [260], hat jedoch den Nachteil, dass die Gewinnung eines geeigneten neutralisierenden Antikörpers sich extrem aufwendig gestalten kann. Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Techniken eröffnete die Möglichkeit, statt monoklonaler Antikörper zur Neutralisation von Zytokinen deren natürliche Rezeptoren zu verwenden. Lösliche Zytokinrezeptoren wurden als hochaffine Bindungspartner in der Evolution selektiert, zeichnen sich durch eine ideale Spezifität aus und können als rekombinantes Protein in großer Menge hergestellt werden [261, 262]. Mit diesem Ansatz konnten gerade in der TNF-Familie sehr gute Ergebnisse erzielt werden, die mittlerweile in der Humanmedizin mit Enbrel® bereits zur Zulassung eines löslichen TNF-Rezeptors als Therapeutikum gegen die rheumatoide Arthritis führten [247]. Eine ganz neue Chance könnte die RNA-Interferenz Technologie bieten. Hierbei wird über den Einsatz von kurzen (21-23nt) doppelsträngigen RNA Fragmenten, sog. „short interfering RNAs“ (siRNA) die Spaltung komplementärer zellulärer mRNA initiiert und dadurch die Translation des jeweiligen Pro-

teins verhindert. Da doppelsträngige RNA eigentlich nur bei der Replikation bestimmter Viren auftritt, dient dieser Mechanismus der Zelle zum Schutz vor viralen Infektionen [263]. Nach Entdeckung der siRNAs in Pflanzen und Helminthen [264], konnten künstlich hergestellte siRNAs inzwischen auch zum Gen-Knockdown in Mammalierzellen benutzt werden. Mittels neuer Applikationsformen, wie der Verwendung viraler Vektoren zur Bildung der siRNA direkt in der Zielzelle, konnte bei Mäusen und Ratten bereits eine zielgerichtete Reduktion der Genexpression *in vivo* erzielt werden [265, 266]. Vor einem routinemäßigen Einsatz dieser neuen Technik müssen sicherlich noch eine ganze Reihe von Schwierigkeiten überwunden werden, sie stellt jedoch in jedem Fall eine potente Alternative zum Gen-Knockout dar, die insbesondere in der Tiermedizin große Bedeutung erlangen könnte.

### 6.2.3 Einfluss von chBAFF auf die B-Zellzahl

Die zur funktionellen Überexpression von chBAFF durchgeführte siebentägige Injektion von prokaryotisch exprimiertem Protein führte bei Küken neben einer signifikanten Zunahme des Milzgewichts zur Erhöhung der B-Zellfrequenz in Milz und Caecaltonsillen. Da die Größenzunahme der Milzen auf eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl schließen lässt, folgt daraus in Zusammenhang mit der gesteigerten B-Zellfrequenz, dass die Supplementierung von chBAFF zur spezifischen Expansion der B-Zellpopulation in der Milz und höchstwahrscheinlich auch der Caecaltonsillen führte. Um zu bestimmen, ob die Expansion der B-Zellen *in vivo* aus einer gesteigerten Überlebensrate oder der Induktion von Zellproliferation resultiert, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Als mögliches Verfahren zum Nachweis oder Ausschluss der Zellproliferation im Tier böte sich hierfür die Nutzung des Thymidinanalogs Bromodeoxy-Uridin (BrdU) an [267, 268], da der Nachweis des BrdU-Einbaus in die DNA proliferierender Zellen im Verlauf dieser Arbeit bereits etabliert werden konnte.

Im Gegensatz zu den B-Zellen aus Milz und Caecaltonsillen konnte auf die B-Zellen der Bursa durch die Applikation von chBAFF kein Einfluss gezeigt werden, da weder die Zellzahl zunahm, noch Veränderungen im Organgewicht festzustellen waren. Dies könnte dafür sprechen, dass die ersten Stadien der B-Zellreifung beim Huhn, wie beim Säuger postuliert, unabhängig von BAFF erfolgen. Da chBAFF in der Bursa jedoch hoch exprimiert wird, könnte aber auch die endogen bereitgestellte Menge an BAFF so groß sein, dass die BAFF-Rezeptoren auf den Zellen bereits mit Liganden gesättigt sind und aus diesem Grund durch zusätzliches, exogen zugeführtes Zytokin keine additiven Effekte mehr erzielt werden konnten. Daher scheint der Weg des funktionellen Knockouts eher geeignet, um die Frage nach dem Einfluss von chBAFF auf die Zellen der Bursa zu klären.



Wie ausgeführt, ist die Generierung von Gen-Knockouts beim Huhn bislang nicht möglich und auch Antikörper gegen chBAFF stehen noch nicht zur Verfügung. Jedoch konnte gezeigt werden, dass chBAFF an alle drei bekannten BAFF-Rezeptoren von Mensch und Maus bindet und *in vitro* mit löslichem humanen BCMA eine Inhibition der Bindung von chBAFF an B-Zellen erzielt werden kann. Damit bot sich für die *in vivo* Neutralisation des Zytokins der Einsatz des kreuzreagierenden löslichen Säuger-Rezeptors an. Für die Durchführung dieser Versuche wurde lösliches huBCMA-Fc verwendet, welches freundlicherweise von Dr. Pascal Schneider (Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde. In einem ersten Versuch führte die Blockade von endogenem chBAFF in den Milzen der Tiere zur Abnahme der B-Zellfrequenz auf die Hälfte. Da dies auch mit einem niedrigeren Milzgewicht einherging, kam es durch das Fehlen von BAFF offensichtlich zur Reduktion der Zahl peripherer B-Zellen. Bestätigt wurde diese Interpretation auch durch die erniedrigten B-Zellfrequenzen in den Caecaltonsillen der BCMA-behandelten Tiere. Im Gegensatz zur Supplementierung von chBAFF konnte durch den funktionellen Knockdown des Zytokins auch ein Effekt auf die Bursa gezeigt werden, da es zur eindeutigen Verkleinerung der Organe kam. In einem Folgeversuch konnten durch eine Modifikation des Behandlungsschemas die Auswirkungen auf Milz und Caecaltonsillen nochmals verstärkt werden und führten schließlich zur Reduktion der B-Zellfrequenz auf etwa ein Viertel der in der Kontrollgruppe beobachteten Frequenzen. Veränderungen in den Organgewichten waren allerdings bei diesen mit sechs Tagen deutlich jüngeren Tieren nur bedingt zu finden.

So führte die Neutralisation von BAFF nur bei den zehn Tage alten Tieren zur Verkleinerung der Bursa, während weder die Blockade bei fünftägigen Küken, noch die Supplementierung von chBAFF messbare Veränderungen des Organs bewirkte. Anhand dieser *in vivo* Experimente ist daher keine endgültige Aussage über die Wirkung von chBAFF auf die unreifen B-Zellen der Bursa zu treffen. Berücksichtigt man jedoch, dass chBAFF hauptsächlich in der Bursa exprimiert wird, die B-Zellen der Bursa bereits ab dem Zeitpunkt der sIg-Expression Rezeptoren für das Zytokin tragen, die Zugabe von chBAFF zu Kulturen aus Bursalymphozyten deren Überleben verlängerte und die Hemmung des Zytokins in einem geeigneten experimentellen Ansatz zur Reduktion der Organgröße führte, scheint eine Wirkung von chBAFF auf die frühen B-Zellstadien der Bursa sehr wahrscheinlich. Da beim Huhn nach Expression des BCR in der Zellmembran zur Unterscheidung unterschiedlicher Stadien der B-Zellreifung keine adäquaten Oberflächenmarker vorhanden sind, werden künftige Knockdown-Studien sicherlich schwerpunktmäßig immunhistologische Untersuchungen der Bursa beinhalten, um eventuelle Veränderungen in der Organstruktur und Zellverteilung darstellen

zu können. Gerade zum funktionellen Knockdown von chBAFF in der Bursa würde sich die Etablierung der oben erwähnten siRNA-Technologie anbieten. Aufgrund des vorhandenen reversen peristaltischen Reflexes werden auf die Anallippen aufgebrauchte Substanzen sehr rasch und annähernd vollständig über den Verbindungsgang vom Enddarm in die Bursa transportiert und über das Follikel assoziierte Epithel an die Follikelmedulla weitergegeben [56]. Somit könnten entsprechend modifizierte Vektoren über diesen Weg direkt an den Ort der BAFF-Expression gelangen, womit eine hochgradige Verdünnung durch eine intravenöse Applikation vermieden würde. Hinzu kommt, dass wenigstens für größere Moleküle, wie DNP konjugiertes bovines Serum Albumin, ein Verbleib des aufgenommenen Stoffes in der Bursa gezeigt werden konnte [11] und die Wirkung der gebildeten siRNA somit lokal begrenzt werden könnte.

#### **6.2.4 Einfluss von chBAFF auf die Antikörperspiegel**

Welche Auswirkungen die Überexpression oder Neutralisation von chBAFF auf die Differenzierung und den Aktivierungszustand peripherer B-Zellen haben, ist beim Huhn im Gegensatz zur Maus kaum zu analysieren, da weder Marker zur Unterscheidung der Differenzierungsstadien peripherer B-Zellen noch standardisierte Assays zur Überprüfung ihres Funktionszustandes zur Verfügung stehen. Dass das Vorhandensein entsprechender Oberflächenmarker aber nicht nur zu Informationsgewinn führen, sondern auch zu möglichen Fehlinterpretationen von Ergebnissen verleiten kann, beweist eine wenige Monate alte Veröffentlichung aus dem Säugersystem. Hier wurden die verschiedenen B-Zellstadien (T1, T2, MZ usw.) bislang hauptsächlich anhand ihrer Expression der CD21/35 und CD23-Antigene unterschieden. In BAFF-Knockout-Tieren konnten nun kaum B-Zellen mit Expression dieser Moleküle nachgewiesen werden. Da von T1-Zellen weder CD21/CD35 noch CD23 exprimiert werden, sondern B-Zellen diese Moleküle in unterschiedlicher Ausprägung erst ab dem T2-Stadium tragen, lautete die Theorie, dass ohne BAFF die B-Zellentwicklung im T1-Stadium blockiert wird [184]. Neueste Daten zeigen nun jedoch, dass BAFF die Expression von CD21/35 und CD23 unabhängig von der B-Zelldifferenzierung steigert. Dies bedeutet, dass die stark reduzierte Expression in BAFF-Knockout-Tieren nicht unbedingt auf eine Blockade der B-Zellentwicklung zurückzuführen ist und die postulierte Funktion von BAFF mit anderen Methoden nochmals überprüft werden sollte [208].

Für Untersuchungen zur Antikörperproduktion als Hauptfunktion der B-Zellen stehen aber auch beim Huhn die nötigen Reagenzien zur Verfügung. So konnte nach der Behandlung mit chBAFF neben einer Erhöhung der Zahl der B-Zellen auch ein signifikanter Anstieg der im

Serum vorhandenen Menge an IgM nachgewiesen werden. Bei den IgA-Spiegeln im Serum führt das vermehrte Angebot von chBAFF aber nur zu einem geringgradigen Anstieg. Allerdings waren die Tiere bei Versuchsende erst zehn Tage alt. Wie frühere Arbeiten gezeigt haben, beginnt die IgA-Synthese der Tiere erst zu diesem Zeitpunkt [269], weshalb ein deutlicher Effekt der chBAFF-Applikation auf die IgA-Werte im Serum auch nicht zu erwarten war. Keine Veränderungen fanden sich bei den im Serum nachgewiesenen Mengen an IgG. Da bei Tieren dieses Alters noch große Mengen an maternalem, aus dem Dotter stammendem IgG im Serum zu finden sind, war mit deutlichen Differenzen ebenfalls nicht zu rechnen. Nach der Neutralisation von chBAFF durch huBCMA-Fc wiesen die Immunglobulinspiegel der 10 Tage alten Tiere in der BCMA-Gruppe große Unterschiede auf, tendenziell wurde jedoch eine Erniedrigung der IgM- und IgA-Werte durch die Blockade von BAFF erkennbar. Untersuchungen zur vorhandenen IgG Menge wurden auch hier vom noch vorhandenen maternalen IgG behindert. Die Veränderung des Behandlungsschemas zu einer täglichen BCMA-Injektion führte zwar zu einer noch stärkeren Reduktion der B-Zellzahl, bei den Immunglobulinspiegeln im Plasma waren dagegen keine Unterschiede zwischen der huBCMA-Fc behandelten und der Kontrollgruppe messbar. Da die Auswirkungen der BCMA-Gabe in den durchgeführten Versuchen offensichtlich stark vom Alter der Tiere und dem Behandlungsschema beeinflusst wurden, deuten die bisher vorliegenden Daten lediglich an, dass die Neutralisation von chBAFF zu einer Reduktion der IgM- und IgA-Menge im Plasma führt.

Zur Verifizierung der BAFF-Wirkung auf die Antikörperproduktion müssten daher sowohl für die Supplementierung als auch für die Neutralisation von BAFF ältere Tiere verwendet werden, bei denen die Produktion aller Immunglobuline bereits voll ausgebildet ist und die Analysen nicht mehr durch das zirkulieren maternalen IgGs gestört werden. Problematisch hierbei ist der stark erhöhte Bedarf an rekombinantem Zytokin bzw. löslichem Rezeptor bei älteren und somit schwereren Tieren. Für die BAFF-Expression muss daher in Zukunft sicherlich nach einem ergiebigeren Expressionssystem gesucht werden, da bereits zur Gewinnung der, für diese Arbeit benötigten BAFF-Menge 36 Liter Bakterienkultur hergestellt werden mussten. Bei der Frage der Inhibition könnte unter Umständen die Verwendung eines löslichen BAFF-R-Fc-Konstruktes eine Lösung bieten, da gezeigt werden konnte, dass dieser in der Neutralisation von endogenem BAFF bei der Maus zehnmal potenter wirkt als BCMA-Fc. Zurückgeführt wird dies auf die Tatsache, dass an das BAFF-Trimer mehrere Moleküle BAFF-R-Fc, aber nur ein Molekül BCMA-Fc binden können und zudem monovalentes BAFF-R-Fc im Gegensatz zu monovalentem BCMA-Fc in der Lage ist, mit BAFF stabile Komplexe auszubilden [149].

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass die funktionelle Überexpression von chBAFF zu einer Zunahme der peripheren B-Zellzahl führte, während die Neutralisation diese drastisch reduzierte. Für einen Einfluss von chBAFF auf die Antikörperproduktion spricht die signifikante Erhöhung der IgM-Menge nach Gabe von chBAFF. Um genauere Aussagen über die Auswirkungen des Zytokins auf die Immunglobulinspiegel und seine sich abzeichnende Funktion in der Bursa treffen zu können, bedarf es dagegen weiterer Untersuchungen. In ihrer Gesamtheit konnten die *in vivo* Studien jedoch einen eindeutigen biologischen Effekt von chBAFF auf den peripheren B-Zellpool zeigen.

### 6.2.5 ChBAFF als mögliches Adjuvans

Die kommende Umstellung von der Käfig- auf die Bodenhaltung wird die Geflügelhaltung künftig mit einer Vielzahl neuer gesundheitlicher Probleme konfrontieren, die durch das zunehmend enger werdende Spektrum beim Huhn einsetzbarer Therapeutika zusätzlich kompliziert werden dürften. Das Beispiel der Geflügelpest führt drastisch vor Augen, dass der Ausbruch von Krankheiten, abgesehen von der moralischen Fragwürdigkeit der Tötung von Millionen von Hühnern zur Verhinderung der Erregerübertragung, zu riesigen finanziellen Verlusten führen kann. Der Bedarf an effizienten Impfstoffen zum Schutz der Bestände wird daher stetig wachsen. Um eine ausreichende Immunantwort des Organismus auf möglichst geringe Mengen des verabreichten Antigens in einem Impfstoff zu erhalten, werden diesen seit langem sog. Adjuvantien zugesetzt [270, 271]. Da Zytokine physiologische Modulatoren der Immunantwort sind, stellte sich die Frage nach ihrer Verwendbarkeit als Adjuvans. Nachdem nun auch beim Huhn eine Vielzahl von Zytokinen charakterisiert wurde, aber trotz intensiver Suche potente und gut verträgliche Adjuvantien bislang kaum bekannt sind, wurden IFN- $\gamma$  und einige weitere Zytokine bereits auf ihren möglichen Einsatz hin getestet [272, 273], wobei in mehreren Fällen eine Erhöhung der spezifischen Antikörperantwort gezeigt werden konnte. Keines der eingesetzten Zytokine führt allerdings zur direkten Stimulation der Antikörperproduktion. Der durch die zusätzliche Gabe von chBAFF erzielte signifikante Anstieg der IgM-Spiegel im Serum eröffnet jedoch die Aussicht, mit diesem spezifisch auf B-Zellen wirkenden Zytokin ein wirklich potentes Adjuvans für das Huhn zur Verfügung zu haben. Für einen möglichen Einsatz in diesem Bereich spricht auch die bei der Maus nachgewiesene Erhöhung spezifischer Antikörpertiter nach Immunisierung und gleichzeitiger Gabe von BAFF. Betroffen waren hierbei sowohl die T-Zell abhängige als auch die T-Zell unabhängige Antikörperantwort [173]. Untersuchungen dieser Art müssen für das Huhn erst noch durchgeführt werden. Als Testsystem würde sich dafür die Impfung gegen Newcastle disease anbieten, da

ihre Effektivität u.a. durch den sehr gut etablierten Nachweis von Antikörpern gegen Neuraminidase mittels Hämagglutinations-Hemmungstest oder im ELISA überprüft werden kann [274] und die Erkrankung ein relevantes Problem im Feld darstellt. Zunächst würde eine Steigerung der spezifischen Antikörpertiter sicherlich durch gleichzeitige Gabe von Impfstoff und rekombinantem chBAFF untersucht werden. Da die Verwendung rekombinanten Proteins zwar für wissenschaftliche Fragestellungen möglich, für die praktische Anwendung aufgrund des enormen Aufwandes jedoch nicht anwendbar ist, müsste für einen erfolgreichen Einsatz als Adjuvans in weiteren Schritten die Suche nach einem passenden Vektor zur DNA-Vakzination erfolgen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit verständlicherweise nicht die gesamte Biologie des Zytokins geklärt werden konnte und damit einige Fragen zunächst unbeantwortet bleiben müssen. Mit der vorliegenden funktionellen und biochemischen Analyse von chBAFF konnte jedoch der Weg für eine Vielzahl weiterer Experimente zum besseren Verständnis der B-Zellentwicklung beim Huhn geebnet und eine Basis sowohl für die weitere wissenschaftliche Forschung als auch deren praktische Anwendung geschaffen werden. Von besonderem phylogenetischem Interesse wird in nächster Zeit sicher die genauere Charakterisierung des Einflusses von chBAFF auf die Bursa sein, da sich hier möglicherweise ein grundlegender Unterschied in der Funktion dieses hoch homologen Zytokins bei Säugern und Vögeln abzeichnet. Auf Seite der praktischen Anwendbarkeit werden Untersuchungen zu einem denkbaren Einsatz von chBAFF als Adjuvans folgen. Somit stellen die Arbeiten an chBAFF nicht nur die erste funktionelle Charakterisierung eines TNF-Familienmitglieds beim Huhn dar, sondern bilden ein Bindeglied zwischen molekularbiologischer Forschung und tiermedizinischer Anwendung.

## 7 Zusammenfassung

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete die Identifizierung der cDNA-Sequenz eines aviären Homologes zum „B cell activating factor belonging to the TNF family“ (BAFF) des Säugers in einer Hühner EST-Datenbank. Diese cDNA-Sequenz kodiert für den kompletten offenen Leserahmen von chBAFF und enthält neben einer Transmembrandomäne auch eine mögliche Furin-Schnittstelle. Mit einer Aminosäuren-Identität von 76% zwischen chBAFF und dem humanen BAFF weist es eine bedeutend höhere Homologie auf als andere bekannte Hühner-Zytokine. Zur biochemischen und funktionellen Charakterisierung des Zytokins wurde dieses in rekombinanter Form sowohl prokaryotisch in *E.coli* als auch eukaryotisch in 293T Zellen exprimiert. Das prokaryotisch exprimierte His-chBAFF wurde zur Gewinnung eines polyklonalen Kaninchen-Antiserums verwendet. Die daraus gereinigte IgG-Fraktion ermöglicht den Nachweis von pro- und eukaryotisch exprimiertem Zytokin und wurde zur Quantifizierung von chBAFF im ELISA herangezogen. Northern Blot Studien zeigten eine schwache chBAFF-Expression in der Milz und ein starkes Expressionssignal in der Bursa Fabricii, während alle weiteren getesteten Gewebe, wie Thymus und Darm, negativ waren. In der *in situ* Hybridisierung wies die mRNA für chBAFF ein breites Verteilungsmuster über das gesamte Organ auf, wobei in der Follikelmedulla eine verstärkte Expression detektiert werden konnte. Aufgrund der vorliegenden Daten sind daher als Quelle für das Zytokin sowohl bursa- le B-Zellen als auch Stromazellen in Betracht zu ziehen. Zur Identifikation der Zielzellen des Zytokins wurde die Expression der chBAFF-Rezeptor(en) in durchflusszytometrischen Bindungsstudien mit Flag-chBAFF analysiert. Hierbei konnten Rezeptoren für chBAFF ausschließlich auf B-Zellen nachgewiesen werden und zwar sowohl auf reifen B-Zellen aus peripheren lymphatischen Organen als auch auf den unreifen B-Zellen der Bursa. Nachfolgende Studien zur Rezeptorontogenese ergaben eine deutliche positive Korrelation zwischen der Expression des Zytokinrezeptors und derjenigen des B-Zellrezeptors in der embryonalen Bursa. Im Rezeptor-Ligand-Interaktions-ELISA konnte ebenso wie durch Ko-Immuno- präzipitation eine Bindung von chBAFF an alle drei bislang bekannten BAFF-Rezeptoren des Säugers gezeigt werden. Von besonderer Bedeutung war hierbei, dass die chBAFF-Bindung an die Hühner-B-Zelllinie DT40 durch eine lösliche Variante des humanen BAFF-Rezeptors BCMA (huBCMA-Fc) blockiert werden konnte.

Der Zusatz von eukaryotisch exprimiertem chBAFF zu Kulturen aus Milzlymphozyten führte zu einem signifikanten Anstieg der Zahl lebender B-Zellen. Dieser dosisabhängige Effekt war auch in Lymphozytenkulturen aus Caecaltonsillen und in Kulturen gereinigter (>95%) B-

Zellpräparationen aus der Milz zu beobachten. Die rasche Apoptose bursaler Lymphozyten in Kultur konnte zwar nicht gänzlich verhindert werden, die Supplementierung von chBAFF führte aber auch in Kulturen dieser unreifen B-Zellen zu einer deutlichen Zunahme der Viabilität. Anschließende Experimente mit CFSE markierten Zellen ergaben, dass chBAFF nicht zur Proliferation der B-Zellen führt. Die nachgewiesenen Effekte werden folglich mit großer Wahrscheinlichkeit durch die potente Inhibition der Apoptose der B-Zellen verursacht.

Die Zellkulturarbeiten konnten durch *in vivo* Studien mit gereinigtem prokaryotischem chBAFF bestätigt werden. Die tägliche Injektion des rekombinanten Zytokins über sieben Tage hinweg induzierte dabei eine signifikante Zunahme von Milzgewicht und B-Zellfrequenz in Milz und Caecaltonsillen. Zusätzlich kam es durch die funktionelle chBAFF-Überexpression zu einem signifikanten (4-fachen) Anstieg der IgM-Serumspiegel. Somit scheint chBAFF nicht nur die Zahl der B-Zellen zu beeinflussen, sondern auch deren Differenzierung zu Antikörper sekretierenden Zellen. Da durch die Supplementierung des Zytokins keine Effekte auf die Bursa erzielt werden konnten, wurde nachfolgend der umgekehrte experimentelle Ansatz gewählt und endogenes chBAFF bei frisch geschlüpften Küken fünf Tage lang durch die tägliche i.p. Injektion von huBCMA-Fc neutralisiert. Dieser funktionelle Knockdown führte zur Abnahme des Milzgewichts und einer drastischen Reduktion der B-Zellfrequenz in Milz und Caecaltonsillen. Zudem konnte eine Verringerung der Bursagewichte beobachtet werden. Dieser Befund, sowie die vorrangige chBAFF-mRNA-Expression in der Bursa und die Expression seiner Rezeptoren auf bursalen B-Zellen, deuten zusammengenommen auf eine bislang unbekannte Rolle von BAFF in der frühen B-Zellentwicklung hin.

## 8 Summary

### **Charakterization of chBAFF as an important regulator of B-cell function in the chicken.**

This investigation is based on the identification of cDNA sequence information for a putative chicken homologue of the mammalian cytokine “B cell activating factor belonging to the TNF family” (BAFF) in a chicken EST-database. The cDNAs encoded for the complete open reading frame of chicken BAFF (chBAFF) including a transmembrane domain and a potential furine cleavage site. ChBAFF shows an uncommon high amino-acid sequence identity with 76% identity to human BAFF in comparison with other chicken cytokines. To investigate its biochemical and functional properties, recombinant prokaryotic chBAFF was generated in *E. coli* and eukaryotic chBAFF was obtained from transfected 293T cells. A polyclonal rabbit antiserum raised against His-chBAFF reacted with both, the prokaryotic and the eukaryotic cytokine and was used to quantify 293T cell derived chBAFF in an ELISA system.

Studies by northern blot analysis revealed a strong expression signal in the Bursa of Fabricius and a weak signal in the spleen, while all other tissues including thymus and gut tissue were negative. *In situ* hybridisation detected a wide distribution pattern for chBAFF-mRNA in all areas of the bursa of Fabricius. However, the strongest expression was seen in the medulla from bursal follicles. These studies indicate that both the bursal stroma and bursal B-cells must be considered as potential sources for chBAFF. To identify target cells for this cytokine, chBAFF receptor(s) expression was investigated in binding studies with Flag tagged chBAFF (Flag-chBAFF) and binding was analysed by flow cytometry. Receptor expression was clearly restricted to B-cells including mature B-cells from peripheral lymphoid organs as well as immature bursal B-cells. Subsequent studies on the ontogeny of chBAFF receptor expression showed a positive correlation between the cytokine receptor expression and the expression of the B-cell antigen receptor in the developing embryonic bursa.

Receptor-ligand-interaction ELISA and co-immunoprecipitation experiments demonstrated that chBAFF binds to all three mammalian BAFF receptors identified thus far. Importantly, studies of chBAFF binding to the chicken B-cell line DT40 showed that an engineered soluble form of the human BAFF-receptor BCMA (huBCMA-Fc) inhibited chBAFF binding.

The addition of 293T cell derived chBAFF to splenic lymphocyte cultures led to a significant increase in B-cell viability. This dose-dependent effect was also observed in lymphocyte cultures from ceecal tonsils and in cultures of purified (>95%) splenic B-cell preparations. While



the rapid apoptosis in cultures of bursal lymphocytes could not be completely prevented, chBAFF clearly increased the survival of these immature B-cells. CFSE labelling experiments further showed that chBAFF did not induce B-cell proliferation. Therefore, it is highly probable that chBAFF, as its mammalian counterpart, is a potent inhibitor of B-cell apoptosis.

These *in vitro* studies were complemented by *in vivo* experiments with purified prokaryotic chBAFF. Daily injection of recombinant cytokine for 7 days induced a significant increase in spleen weight and B-cell frequency in spleen and caecal tonsils. Besides, the functional over-expression of chBAFF induced significantly (4-fold) increased serum IgM levels. Therefore, chBAFF does not only increase B cell numbers, it also influences their differentiation to antibody secreting cells. However, no effect was observed on the bursa of Fabricius prompting the reverse experimental approach. With the availability of a soluble cytokine specific receptor (huBCMA-Fc) *in vivo* knockdown studies could be performed. Daily i.p. application of huBCMA-Fc to newly hatched birds for 5 days led to decreased spleen weights and drastically reduced the B-cell frequency in spleens and caecal tonsils. In addition, bursal weights in treated birds were lower than in untreated controls. This experiment in combination with the observation of high expression levels of chBAFF-mRNA in the bursa and functional BAFF-receptor(s) on bursal B-cells strongly indicated a thus far unknown role for BAFF in early B-cell development.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Glick, B., *How it all began: the continuing story of the Bursa of fabricius*, in *Avian Immunology: Basis and Practice*, P. Toivanen, Editor. 1987, CRC Press, Inc.: Boca Raton, Florida. p. 1-8.
2. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl*. *Poult Sci*, 1956(35): p. 224ff.
3. 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.
4. Mitchell, G.F. and J.F. Miller, *Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes*. *J Exp Med*, 1968. **128**(4): p. 821-37.
5. Miller, J.F. and G.F. Mitchell, *Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes*. *J Exp Med*, 1968. **128**(4): p. 801-20.
6. White, R.G., *The structural organization of avian lymphoid tissues*, in *Avian Immunology*, B.M. Freeman, Editor. 1981, British Poultry Science, Ltd.: Edinburgh. p. 21ff.
7. Janeway, C., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Fifth Edition ed. 2001: Current Biology Publications / Garland Publishing.
8. Ratcliffe, M.J., *The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius*. *Immunology Today*, 1985. **6**(7): p. 223-27.
9. Dieterlen-Lievre, F. and C. Martin, *Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development*. *Dev Biol*, 1981. **88**(1): p. 180-91.
10. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development*. *Semin Immunol*, 1994. **6**(3): p. 175-84.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Masteller, E.L., et al., *Avian B cell development*. *Int Rev Immunol*, 1997. **15**(3-4): p. 185-206.
17. Otsubo, Y., et al., *Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius*. *Dev Comp Immunol*, 2001. **25**(5-6): p. 485-93.

18. 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.
19. Glick, B., *The influence of dipping eggs in male hormone solutions on lymphatic tissue and antibody response of chickens*. Endocrinology, 1961. **69**: p. 984-5.
20. Nagy, N., et al., *Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of fabricius of the guinea fowl (Numida meleagris) studied by novel monoclonal antibodies*. Anat Rec, 2001. **262**(3): p. 279-92.
21. Jalkanen, S., et al., *Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hours of incubation: failure to produce immune, natural, and autoantibodies in spite of immunoglobulin production*. Cell Immunol, 1983. **80**(2): p. 363-73.
22. Eerola, E., et al., *Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hours of incubation: mitogen-induced cell proliferation and immunoglobulin secretion*. J Immunol, 1983. **131**(1): p. 120-4.
23. Cooper, M.D., et al., *Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1969. **35**(3): p. 242-52.
24. Lerman, S.P. and W.P. Weidanz, *The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens*. J Immunol, 1970. **105**(3): p. 614-9.
25. Moriya, C., *Review of studies on the immunological capacity in the bursectomized chick*. Vet Immunol Immunopathol, 1987. **16**(1-2): p. 77-84.
26. 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.
27. Varki, A., *Selectin ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7390-7.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
33. Ratcliffe, M.J. and L. Tkalec, *Cross-linking of the surface immunoglobulin on lymphocytes from the bursa of Fabricius results in second messenger generation*. Eur J Immunol, 1990. **20**(5): p. 1073-8.
34. Sayegh, C.E., M.A. Rao, and M.J. Ratcliffe, *Avian B cell development: lessons from transgenic models*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 31-7.
35. Weigert, M., et al., *The joining of V and J gene segments creates antibody diversity*. Nature, 1980. **283**(5746): p. 497-9.

36. Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu, *Development of the immunoglobulin repertoire*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(1): p. 1-14.
37. Grant, J.A., B. Sanders, and L. Hood, *Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian lambda chains*. Biochemistry, 1971. **10**(16): p. 3123-32.
38. 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.
39. 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.
40. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
41. Reynaud, C.A., et al., *Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion*. Adv Immunol, 1994. **57**: p. 353-78.
42. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 548-58.
43. Flajnik, M.F., *Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 688-98.
44. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
45. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5478-86.
46. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
47. Reynaud, C.A., et al., *Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process*. Cell, 1995. **80**(1): p. 115-25.
48. 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.
49. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 647-59.
50. Weinstein, P.D., R.G. Mage, and A.O. Anderson, *The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit*. Adv Exp Med Biol, 1994. **355**: p. 249-53.
51. Bucy, R.P., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Ontogeny of T cell receptors in the chicken thymus*. J Immunol, 1990. **144**(4): p. 1161-8.
52. Chen, C.L., R.P. Bucy, and M.D. Cooper, *T cell differentiation in birds*. Semin Immunol, 1990. **2**(1): p. 79-86.
53. 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. 503-7.

54. Ekino, S., et al., *Role of environmental antigen in the development of IgG<sup>+</sup> cells in the bursa of fabricius*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4551-8.
55. Sorvari, R. and T.E. 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 importance*. Immunology, 1977. **32**(4): p. 499-505.
56. Sorvari, T., et al., *Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius*. Nature, 1975. **253**(5488): p. 217-9.
57. Ekino, S., et al., *Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1980. **58**(3): p. 289-96.
58. 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. 772-5.
59. Yasuda, M., et al., *A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken*. Anat Rec, 2002. **266**(4): p. 207-17.
60. 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. 1951-8.
61. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
62. 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.
63. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
64. 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.
65. 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. 223-8.
66. Jacobsen, K.A., et al., *Apoptotic cell Death in the chicken Bursa of Fabricius*, in *Mechanisms of Lymphocyte activation and Immune Regulation*, G.a. Cohen, Editor. 1996, Plenum Press: New York. p. 155-165.
67. Asakawa, J., V.K. Tsiagbe, and G.J. Thorbecke, *Protection against apoptosis in chicken bursa cells by phorbol ester in vitro*. Cell Immunol, 1993. **147**(1): p. 180-7.
68. Neiman, P.E., S.J. Thomas, and G. Loring, *Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5857-61.
69. Nowak, J.S., O. Vainio, and O. Lassila, *In vitro organ culture of embryonic bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 1990. **14**(2): p. 239-46.
70. Cory, S., *Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 513-43.
71. Eguchi, Y., D.L. Ewert, and Y. Tsujimoto, *Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(16): p. 4187-92.

72. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: II. Accumulation of apoptotic cells within the germinal center*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(2): p. 215-21.
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. Funk, P.E., et al., *The avian chB6 (Bu-1) alloantigen can mediate rapid cell death*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1695-702.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Ekino, S., K. Matsuno, and M. Kotani, *Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii*. Lymphology, 1979. **12**(4): p. 247-52.
79. 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.
80. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Survivors of bursal B cell production and emigration*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 991-7.
81. Jalkanen, S., et al., *Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hr of incubation: surface immunoglobulin and B-L (La-like) antigen-bearing cells*. J Immunol, 1983. **130**(5): p. 2038-41.
82. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, *Maturation of the immune response in germinal centers*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1121-9.
83. MacLennan, I.C. and D. Gray, *Antigen-driven selection of virgin and memory B cells*. Immunol Rev, 1986. **91**: p. 61-85.
84. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 159-66.
85. Toivanen, A., et al., *Ontogeny of the chicken lymphoid system*, in *Avian Immunology*, B.M. Freeman, Editor. 1981, British Poultry Science Ltd.: Edinburgh. p. 45 ff.
86. Namikawa, R., et al., *Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen*. Immunology, 1986. **57**(1): p. 61-9.
87. White, R.G., et al., *Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre*. Immunology, 1975. **28**(1): p. 1-21.
88. Burns, R.B., *Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus)*. Res Vet Sci, 1982. **32**(3): p. 359-67.
89. Olah, I., B. Glick, and R.L. Taylor, Jr., *Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken*. Anat Rec, 1984. **208**(2): p. 253-63.
90. Olah, I., et al., *Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ*. Poult Sci, 2003. **82**(5): p. 767-70.

91. Mansikka, A., et al., *B cell maturation in the chicken Harderian gland*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1826-33.
92. Baba, T., et al., *Harderian gland dependency of immunoglobulin A production in the lacrimal fluid of chicken*. Immunology, 1988. **65**(1): p. 67-71.
93. Albin, B., et al., *Immunoglobulin production in chicken Harderian glands*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1974. **47**(1): p. 23-34.
94. Neuberger, M.S., et al., *Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation*. Immunol Rev, 1998. **162**: p. 107-16.
95. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. Embo J, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
96. Tizard, I., *The Avian Antibody Response*. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 2002. **11**(1(January)): p. 2-12.
97. Higgins, D.A., *Fractionation of fowl immunoglobulins*. Res Vet Sci, 1976. **21**(1): p. 94-9.
98. Schraner, I. and U. Losch, *Immunological identification of avian monomeric and polymeric immunoglobulin M and immunoglobulin A after fractionation on sodium dodecylsulfate pore gradient polyacrylamide gels*. Poult Sci, 1986. **65**(2): p. 360-8.
99. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
100. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken*. J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1337-52.
101. Hadge, D. and H. Ambrosius, *Evolution of low molecular weight immunoglobulins. V. Degree of antigenic relationship between the 7S immunoglobulins of mammals, birds, and lower vertebrates to the turkey IgY*. Dev Comp Immunol, 1986. **10**(3): p. 377-85.
102. Hadge, D. and H. Ambrosius, *Evolution of low molecular weight immunoglobulins--IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA*. Mol Immunol, 1984. **21**(8): p. 699-707.
103. Mansikka, A., *Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 855-61.
104. Muir, W.I., W.L. Bryden, and A.J. Husband, *Investigation of the site of precursors for IgA-producing cells in the chicken intestine*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(3): p. 294-6.
105. Muir, W.I., W.L. Bryden, and A.J. Husband, *Immunity, vaccination and the avian intestinal tract*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 325-42.
106. 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.
107. Losch, U., et al., *The chicken egg, an antibody source*. Zentralbl Veterinarmed B, 1986. **33**(8): p. 609-19.
108. StPierre, R.L. and G.A. Ackerman, *Bursa of Fabricius in chickens: Possible humoral factor*. Science, 1965(147): p. 1307ff.
109. Obranovich, T.D. and R.L. Boyd, *A bursal stromal derived cytokine induces proliferation of MHC class II bearing cells*. Dev Comp Immunol, 1996. **20**(1): p. 61-75.

110. Kulkarni, A.B., T. Thyagarajan, and J.J. Letterio, *Function of cytokines within the TGF-beta superfamily as determined from transgenic and gene knockout studies in mice*. *Curr Mol Med*, 2002. **2**(3): p. 303-27.
111. Iwasato, T., et al., *Transforming growth factor-beta induced class switch recombination may be modified during the cell proliferation restored by IL-2 stimulation*. *Immunol Lett*, 1994. **39**(2): p. 173-8.
112. van Vlasselaer, P., J. Punnonen, and J.E. de Vries, *Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells*. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2062-7.
113. Horn, F., C. Henze, and K. Heidrich, *Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function*. *Immunobiology*, 2000. **202**(2): p. 151-67.
114. Schneider, K., et al., *Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(15): p. 4200-6.
115. Plas, D.R., J.C. Rathmell, and C.B. Thompson, *Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 515-21.
116. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. *J Exp Med*, 1999. **189**(11): p. 1747-56.
117. Moore, P.A., et al., *BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 260-3.
118. Shu, H.B., W.H. Hu, and H. Johnson, *TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(5): p. 680-3.
119. Mukhopadhyay, A., et al., *Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 15978-81.
120. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. *Nature*, 2000. **404**(6781): p. 995-9.
121. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
122. Aggarwal, B.B., B. Moffat, and R.N. Harkins, *Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(1): p. 686-91.
123. Kelker, H.C., et al., *Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin*. *Int J Cancer*, 1985. **36**(1): p. 69-73.
124. Aggarwal, B.B., et al., *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(4): p. 2345-54.
125. Smith, C.A., T. Farrar, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. *Cell*, 1994. **76**(6): p. 959-62.
126. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
127. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 411-52.
128. De Togni, P., et al., *Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin*. *Science*, 1994. **264**(5159): p. 703-7.



129. Koni, P.A., et al., *Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 491-500.
130. Amakawa, R., et al., *Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice*. Cell, 1996. **84**(4): p. 551-62.
131. Russell, J.H., et al., *Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4409-13.
132. Zheng, L., et al., *Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 348-51.
133. Schneider, P., et al., *Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18827-33.
134. van Kooten, C. and J. Banchereau, *Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 330-7.
135. Stuber, E. and W. Strober, *The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 979-89.
136. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
137. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
138. Hahne, M., et al., *APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1185-90.
139. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
140. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
141. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
142. Kanda, H., et al., *Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28372-5.
143. Igaki, T., et al., *Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway*. Embo J, 2002. **21**(12): p. 3009-18.
144. Karpusas, M., et al., *Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes*. J Mol Biol, 2002. **315**(5): p. 1145-54.
145. Oren, D.A., et al., *Structural basis of BLyS receptor recognition*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(4): p. 288-92.
146. Liu, Y., et al., *Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands*. Cell, 2002. **108**(3): p. 383-94.
147. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
148. Zhukovsky, E.A., et al., *TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster?* Nature, 2004. **427**(6973): p. 413-4; discussion 414.

149. Pelletier, M., et al., *Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33127-33.
150. Gavin, A.L., et al., *DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38220-8.
151. Marsters, S.A., et al., *Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI*. Curr Biol, 2000. **10**(13): p. 785-8.
152. Laabi, Y., et al., *A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma*. Embo J, 1992. **11**(11): p. 3897-904.
153. Wu, Y., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35478-85.
154. Yan, M., et al., *Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 37-41.
155. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
156. Wilson-Rawls, J., S.L. Deutscher, and W.S. Wold, *The signal-anchor domain of adenovirus E3-6.7K, a type III integral membrane protein, can direct adenovirus E3-gp19K, a type I integral membrane protein, into the membrane of the endoplasmic reticulum*. Virology, 1994. **201**(1): p. 66-76.
157. Gras, M.P., et al., *BCMAP: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes*. Int Immunol, 1995. **7**(7): p. 1093-106.
158. Schneider, P., et al., *Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1691-7.
159. Kayagaki, N., et al., *BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 515-24.
160. Yan, M., et al., *Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1547-52.
161. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
162. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
163. Claudio, E., et al., *BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 958-65.
164. Caamano, J.H., et al., *Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses*. J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 185-96.
165. Gugasyan, R., et al., *Rel/NF-kappaB transcription factors: key mediators of B-cell activation*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 134-40.

166. Arch, R.H., R.W. Gedrich, and C.B. Thompson, *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death*. *Genes Dev*, 1998. **12**(18): p. 2821-30.
167. Darnay, B.G., et al., *Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 7724-31.
168. McWhirter, S.M., et al., *Structural and biochemical analysis of signal transduction by the TRAF family of adapter proteins*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1999. **64**: p. 551-62.
169. Caamano, J. and C.A. Hunter, *NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(3): p. 414-29.
170. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
171. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. *J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1453-66.
172. Xu, L.G. and H.B. Shu, *TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production*. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 6883-9.
173. Do, R.K., et al., *Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 953-64.
174. Amanna, I.J., et al., *Cutting edge: A/WySnJ transitional B cells overexpress the chromosome 15 proapoptotic Blk gene and succumb to premature apoptosis*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6069-72.
175. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. *J Exp Med*, 1999. **190**(1): p. 75-89.
176. Allman, D., et al., *Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 6834-40.
177. Rolink, A.G., J. Andersson, and F. Melchers, *Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(11): p. 3738-48.
178. Osmond, D.G., A. Rolink, and F. Melchers, *Murine B lymphopoiesis: towards a unified model*. *Immunol Today*, 1998. **19**(2): p. 65-8.
179. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(5): p. 323-35.
180. Berland, R. and H.H. Wortis, *Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 253-300.
181. Gross, J.A., et al., *TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS*. *Immunity*, 2001. **15**(2): p. 289-302.
182. Hsu, B.L., et al., *Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 5993-6.

183. Thompson, J.S., et al., *BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population*. J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 129-35.
184. Rolink, A.G. and F. Melchers, *BAFFled B cells survive and thrive: roles of BAFF in B-cell development*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 266-75.
185. Rolink, A.G., et al., *BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 2004-10.
186. Khare, S.D., et al., *Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3370-5.
187. Yu, G., et al., *APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 252-6.
188. Vora, K.A., et al., *Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 547-51.
189. Rahman, Z.S., et al., *Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1157-69.
190. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
191. Tew, J.G., et al., *Follicular dendritic cells as accessory cells*. Immunol Rev, 1990. **117**: p. 185-211.
192. Iizuka, K., et al., *Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6336-40.
193. Wu, Q., et al., *The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues*. J Exp Med, 1999. **190**(5): p. 629-38.
194. Fu, Y.X. and D.D. Chaplin, *Development and maturation of secondary lymphoid tissues*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 399-433.
195. Avery, D.T., et al., *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 286-97.
196. Urashima, M., et al., *CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma*. Blood, 1995. **85**(7): p. 1903-12.
197. Tarte, K., et al., *Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1113-22.
198. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
199. Stavnezer, J., *Antibody class switching*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 79-146.
200. Fagarasan, S. and T. Honjo, *T-Independent immune response: new aspects of B cell biology*. Science, 2000. **290**(5489): p. 89-92.
201. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
202. Armitage, R.J., et al., *IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 483-90.
203. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.

204. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. Blood, 2001. **97**(1): p. 198-204.
205. Scapini, P., et al., *G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS*. J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 297-302.
206. Gorelik, L., et al., *Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 937-45.
207. Cyster, J.G., et al., *Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 181-93.
208. Gorelik, L., et al., *Cutting Edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 762-6.
209. Goodnow, C.C., et al., *Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development*. Adv Immunol, 1995. **59**: p. 279-368.
210. Groom, J., et al., *Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 59-68.
211. Zhang, J., et al., *Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 6-10.
212. Lam, K.P., R. Kuhn, and K. Rajewsky, *In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1073-83.
213. Neuberger, M.S., *Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life*. Cell, 1997. **90**(6): p. 971-3.
214. Rolink, A.G., F. Melchers, and J. Andersson, *The transition from immature to mature B cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 39-43; discussion 44.
215. Bannish, G., et al., *Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1583-96.
216. Cheema, G.S., et al., *Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1313-9.
217. Huard, B., et al., *T cell costimulation by the TNF ligand BAFF*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6225-31.
218. Seshasayee, D., et al., *Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 279-88.
219. Martin, A., et al., *Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection*. Poult Sci, 1993. **72**(11): p. 2084-94.
220. DuBridges, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
221. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
222. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. Virology, 1985. **144**(1): p. 139-51.
223. Nazerian, K., *An updated listing of avian cell lines and transplantable tumors*. Avian Pathology, 1991(16): p. 527-545.

224. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma*. J Immunol Methods, 2003. **274**(1-2): p. 229-32.
225. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
226. Erhard, M.H., et al., *Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies*. Poult Sci, 1992. **71**(2): p. 302-10.
227. Veromaa, T., et al., *Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens*. Hybridoma, 1988. **7**(1): p. 41-8.
228. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 375-80.
229. Luhtala, M., et al., *Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species*. Hybridoma, 1993. **12**(6): p. 633-46.
230. Luhtala, M., et al., *Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes*. Scand J Immunol, 1995. **42**(1): p. 171-4.
231. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 315-22.
232. Cihak, J., et al., *Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens*. Eur J Immunol, 1988. **18**(4): p. 533-7.
233. Char, D., et al., *A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3547-55.
234. Weining, K.C., et al., *Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2440-7.
235. Schneider, P., *Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins*. Methods Enzymol, 2000. **322**: p. 325-45.
236. Glick, B., *Bursa of Fabricius: Development, Growth, Modulation and Endocrine Function*, in *Critical Reviews in Poultry Biology*. 1988. p. 107-32.
237. Langman, R.E. and M. Cohn, *A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit*. Res Immunol, 1993. **144**(6-7): p. 422-46.
238. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 219-41.
239. Ewert, D.L., B.O. Barger, and C.S. Eidson, *Local antibody response in chickens: analysis of antibody synthesis to Newcastle disease virus by solid-phase radioimmunoassay and immunofluorescence with class-specific antibody for chicken immunoglobulins*. Infect Immun, 1979. **24**(1): p. 269-75.
240. Pitcovski, J., et al., *Immune response and resistance to infectious bursal disease virus of chicken lines selected for high or low antibody response to Escherichia coli*. Poult Sci, 2001. **80**(7): p. 879-84.

241. Smith, E.J., L. Shi, and G. Smith, *Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old white leghorn whole-embryo cDNA library. 3. DNA sequence analysis of genetic variation in commercial chicken populations.* Genome, 2002. **45**(2): p. 261-7.
242. Abdrakhmanov, I., et al., *A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function.* Genome Res, 2000. **10**(12): p. 2062-9.
243. Gobel, T.W., et al., *IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species.* J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1809-15.
244. Staeheli, P., et al., *Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 993-1010.
245. Schneider, K., et al., *cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18.* J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(10): p. 879-83.
246. Pechumer, H., et al., *Recovery of monocytes after bone marrow transplantation--rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production.* Transplantation, 1991. **52**(4): p. 698-704.
247. Foster, D., et al., *Cytokine-receptor pairing: Accelerating discovery of cytokine function.* Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(2): p. 160-170.
248. Tanaka, T., et al., *Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis.* Embo J, 2002. **21**(7): p. 1695-703.
249. Hillman, K.A., et al., *Chicken DT40 cells stably transfected with the rat P2X7 receptor ion channel: a system suitable for the study of purine receptor-mediated cell death.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(3): p. 415-24.
250. Arakawa, H., et al., *Effect of environmental antigens on the Ig diversification and the selection of productive V-J joints in the bursa.* J Immunol, 2002. **169**(2): p. 818-28.
251. Koskela, K., et al., *Insight into lymphoid development by gene expression profiling of avian B cells.* Immunogenetics, 2003. **55**(6): p. 412-22.
252. 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.
253. Gomez Del Moral, M., et al., *Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (Gallus gallus) caecal tonsil.* Anat Rec, 1998. **250**(2): p. 182-9.
254. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory".* Immunol Rev, 2000. **175**: p. 70-9.
255. Do, R.K. and S. Chen-Kiang, *Mechanism of BLyS action in B cell immunity.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(1): p. 19-25.
256. Haugland, R.P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.* Ninth Edition ed. 2003: Molecular Probes.
257. Compton, M.M. and J.K. Wickliffe, *Multiparametric assessment of bursal lymphocyte apoptosis.* Dev Comp Immunol, 1999. **23**(6): p. 487-500.
258. Hofmann, A., et al., *Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors.* EMBO Rep, 2003. **4**(11): p. 1054-60.

259. Denning, C., et al., *Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(6): p. 559-62.
260. Cihak, J., et al., *In vivo depletion of chicken T-cell subsets*. Scand J Immunol, 1993. **38**(2): p. 123-9.
261. Nakchbandi, I.A., et al., *Circulating levels of interleukin-6 soluble receptor predict rates of bone loss in patients with primary hyperparathyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 4946-51.
262. Duzgun, N., et al., *Cytokine inhibitors: soluble tumor necrosis factor receptor 1 and interleukin-1 receptor antagonist in Behcet's disease*. Rheumatol Int, 2003.
263. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
264. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
265. Song, E., et al., *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 347-51.
266. McCaffrey, A.P., et al., *RNA interference in adult mice*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 38-9.
267. Hilton, L.S., et al., *Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells in vivo*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(7): p. 755-63.
268. Gonchoroff, N.J., et al., *S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment*. J Immunol Methods, 1986. **93**(1): p. 97-101.
269. Rose, M.E. and E. Orlans, *Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick*. Dev Comp Immunol, 1981. **5**(1): p. 15-20.
270. Degen, W.G., T. Jansen, and V.E. Schijns, *Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications*. Expert Rev Vaccines, 2003. **2**(2): p. 327-35.
271. Schijns, V.E., *Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants*. Vaccine, 2003. **21**(9-10): p. 829-31.
272. Min, W., et al., *Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against Eimeria acervulina*. Vaccine, 2001. **20**(1-2): p. 267-74.
273. Lowenthal, J.W., et al., *Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(8): p. 617-22.
274. Brown, J., R.S. Resurreccion, and T.G. Dickson, *The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease*. Avian Dis, 1990. **34**(3): p. 585-7.



## Anhang

### A) Verwendete Chemikalien und Reagenzien

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

- 1 AppliChem, Darmstadt
- 2 Amersham Pharmacia, Freiburg
- 3 Ratiopharm, Ulm
- 4 Biochrom, Berlin
- 5 Sigma, Deisenhofen
- 6 Fluka, Buchs, Ch
- 7 Invitrogen, Karlsruhe
- 8 Merck, Darmstadt
- 9 Bio-Rad, München
- 10 Whatman, Maidstone, GB
- 11 Roche Diagnostics, Mannheim
- 12 Roth, Karlsruhe
- 13 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- 14 Serva, Heidelberg
- 15 Schleicher und Schuell, Dassel
- 16 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 17 Miltenyi, Bergisch Gladbach
- 18 Molecular Probes, Inc., Oregon, USA
- 19 Qiagen, Hilden
- 20 Braun, Melsungen
- 21 DakoCyomation GmbH, Hamburg
- 22 Stratagene, Heidelberg
- 23 Kodak, Stuttgart
- 24 Invitrogen, Karlsruhe
- 25 Bioprocessing Ltd, Consett, UK
- 26 Biontex, München

**B) Geräte in alphabetischer Reihenfolge**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Durchflusszytometer	FACScan Software: CellQuest, WinM- DI 2.8	Becton Dickinson, Heidel- berg
Elektroblotter	Multiphor II	LKB Pharmacia
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Gel Dokumentation	Gel Doc 2000 Software: Quantity One 4.1.1	BioRad, München
Hybridisierungsschrank	BFD	WTB Binder, Tuttlingen
Kryostat	2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz- Küvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, He- chingen
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	BioRad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Ultraschallgerät	Sonoplus GM 200	Bandelin, Berlin
Vakuumentrifuge	Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

## Danksagung

---

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. B. Kaspers, dass ich diese Arbeit in seinem Labor anfertigen durfte. Seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung trug nicht nur wesentlich zu ihrem Gelingen bei sondern war in der Lage, mir Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu vermitteln.

Prof. Dr. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Bei Prof. Dr. T. Göbel, Dr. Kirsten Schneider, Prof. Dr. P. Staeheli und Dr. Pascal Schneider möchte ich mich für die enge wissenschaftliche Kooperation bedanken.

Beatrice Schaerer und Ingrid Riehl möchte ich für die exzellente technische Unterstützung danken.

Bei Grammatia Dalamani möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung immunhistologischer Färbungen bedanken.

Allen Labormitgliedern möchte ich mich für das freundlich Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

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

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und dafür, dass sie mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Thomas Hirschmann bedanken, der mich während der ganzen Zeit unterstützt, aufgemuntert und motiviert hat.