

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

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

# **Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L, IL-6 und IL-10 auf die terminale Differenzierung der B-Lymphozyten des Haushuhns**

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

von  
Magdalena Schumacher  
aus Weilheim an der Teck

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Wenn die Menschen nur über das sprächen, was sie begreifen,  
dann würde es sehr still auf der Welt sein.

*Albert Einstein*

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....		IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....		VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....		X
TABELLENVERZEICHNIS.....		XII
<b>1</b>	<b>  <b>EINLEITUNG</b> .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>  <b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....</b>	<b>3</b>
2.1	<b>  <b>ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM BEIM SÄUGER</b></b> .....	<b>3</b>
2.2	<b>  <b>ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM BEIM HUHN</b></b> .....	<b>4</b>
2.2.1	<b>  <i>Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn</i></b> .....	<b>5</b>
2.2.1.1	Prä-bursale Phase.....	7
2.2.1.2	Bursale Phase .....	7
2.2.1.3	Post-bursale Phase .....	8
2.2.1.4	Regulation der B-Zellentwicklung beim Huhn .....	9
2.3	<b>  <b>DAS CD40-CD40L-SYSTEM</b></b> .....	<b>9</b>
2.3.1	<b>  <i>Die TNF-Familie</i></b> .....	<b>9</b>
2.3.2	<b>  <i>Das CD40-CD40L-System</i></b> .....	<b>11</b>
2.3.2.1	CD40.....	12
2.3.2.2	CD40L .....	13
2.3.2.3	CD40-Signaltransduktion.....	15
2.3.2.4	Funktionen im Säuger .....	19
2.3.2.4.1	Rolle in der Aktivierung von B-Zellen .....	21
2.3.2.4.2	Bildung und Erhaltung germinaler Zentren.....	22
2.3.2.5	Einfluss des CD40-CD40L-Systems auf Transkriptomebene .....	31
2.3.2.6	CD40-CD40L im Huhn .....	40
2.4	<b>  <b>KOSTIMULATORISCHE MOLEKÜLE</b></b> .....	<b>42</b>
2.5	<b>  <b>INTERLEUKIN 10</b></b> .....	<b>44</b>
2.5.1	<b>  <i>Struktur</i></b> .....	<b>44</b>
2.5.2	<b>  <i>IL-10-Signaltransduktion</i></b> .....	<b>44</b>
2.5.3	<b>  <i>Funktionen im Säuger</i></b> .....	<b>46</b>
2.5.3.1	Einfluss auf B-Lymphozyten .....	47
2.5.4	<b>  <i>Interleukin 10 im Huhn</i></b> .....	<b>49</b>
2.6	<b>  <b>INTERLEUKIN 6</b></b> .....	<b>50</b>
2.6.1	<b>  <i>Struktur</i></b> .....	<b>50</b>
2.6.2	<b>  <i>IL-6-Signaltransduktion</i></b> .....	<b>50</b>

2.6.3	Funktionen im Säuger .....	51
2.6.3.1	Einfluss des IL-6 auf B-Lymphozyten .....	52
2.6.4	Interleukin 6 im Huhn .....	54
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>57</b>
4.1	TIERE UND TIERHALTUNG .....	57
4.2	GEWINNUNG VON PRIMÄREN HÜHNERLEUKOZYTEN .....	57
4.2.1	Gewinnung von peripheren Blutleukozyten .....	57
4.2.2	Gewinnung von Leukozyten aus Organen .....	58
4.3	ZELLKULTUR .....	58
4.3.1	Medien und Zusätze .....	58
4.3.2	Verwendete Zelllinien .....	60
4.3.3	Primäre Zellen .....	60
4.3.3.1	Kurzzeitkulturen (bis zu 72 h) .....	60
4.3.3.2	Langzeitkulturen (bis zu 21 d) .....	60
4.3.4	Einfrieren von Zellen .....	60
4.3.5	Auftauen von Zellen .....	61
4.4	VEKTOREN UND KLONIERUNG .....	61
4.4.1	Verwendete Konstrukte .....	61
4.5	RNA-PRÄPARATION .....	62
4.5.1	Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™ .....	63
4.6	CDNA-SYNTHESE .....	64
4.7	ERSTELLEN VON PRIMERN .....	64
4.7.1	Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion .....	64
4.7.2	Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion .....	65
4.8	POLYMERASE KETTENREAKTION .....	65
4.9	POLYMERASE KETTENREAKTION MIT PROOFREADING-POLYMERASE (PFU) .....	66
4.10	QUANTITATIVE POLYMERASE KETTENREAKTION (QPCR) .....	67
4.11	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	68
4.12	AUFREINIGUNG VON DNA .....	69
4.13	SEQUENZ-SPEZIFISCHE HYDROLYSE VON DNA DURCH RESTRIKTIONS-ENDONUKLEASEN .....	69
4.14	DEPHOSPHORYLIERUNG DES VEKTORS .....	70
4.15	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN VEKTOR-DNA .....	71
4.16	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN .....	71
4.17	SELEKTION PLASMIDPOSITIVER BAKTERIENKLONE .....	72

4.18	AMPLIFIKATION UND ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS E. COLI-BAKTERIEN.....	73
4.19	ERFOLGSKONTROLLE DER LIGATION.....	73
4.20	REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	74
4.20.1	<i>Transiente Transfektion von HEK 293-T-Zellen</i> .....	74
4.20.2	<i>Stabile Transfektion von HEK 293-Zellen</i> .....	74
4.21	AUFREINIGUNG DER REKOMBINANTEN HÜHNER-INTERLEUKINE ÜBER EINE M2-FLAG GELMATRIX.....	75
4.22	SDS-PAGE.....	76
4.23	COOMASSIE-FÄRBUNG.....	78
4.24	WESTERN BLOT.....	79
4.25	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN MITTELS BICINCHONINSÄURE (BCA-TEST).....	81
4.26	ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).....	81
4.27	QUANTITATIVER CHICKEN-IMMUNGLOBULIN-ELISA.....	83
4.28	ELISPOT-ASSAY.....	85
4.29	IFN $\gamma$ NACHWEIS (HD11-ASSAY).....	87
4.30	IL-6 NACHWEIS (7TD1-ASSAY).....	87
4.31	DURCHFLUSS-ZYTOMETRIE.....	89
4.32	B-ZELLSEPARATION MITTELS MACS <sup>®</sup> .....	91
4.33	<i>IN VITRO</i> -FUNKTIONSTESTS.....	92
4.33.1	<i>Bestimmung der Überlebensrate</i> .....	92
4.33.2	<i>Bestimmung der Proliferation</i> .....	93
4.34	TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	94
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>97</b>
5.1	EXPRESSION DER ZYTOKINE CHCD40L, CHIL-6 UND CHIL-10.....	97
5.2	CD40L.....	99
5.2.1	<i>Nachweis des rekombinanten ChCD40L</i> .....	99
5.2.2	<i>Biologische Aktivität des rekombinanten ChCD40L</i> .....	100
5.2.2.1	Proliferation von B-Zellen.....	100
5.2.2.2	Proliferation von DT40-Zellen.....	102
5.2.2.3	Aktivierung von B-Zellen.....	103
5.2.2.4	Differenzierung von B-Lymphozyten.....	106
5.2.2.4.1	Differenzierung auf Ebene der Morphologie.....	106
5.2.2.4.2	Differenzierung auf Transkriptionsebene.....	108
5.3	INTERLEUKIN 10.....	111
5.3.1	<i>Eukaryotische Expression des rChIL-10 in HEK 293-Zellen</i> .....	111
5.3.2	<i>Herstellung und Aufreinigung des rekombinanten ChIL-10</i> .....	112

---

5.3.3	Biologische Aktivität des rChIL-10.....	113
5.3.4	Einfluss des rChIL-10 auf B-Lymphozyten .....	114
5.4	INTERLEUKIN 6.....	116
5.4.1	Eukaryotische Expression des rChIL-6 in HEK 293-T-Zellen .....	116
5.4.2	Herstellung und Aufreinigung des rekombinanten ChIL-6.....	116
5.4.3	Biologische Aktivität des rChIL-6.....	117
5.4.4	Einfluss des rChIL-6 auf B-Lymphozyten .....	118
5.5	NACHWEIS DER TERMINALEN DIFFERENZIERUNG VON B-ZELLEN .....	120
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>127</b>
6.1	EXPRESSION VON CD40 UND CD40L.....	128
6.2	EXPRESSION DER INTERLEUKINE IL-6 UND IL-10.....	129
6.3	BIOLOGISCHE FUNKTIONEN .....	130
6.3.1	Proliferation.....	131
6.3.2	Aktivierung von B-Zellen .....	134
6.3.3	Terminale Differenzierung .....	137
6.4	AUSBLICK.....	143
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>146</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>147</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>179</b>
10.1	DANKSAGUNG .....	181

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
ALV	Aviäres Leukose-Virus
Amp	Ampicillin
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	<i>B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
Bcl2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl6	<i>B cell lymphoma 6</i>
Bcl-xl	<i>B cell lymphoma extra large</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	B-Zellrezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
Blimp1	<i>B-lymphocyte maturation protein 1</i>
bp	Basenpaare
Bu1	Typ I Glykoprotein, erstmals identifiziert auf bursalen B-Zellen von Eintagsküken
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CD40L/	CD40-Ligand
ChCD40L	Chicken CD40-Ligand
CHO	<i>chinese hamster ovarian cells</i>
c-myc	<i>Zelluläres Proto-Onkogen, erstmals aus aviärem Myelocytomatose-Virus isoliert</i>
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-reiche DNA-Sequenzen
cpm	<i>counts per million</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
CXCL	<i>chemokine ligand</i>
CXCR	<i>chemokine receptor</i>
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ED	Embryonal-Tag
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immunosorbant spot assay</i>
EST	<i>expressed sequence tags</i>
esTMB	<i>enhanced soluble Tetramethylbenzidin</i>
Ets	( <i>E-twenty six</i> ), Onkogen und Transkriptionsfaktor
FACS	Durchfluss-Zytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FDC	follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
Flag-Tag	Oktapeptid als Epitop zum Nachweis und Isolation
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe ( <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
GC	germinales Zentrum ( <i>germinal center</i> )
gp130	Glykoprotein 130, ein Signaltransducer
HA	Hämagglutinin
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Tritium-markiertes Thymidin
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig <sub>H</sub>	schwere Kette des Immunglobulin-Moleküls
Ig <sub>L</sub>	leichte Kette des Immunglobulin-Moleküls
IL	Interleukin

Jak	Janus-Kinase
kDa	Kilo-Dalton
KLH	<i>keyhole limpet haemocyanin</i>
LFA	<i>lymphocyte functional antigen</i>
L-Kette	Leichte Kette des Immunglobulinmoleküls
LPS	Lipopolysaccharid
LSL	<i>Lohmann's selected leghorn</i>
LT	Lymphotoxin
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μS	sekretorische Form der schweren Kette des IgM-Moleküls
Neo	Neomycin
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK	natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
Pax5	<i>paired box protein 5</i>
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
POD	Meerrettich-Peroxidase
rER	raues/granuläres endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
q-RT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion ( <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
sec	Sekunden
sIgM	oberflächliches IgM-Molekül
SOCS	<i>suppressors of cytokine synthesis</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAC1	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	Tumor Nekrose Faktor-assoziiierter Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Xbp1	<i>X-box protein 1</i>
ZKÜ	Zellkultur-Überstand

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abbildung 2.1 Vergleichende Darstellung der B-Zellentwicklung bei Mensch und Huhn ...</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2.2 Schema der Signaltransduktion durch CD40 .....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der B-Zellaktivierung .....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Bildung eines germinalen Zentrums .....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 2.5 Regulation der Plasmazell-Differenzierung auf Transkriptomebene .....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 5.1 Reinheit der isolierten B-Zellfraktion .....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 5.2 Genexpressionsanalyse auf lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe .....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 5.3 SDS-Gelelektrophorese des rekombinanten ChCD40L .....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 5.4 Ergebnis der Western Blot-Analyse des rekombinanten ChCD40L .....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 5.5 ChCD40L-induzierte Proliferation .....</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 5.6 Dosisabhängigkeit der Proliferation ChCD40L-stimulierter Leukozyten</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 5.7 Reduzierte Proliferation lebender DT40-Zellen in rChCD40L-stimulierten Kulturen .....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 5.8 Durchflusszytometrisch erfasste Zahl lebender DT40-Zellen .....</i>	<i>103</i>
<i>Abbildung 5.9 Frequenz CD80-positiver B-Zellen nach Stimulation mit rChCD40L .....</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 5.10 CD80-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der B- Lymphozyten .....</i>	<i>105</i>
<i>Abbildung 5.11 Morphologische Veränderungen der mit rChCD40L stimulierten B- Lymphozyten .....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 5.12 Genexpressionsanalyse rChCD40L stimulierter B-Zellen .....</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung 5.13 Schematische Darstellung der Vektoren pCI-neo und pCR3 .....</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 5.14 Nachweis des rChIL-10 im SDS-Gel und Bestimmung des Molekulargewichts .....</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 5.15 Nachweis von Flag-markiertem rChIL-10 im Western Blot .....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 5.16 Inhibition der IFN<math>\gamma</math>-Produktion von T-Zellen durch rChIL-10 .....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 5.17 rChIL-10-induzierte Proliferationssteigerung in Milz-Leukozyten .....</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 5.18 Umklonierung der ChIL-6-Sequenz in einen Flag-markierten Vektor ....</i>	<i>116</i>
<i>Abbildung 5.19 Nachweis des affinitäts-chromatographisch gereinigten rChIL-6 .....</i>	<i>117</i>
<i>Abbildung 5.20 Nachweis der biologischen Aktivität von rChIL-6 im 7TD1-Assay .....</i>	<i>118</i>
<i>Abbildung 5.21 Effekt des rChIL-6 auf die Proliferationshöhe .....</i>	<i>119</i>

---

*Abbildung 5.22 Quantitative Erfassung der sezernierten Antikörper-Menge im ELISA .. 121*

*Abbildung 5.23 Bildtafel zur Veranschaulichung der ELISPOT-Technik zur Erfassung der  
Anzahl Antikörper-sezernierender Plasmazellen ..... 123*

*Abbildung 5.24 Bestimmung der Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen im ELISPOT 124*

*Abbildung 5.25 Einfluss der Stimulationsdauer mit rChCD40L auf die Anzahl Antikörper-  
sezernierender Zellen ..... 125*

**TABELLENVERZEICHNIS**

<i>Tabelle 4.1</i> Verwendete Zelllinien .....	60
<i>Tabelle 4.2</i> Verwendete Konstrukte.....	61
<i>Tabelle 4.3</i> Verwendete Primer zur Klonierung und Erfolgskontrolle .....	64
<i>Tabelle 4.4</i> Im Western Blot eingesetzte Antikörper .....	79
<i>Tabelle 4.5</i> Im ELISA eingesetzte Antikörper.....	82
<i>Tabelle 4.6</i> Aufbau des Interleukin-ELISAs .....	83
<i>Tabelle 4.7</i> Aufbau des quantitativen ELISA zur Bestimmung der Ig-Konzentration in Zellkultur-Überständen .....	85
<i>Tabelle 4.8</i> Aufbau eines ELISPOT-Assay .....	86
<i>Tabelle 4.9</i> In der Durchfluss-Zytometrie eingesetzte primäre Antikörper.....	89
<i>Tabelle 4.10</i> In der Durchfluss-Zytometrie eingesetzte Sekundär-Antikörper .....	90
<i>Tabelle 4.11</i> Protokoll zur Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie .....	95
<i>Tabelle 4.12</i> Protokoll zur Kontrastierung der Proben für die Elektronenmikroskopie.....	96
<i>Tabelle 5.1</i> Verwendete Primer zur Durchführung einer RT-PCR.....	97
<i>Tabelle 5.2</i> Übersicht auf Transkriptionsebene untersuchter Gene.....	108
<i>Tabelle 5.3</i> Liste erstellter Sequenz-spezifischer Primer für die quantitative RT-PCR....	109

## 1 Einleitung

Trotz der vielen Gemeinsamkeiten zwischen Vögeln und Säugern gibt es auch grundlegende Unterschiede im Aufbau des Immunsystems, sowohl struktureller als auch funktioneller Natur. Viele bahnbrechende Erkenntnisse zum Aufbau des adaptiven Immunsystems wie die Untergliederung in B- und T-Zellkompartiment oder der Diversifizierung dieser Zellen zugrundeliegende Mechanismen wurden durch die Forschung an Hühnern und Hühnerembryonen gewonnen. Das Huhn, als für den Menschen bedeutensten Vertreter der Klasse der Aves, eignet sich als Modelltier für die immunologische Grundlagenforschung insbesondere aufgrund der leichten Verfügbarkeit, der geringen Reproduktionszeit bei hoher Nachkommenschaft, bei gleichzeitig relativ einfachen Haltungsbedingungen. Weitere Aspekte die für das aviäre Immunsystem als Modell sprechen sind die präzisen zeitlichen Abläufe der embryonalen Entwicklung, die strikte anatomische Trennung der B- und T-Zellkompartimente und die große Anzahl an Inzuchtlinien.

Auch im Hinblick auf eine ansteigende Weltbevölkerung und damit verbundenem erhöhten Nahrungsmittelbedarf gewinnt das Huhn zunehmend an Bedeutung als lebensmittellieferndes Tier. Die daraus resultierenden immer größeren Tierzahlen in der Wirtschaftsgeflügelhaltung erfordern eine effiziente Infektionskontrolle. Die Entwicklung sicherer Vakzinen kann jedoch nur gelingen, wenn die dem aviären Immunsystem zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen vollständig verstanden werden.

Dass die Bursa Fabricii als eine für die Klasse der Aves einzigartige anatomische Struktur, für den Aufbau einer adaptiven Immunantwort mit Generierung hochaffiner Antikörper und Aufbau eines humoralen Gedächtnisses unabdingbar ist, wurde bereits in den späten 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts durch Bruce Glick und Timothy Chang erkannt. Sie stellten fest, dass bursektomierte Hühner nicht in der Lage sind auf eine Immunisierung hin Antikörper auszubilden. Es musste jedoch ein weiteres Jahrzehnt vergehen bis dieser Erkenntnis Beachtung geschenkt wurde und diese Zellpopulation fortan den Namen B-Lymphozyten trug, für „*bursa-derived lymphocyte*“. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen der B-Zellentwicklung bei Säugern und Vögeln verlagerte sich die Forschung zunehmend auf das Modelltier Maus. Mit der Erkenntnis, dass viele unserer domestizierten Haussäugetiere, die von ebenso großer wirtschaftlicher Bedeutung sind, eine sowohl strukturell als auch funktionell ähnliche B-Zellentwicklung durchlaufen, hat das Huhn als Tiermodell eine Renaissance erfahren. So konnten Bursaäquivalente als darm-assoziierte

Gewebe auch in den Spezies Kaninchen, Schaf, Rind und Schwein nachgewiesen werden, welche fortan als GALT-Spezies („*gut-associated lymphoid tissue*“) bezeichnet werden.

Während die molekularen Ereignisse der B-Zellrezeptor-Diversifizierung auch beim Vogel gut untersucht sind, ist über jene Signale die Zelltod, Überleben und B-Zellentwicklung regulieren wenig bekannt. Mit Verfügbarkeit der EST-Datenbanken und Publikation des Hühnergenoms im Jahre 2004 sind Informationen zugänglich geworden, die zur Untersuchung der Phylogenie, Struktur und Funktion des aviären Immunsystems und eben jener regulatorischen Signale erforderlich sind.

Die im Mausmodell identifizierten immunregulatorischen Komponenten gehören zumeist der Gruppe der Zytokine an. Insbesondere der Interaktion zwischen den Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie CD40 und CD40L kommt eine bedeutende Rolle zu. Daneben sind an Differenzierungsprozessen die Interleukine wie beispielsweise IL-10 und IL-6 entscheidend beteiligt. Mit der Sequenzierung des Hühnergenoms war es nun möglich Sequenzen orthologer Moleküle zu identifizieren und nach Klonierung die rekombinanten Proteine zu exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zytokine CD40L, IL-10 und IL-6 nach Klonierung als rekombinante Proteine exprimiert und *in vitro* Untersuchungen zu ihrer Funktion in Hinblick auf die B-Zellentwicklung durchgeführt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Überblick über das Immunsystem beim Säuger

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Verteidigung des Organismus gegen Infektionen. Dabei kann die Immunantwort, durch eine Vielzahl von Zellarten und löslichen Faktoren vermittelt, den Bereichen angeborene oder adaptive (erworbene) Immunität zugeordnet werden. Das angeborene Immunsystem bildet dabei die erste Stufe der Verteidigung, da es in der Lage ist, sehr schnell auf eingedrungene Pathogene zu reagieren. Hierzu stehen ihm als lösliche Faktoren die Komponenten des Komplementsystems zur Verfügung, die neben einer Opsonisierung und Anlockung von Entzündungszellen auch ein direktes Abtöten der Pathogene ermöglichen. Auf zellulärer Ebene sind die Zellen der myeloiden Reihe wie Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und, als Abkömmling der lymphoiden Reihe, die natürlichen Killerzellen zu nennen. Durch Phagozytose oder Freisetzung zytotoxischer Stoffe kann so das Pathogen effizient bekämpft werden. Das angeborene Immunsystem verwendet aber auch eine Reihe verschiedener, genetisch fixierter Rezeptoren, die sogenannten „*pattern recognition receptors*“ (PRRs), die einfache, sich wiederholende molekulare Strukturen, die sogenannten „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs), also ganze Pathogen-Klassen erkennen, dabei die Phagozytose durch Makrophagen stimulieren, Effektorzellen mobilisieren, aber auch die Übertragung von Signalen stimulieren können. Insbesondere die „*Toll-like*“-Rezeptoren (TLR) sind in der Lage Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NF $\kappa$ B, direkt zu aktivieren, um so die Expression von Zytokinen hochzuregulieren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren ist jedoch keine spezifische Erkennung eines bestimmten infektiösen Agens möglich. Das angeborene Immunsystem ist auch nicht befähigt, einen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion aufzubauen.

Die adaptive Immunität basiert auf der klonalen Selektion von B- und T-Lymphozyten aus einem bestehenden Repertoire an Zellen, die jeweils einen anderen spezifischen Rezeptor tragen. Aufgrund der Vielzahl an spezifischen Rezeptoren wird die Erkennung eines jeden beliebigen Antigens ermöglicht. Hierbei kommt es zur Vermehrung der Antigen-spezifischen Lymphozyten und Differenzierung zu Effektorzellen, die in der Lage sind, das infektiöse Agens zu vernichten. Die Generierung ausdifferenzierter Gedächtniszellen ermöglicht zudem eine schnellere und stärkere Reaktion bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen. Als lösliche Faktoren wirken hierbei die von B-Zellen produzierten Antikörper. Die zelluläre Ebene bilden die B- und T-Lymphozyten, die erst mehrere

Differenzierungsschritte durchlaufen müssen, um zu immunkompetenten Zellen zu werden. Die Entwicklung dieser Zellen hat ihren Ausgangspunkt im Knochenmark mit der Festlegung der lymphoiden Vorläuferzellen auf die B- oder T-Zelllinie. Ein Prozess der auf molekularer Ebene durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird und unter physiologischen Bedingungen irreversibel ist (siehe 2.3.2.5). Die sich daran anschließenden Differenzierungsschritte und Selektionsprozesse die dem Aufbau einer Selbsttoleranz und einer spezifischen Antigenerkennung dienen, erfolgen in den primär lymphatischen Organen Knochenmark, die B-Zellen betreffend und Thymus, die T-Zellen betreffend. Mit Hilfe des Prozesses der genetischen Rekombination werden die Gensegmente der V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Regionen neu miteinander kombiniert und dadurch ein größtmögliches Rezeptor-Repertoire geschaffen. Es ergeben sich hierbei allerdings Spezies-spezifische Unterschiede aufgrund des oftmals eingeschränkten Repertoires an zu kombinierenden Gensegmenten sowie Anwendung verschiedener Diversifizierungsmechanismen (siehe 2.2). Im Falle der B-Zelldifferenzierung kommt es nach Antigen-Kontakt und T-Zellhilfe in Form von kostimulatorischen Molekülen wie CD40L (siehe 2.3.2) innerhalb der sekundären lymphatischen Organe durch somatische Hypermutation zur Affinitätsreifung des B-Zellrezeptors sowie zum Immunglobulin-Klassenwechsel. Das Ergebnis dieses langwierigen Differenzierungsprogrammes sind hochaffine B-Zellrezeptor-tragende Gedächtnis-B-Zellen und Antikörper-sezernierende Plasmazellen.

## **2.2 Überblick über das Immunsystem beim Huhn**

Die ontologische Aufzweigung in Vögel und Säuger erfolgte bereits vor 300 Millionen Jahren und stellt eine wichtige Station in der Evolution des Immunsystems der Vertebraten dar. Auch beim Vogel erfolgt eine Gliederung in angeborenes und adaptives Immunsystem. Während sich das angeborene Immunsystem nur gering von dem des Säugers unterscheidet, weist das adaptive beträchtliche strukturelle und funktionelle Unterschiede auf. Im Gegensatz zur T-Zelldifferenzierung, die große Ähnlichkeit in allen Taxa aufweist [1], bestehen grundlegende Unterschiede hinsichtlich der B-Zelldifferenzierung. So erfolgt bei Mensch und Maus im Knochenmark eine lebenslange Lymphopoiese der Vorläuferzellen zu B-Zellen [2]. Ein Prozess der bei Vögeln nur einmalig und zeitlich begrenzt auf die embryonale Entwicklung in Knochenmark und Milz erfolgt. Wie bei den Säugetieren erfolgt auch beim Huhn eine Untergliederung in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Zu den primären lymphatischen Organen zählen der Thymus, in dem die T-Zellentwicklung vergleichbar zu der beim Säuger abläuft, sowie die

Bursa Fabricii als ein den Vögeln eigenes Organ zur B-Zellentwicklung. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen neben der Milz eine Vielzahl sekundärer lymphatischer Aggregate, das sogenannte MALT („mucosal associated lymphoid tissue“), das sich je nach Lokalisation weiter untergliedern lässt in GALT („gut associated lymphoid tissue“) mit den Oesophageal-Tonsillen und Caecal-Tonsillen, Peyerschen Platten, Meckelsches Divertikulum und Bursa, BALT („bronchus associated lymphoid tissue“) und CALT („conjunctival associated lymphoid tissue“) mit Aggregaten im unteren Augenlid sowie die im Tränenkanal lokalisierte Hardersche Drüse. Umkapselte Lymphknoten, wie sie in den Mammaliern zu finden sind, existieren dagegen nicht.

Bei den meisten unserer domestizierten Tierspezies findet die B-Zellentwicklung im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) statt, was bereits für eine ganze Reihe verschiedener Spezies, wie beispielsweise Kaninchen [3, 4], Schaf [5], Rind [6, 7] und Schwein [8], nachgewiesen werden konnte. Die jedoch am besten untersuchte GALT-Spezies ist das Huhn, dessen B-Zelldifferenzierung in einem ausschließlich bei Vögeln bisher nachgewiesenen, Darm-assoziierten Organ, der Bursa Fabricii, stattfindet [9]. Die Bursa Fabricii, dorsal im Bereich des Proktodeums lokalisiert, stellt eine sackähnliche, kloakale Ausstülpung dar, bestehend aus einer Vielzahl an Primär- und Sekundärfalten, die einen Hohlraum umschließen.

Neben den beschriebenen strukturellen Unterschieden bestehen auch große Unterschiede hinsichtlich Zeitpunkt und Lokalisation die molekularen Ereignisse zur B-Zellrezeptor-Diversifizierung betreffend, worauf im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden soll.

### **2.2.1 Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn**

Während in Mensch und Maus der Pool der reifen, auf Antigen reagierenden B-Zellen kontinuierlich durch Zellen aus dem Knochenmark mit abgeschlossenem Ig-Gen-Rearrangement erneuert wird, konnte für mehrere andere Spezies eine auf die frühe Lebensphase beschränkte, umfangreiche Diversitätsbildung im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe nachgewiesen werden [4, 10]. Erstmals konnte dies für die B-Zellentwicklung in der Bursa Fabricii des Huhns belegt werden. Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass mit Eintritt der sexuellen Reife die Involution der Bursa Fabricii beginnt und damit keine weitere Diversifizierung des B-Zellrezeptors mehr möglich ist [11]. Zur Aufrechterhaltung des peripheren B-Zellpools dient eine kleine Population langlebiger, sich selbst erneuernder B-Zellen, die sogenannten post-bursalen Stammzellen [12], deren

Erhalt andere, bislang unbekannte Mechanismen erfordert, als man sie vom Säuger kennt. Als sehr hilfreich zur Verfolgung der B-Zellentwicklung im Huhn hat sich dabei der Zelloberflächen-Marker Bu-1 erwiesen. Dieses genetisch polymorphe Antigen kann auf der Zelloberfläche aller B-Zellstadien, auch auf den B-Zellvorläufern nachgewiesen werden [13, 14], auf Plasmazellen hingegen nicht [15]. Bu-1, für das zwei Allele (Bu-1a und Bu-1b) nachgewiesen werden konnten, wird auch als ChB6 bezeichnet. Es ist ein Typ I transmembranes Glykoprotein mit hochpolymorpher extrazellulärer Domäne und großer intrazellulärer Domäne, für die eine Funktion in der Signaltransduktion vermutet wird. Bislang konnte kein homologes Molekül im Säuger-Genom nachgewiesen werden, weshalb es als ein einzigartiger B-Zellmarker unbekannter Funktion beim Huhn gilt [14]. Aufgrund der Untersuchungen mit Hilfe dieses B-Zellmarkers auf zellulärer Ebene sowie Genexpressions-Analysen auf Transkriptionsebene konnte die Spaltung in B- und T-Zellvorläufer noch vor Besiedelung der primären lymphatischen Organe nachgewiesen werden [16, 17]. Die B-Zellentwicklung beim Huhn kann weiter in drei Phasen untergliedert werden: prä-bursale, bursale und post-bursale Phase [18].

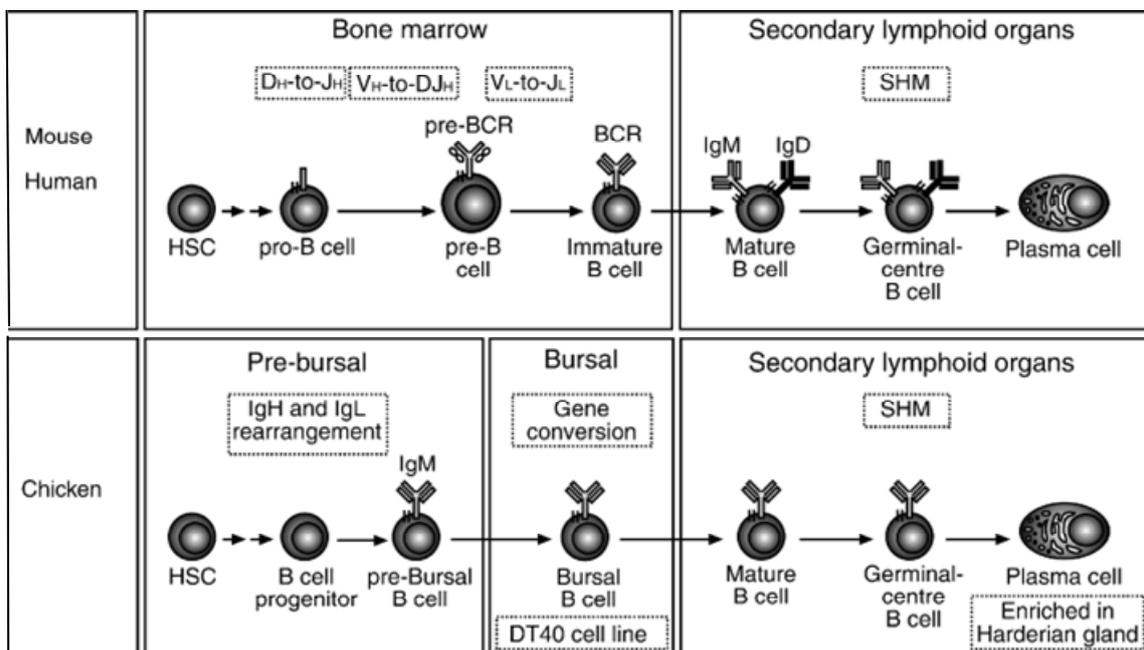


Abbildung 2.1 Vergleichende Darstellung der B-Zellentwicklung bei Mensch und Huhn

Während beim Mensch das V-D-J-Rearrangement in der Bildung eines Prä-B-Zellrezeptors resultiert, erfolgt beim Huhn zeitgleich das Rearrangement der schweren und leichten Kette was in der Ausbildung eines oberflächlichen IgM auf prä-bursalen Zellen resultiert. Eine Diversifizierung erfolgt erst durch Genkonversion in der bursalen Phase sowie durch somatische Hypermutation (SHM) im germinalen Zentrum. (Aus: Kohonen „Avian Model for B-Cell Immunology-New Genomes and Phylotranscriptomics“ [19])

### 2.2.1.1 Prä-bursale Phase

Die sich aus dem embryonalen Mesenchym ableitende hämatopoietische Vorläuferzelle wird während der prä-bursalen Phase auf die B-Zelllinie festgelegt [20]. Dass diese B-Zellvorläufer unabhängig von der Bursa disseminiert an verschiedensten Orten der Hämatopoiese, wie Dottersack, Milz, Knochenmark und Leber erscheinen [21], konnte mit Hilfe bursektomierter Hühner nachgewiesen werden [22]. So konnte gezeigt werden, dass eine Bursektomie nur einen geringen Einfluss auf die B-Zellzahl oder Ig-Serumtiter, jedoch einen großen Einfluss auf die B-Zelldiversität hat [23].

Diese Zellen werden aus dem Mesenchym im Bereich der späteren Aorta [24] in die Peripherie entlassen und gelangen über das Blut zu Milz und anderen lymphatischen Organen [25, 26]. Dort kommt es innerhalb eines engen Zeitfensters der embryonalen Entwicklung zum Ig-Gen-Rearrangement. Die daraus hervorgehenden Zellen weisen nur eine geringe Diversität auf, da das Hühner-Ig<sub>L</sub>-Gen nur ein einziges variables Gensegment V<sub>λ1</sub> besitzt. Die Verknüpfung des einzelnen V<sub>L</sub>-Segments mit einem J<sub>L</sub>-Segment erfolgt bereits ab ED 5 bis zum Eintritt in die bursale Phase [27]. Im Unterschied zu den Säugern, in denen typischerweise das VDJ-Rearrangement der schweren Kette des Ig-Gens unbedingt vor dem Rearrangement der leichten Kette erfolgt, finden diese beiden Prozesse im Huhn zeitgleich statt. Zudem besitzt das Hühner-Ig-Gen weder ein VpreB-Gen noch ein „*surrogate light chain gene*“ und ist somit anders als der Säuger nicht in der Lage einen prä-B-Zellrezeptor auszubilden [26]. Eine erfolgreiche VDJ-Rekombination generiert sIgM-Rezeptorkomplexe, die, wie beim Säuger als Komponenten für die Signal-Transduktion, das Heterodimer CD79a/CD79b (Igα/Igβ) beinhalten [28].

### 2.2.1.2 Bursale Phase

Die Migration der prä-bursalen Stammzellen zur Bursa-Anlage erfolgt in einer einzigen Welle zwischen ED 8 und ED 14 [20]. Sie unterscheidet sich damit grundlegend von der dreiphasigen Besiedelung des Thymus durch die T-Zellvorläufer an ED 15, ED 21 und D 6 [29, 30]. Als ein B-Zellintrinsic Faktor ist das Zytokin ChBAFF zu nennen, das anders als beim Säuger von allen reifen B-Zellen, aber auch von den immaturren bursalen B-Zellen exprimiert wird und für das Überleben und die Reifung des peripheren, aber auch des zentralen B-Zellpools verantwortlich ist. Dass ChBAFF von den B-Zellen exprimiert wird, erklärt sich mit der Tatsache, dass Vögel nach Involution der Bursa auf Signale angewiesen sind, die den Erhalt des peripheren B-Zellpools gewährleisten [31, 32]. Daneben konnte auch die Expression von Adhäsions-Molekülen wie Lewis x und Sialyl Lewis x auf der B-Zelloberfläche nachgewiesen werden, die als Liganden von bisher nicht

identifizierten Rezeptoren der bursalen Umgebung die Einwanderung in die Bursa begünstigen [33]. Neben Adhäsionsmolekülen wurden aber auch lösliche Faktoren wie das Tripeptid Bursin nachgewiesen, welches mit dem erstmaligen Auftreten von IgM-positiven B-Zellen während der bursalen B-Zellentwicklung in Verbindung gebracht wird [34]. Nur solche prä-bursale Stammzellen, die eine erfolgreiche V(D)J-Rekombination durchlaufen haben, sind in der Lage, die Bursa-Anlage zu besiedeln [9, 27, 35] und eine Diversifizierung durch Genkonversion zu erfahren. Während andere Spezies eine beträchtliche B-Zellrezeptor-Diversität durch V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation von Immunglobulin-Genen generieren [36], erfolgt dies beim Huhn durch die Prozesse der Genkonversion und somatischen Hypermutation [37, 38]. Bei der Genkonversion wird ein Pool an nicht-exprimierten Pseudogenen, die benachbart zum aktiven rearrangierten Ig-Genlokus gelegen sind, als Donor für DNA-Segmente genutzt, welche in das rearrangierte Ig-Gen eingefügt werden, um die Ig-Diversität zu erzeugen [39, 40].

Während der bursalen Phase kommt es in den initial nur oligoklonalen Bursa-Follikeln auch zu einer massiven Proliferation, wobei allerdings ca. 95% der gebildeten Zellen in Apoptose gehen [41, 42]. Nur die kleine Population der verbliebenen Zellen mit intakter Ig-Expression emigriert und formt die reife, auf Antigen reagierende, periphere Population [43].

### 2.2.1.3 Post-bursale Phase

Mit der Emigration aus der Bursa, die kurz vor dem Schlupf beginnt und bis zur Involution der Bursa im Alter von 4-6 Monaten anhält, wird die post-bursale Phase eingeleitet. Die emigrierenden Zellen verteilen sich auf die verschiedenen sekundären lymphatischen Organe [43, 44] und bilden fortan den peripheren B-Zellpool. Wie dieser Pool ein Leben lang aufrecht erhalten werden kann ist bislang unklar. Es wird davon ausgegangen, dass eine kleine Population sogenannter post-bursaler Stammzellen für den Erhalt des erworbenen B-Zellrezeptor-Repertoires verantwortlich ist [12].

Nach Antigen-Kontakt kommt es zur Aktivierung und weiteren Differenzierungsschritten der B-Zelle. Dabei wird das Antikörper-Molekül mittels somatischer Hypermutation, Genkonversion und Immunglobulin-Klassenwechsel unter dem Einfluss des Enzyms AID („*activation-induced cytidine deaminase*“) weiter differenziert [45]. Diese Prozesse erfordern T-Zellhilfe in Form von Zytokinen und laufen analog zum Säuger innerhalb germinaler Zentren der sekundär lymphatischen Organe und zum Teil auch im Gewebe ab. Ziel des langwierigen Differenzierungs-Prozesses ist die Generierung immunkompetenter,

hochaffiner Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen.

#### **2.2.1.4 Regulation der B-Zellentwicklung beim Huhn**

Während die molekularen Ereignisse der B-Zellrezeptor-Diversifizierung beim Huhn gut untersucht sind [39, 46], ist über jene Signale die Zelltod, Überleben und B-Zellentwicklung regulieren wenig bekannt. Seit Verfügbarkeit der EST-Datenbanken und Publikation des Hühnergenoms sind Informationen zugänglich die die Untersuchung der Phylogenie, Struktur und Funktion des aviären Immunsystems und eben jener regulatorischen Signale erleichtern [47].

Eine große Gruppe immunregulatorischer Moleküle bilden dabei die Zytokine. Diese sind Peptide geringen Molekulargewichts, die als extrazelluläre Signale zwischen den an der immunologischen Entwicklung oder Immunantwort beteiligten Zellen agieren. Sie können Immunantworten auslösen oder regulieren. Zur großen Familie der Zytokine gehören die Interleukine, Interferone, TGF- $\beta$  („*transforming growth factor- $\beta$* “), Mitglieder der Tumornekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie, CSF („*colony-stimulating factors*“) und die große Gruppe der Chemokine. Einige der beim Säuger bekannten Zytokine konnten zwischenzeitlich auch beim Huhn identifiziert werden. Als Beispiele sind hier die Mitglieder der TNF-Superfamilie ChCD40L [48] und ChBAFF [32] zu nennen. Unterschiede betreffen die Anzahl der Zytokine innerhalb der Multigen-Familien und die Homologie. So besteht im Allgemeinen nur eine 25-35%ige Aminosäuren-Übereinstimmung der Hühner-Zytokine mit den orthologen Molekülen beim Mammalier. Auf die einzelnen Effekte der Zytokine CD40L als Mitglied der TNF-Superfamilie sowie der Interleukine IL-6 und IL-10 soll in den nachfolgenden Abschnitten eingegangen werden.

### **2.3 Das CD40-CD40L-System**

#### **2.3.1 Die TNF-Familie**

Namensgeber dieser Familie ist das bereits im Jahre 1975 durch Carswell et al. [49] entdeckte Zytokin TNF- $\alpha$ , gewonnen aus dem Serum Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) infizierter Mäuse, welches in zwei neoplastischen Zelllinien nekrotische Wirkung hervorrief. Die Mitglieder der TNF-Familie zeichnen sich durch strukturelle Homologie, geclusterte Chromosomenlokalisierung, gemeinsame Signaltransduktionswege und sich überlappende biologische Aktivität in Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod aus [50].

Die große Bedeutung der TNF Rezeptor und TNF Liganden Familien für die Ausbildung

eines intakten Immunsystems wurde erkannt, als man eine Mauslinie mit deletiertem LT- $\alpha$ -Gen erzeugt hatte und feststellte, dass diese Mäuse keinerlei Lymphknoten ausbildeten und eine veränderte Milzarchitektur aufwiesen [51].

Die Mitglieder der TNF Familie und der TNF-R Familie besitzen ein breites Spektrum biologischer Funktionen. Zu ihren Hauptaufgaben zählen der Aufbau, Erhalt und die dynamische Anpassung des Immunsystems durch ihren Einfluss auf Überleben, Differenzierung und Tod der daran beteiligten Zellen. Ihre Aufgaben sind jedoch nicht auf das Immunsystem beschränkt. Beispielsweise konnte auch eine Beteiligung am Aufbau des Nervensystems nachgewiesen werden [52].

Die Prototypen der TNF-Liganden-Familie sind der 1975 entdeckte TNF- $\alpha$  und das bereits 1968 beschriebene Lymphotoxin (LT)- $\alpha$  [53]; die Prototypen der TNF-Rezeptor-Familie sind die TNF- $\alpha$  bindenden Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. Zwischenzeitlich sind 32 Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie und 19 Liganden identifiziert worden [54].

Durch TNF Liganden werden Immunantworten und Entzündungsreaktionen auf verschiedenen Ebenen kontrolliert und reguliert [55]. Dazu zählen die Induktion von Zytokinsekretion, Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von Antigenen und kostimulatorischen Proteinen, alles Prozesse die stimulatorische und regulatorische Signale während einer Immunantwort verstärken [56]. Die B-Zellen betreffend sind als wichtige Vertreter hierbei CD40L, BAFF und APRIL [57, 58] zu nennen, dendritische Zellen betreffend kommt den Liganden CD40L und RANKL eine besondere Bedeutung zu [59, 60]. „*B-cell activating factor belonging to the TNF-family*“ (BAFF) ist von größter Wichtigkeit für das Überleben der B-Zellen in der Peripherie, für die B-Zellreifung, sowie für einen CD40L unabhängigen Ig-Klassenwechsel [61, 62]. Neben seiner Bedeutung für die B-Zellen wird auch eine kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen vermutet [63, 64]. Auch das Zytokin APRIL transduziert Signale, die sowohl das Überleben als auch die Differenzierung von B-Zellen regulieren [65].

Die Angehörigen der TNF Liganden Superfamilie sind zumeist transmembrane Typ II Glykoproteine derselben trimeren Tertiärstruktur, die eine Sequenzhomologie von 20 bis 30% aufweisen [66]. Durch limitierte Proteolyse können sie aber auch in Lösung gehen, was für die physiologische Funktion einiger Liganden essentiell ist. Bis auf wenige Ausnahmen bindet ein TNF Ligand nur an einen bestimmten TNF Rezeptor. Eine Ausnahme hiervon ist BAFF, welches in der Lage ist an drei verschiedene Rezeptoren zu binden: BAFF-R, BCMA und TACI.

Charakteristisches Merkmal der TNF Liganden ist eine hochkonservierte, trimere, C-

terminale Domäne, die sogenannte „*TNF homology domain*“ (THD), die für die Rezeptorbindung verantwortlich ist. Ihre Sequenz umfasst 150 Aminosäuren und bildet ein Netzwerk aromatischer und hydrophober Reste. Die einzelnen Monomere der THD bestehen aus je 2  $\beta$ -Faltblättern, die sich ihrerseits aus jeweils 5 antiparallelen  $\beta$ -Strängen zusammensetzen und eine sogenannte „*Jellyroll*“-Topologie aufweisen [66-68], ähnlich der Topologie von kleinen Pflanzenviren oder Picornaviren [69]. Den „*Jellyroll*“-Motiven dieser völlig verschiedenen Proteinfamilien ist die Fähigkeit zur Oligomerisation gemeinsam.

Die Mitglieder der TNF-R Familie sind Typ I oder Typ III Membran-Proteine und besitzen ein charakteristisches, extrazelluläres Motiv, das der Ligandbindung dient und aus sich wiederholenden, Cystein-reichen Domänen (CRD) besteht [70]. Diese zumeist transmembranen Proteine besitzen einen extrazellulären N-Terminus und intrazellulären C-Terminus [71]. Ausnahmen hiervon bilden die transmembranen Proteine vom Typ III, denen ein Signalpeptid fehlt. Zu diesen zählen auch BCMA, BAFF-R und TACI [72].

Für einige Rezeptoren konnte die Existenz der löslichen Form nachgewiesen werden, abgegeben durch proteolytische Spaltung wie im Fall des CD40-Rezeptors [73] oder durch alternatives Spleissen des für die transmembrane Domäne kodierenden Exons.

Die Einteilung der TNF-R Familie in zwei große Gruppen erfolgt anhand ihrer Bindungseigenschaften und der primären Aminosäuresequenzen ihrer zytoplasmatischen Domänen. Angehörige der TNF-R Familie, die eine „*death domain*“ tragen interagieren mit intrazellulären Adaptormolekülen, welche zur Aktivierung von Caspasen führen und somit Apoptose induzieren [74]. Als Beispiel hierfür ist die Interaktion zwischen Fas und Fas-L zu nennen, die Immunantworten beendet, indem sie die beteiligten Lymphozyten in Apoptose treibt [75]. Mitglieder der TNF-R Familie, die keine „*death domain*“ besitzen, können über „*TRAF interacting motifs*“ (TIM) die sogenannten TNF-R-assoziierten Faktoren (TRAF) rekrutieren, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und damit zur Transkription anti-apoptotischer Faktoren führt.

### 2.3.2 Das CD40-CD40L-System

Dass die Interaktion zwischen den Mitgliedern der TNF-/TNF-R-Familie CD40 und CD40L eine ganz entscheidende Rolle in T-Zellabhängigen B-Zellantworten spielt, wurde bereits im Zusammenhang mit der Erforschung der Krankheitsursache des „*X-linked Hyper-IgM Syndrome*“ entdeckt. Die X-chromosomal gekoppelte Form dieser seltenen Immundefizienz tritt als Konsequenz von Mutationen im CD40L Gen auf, in Folge dessen

es zu einer gestörten humoralen Immunität kommt.

Charakteristische Parameter dieser Krankheit sind normale bis erhöhte IgM-Titer bei gleichzeitig stark verminderten IgG, IgA und IgE-Titern [76]. Ursache hierfür ist eine Beeinträchtigung der Thymus-abhängigen Immunantworten, was zu einer Störung in der Anbildung germinaler Zentren, der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen und der Plasmazellen führt. In der Folge sind Betroffene extrem empfänglich für rezidivierende bakterielle Infektionen und gefährdet Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen zu entwickeln [77, 78].

Erst später erkannte man, welch breites Spektrum an Funktionen dieses Rezeptor-Ligand-Paar besitzt. Sein Einfluss beschränkt sich bei weitem nicht nur auf die Zellen des Immunsystems, sondern umfasst auch eine ganze Reihe nicht-hämatopoietischer Zellen. In jüngster Zeit fokussierte sich die Forschung auf den Einfluss dieses Systems auf die Entstehung und Therapie von Artherosklerose, Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise rheumatische Arthritis, sowie auf die Krebsforschung.

#### **2.3.2.1 CD40**

Eines der am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle und Mitglied der TNF Rezeptor Familie ist der CD40 Rezeptor, ein 48 kDa großes, hydrophobes, membrangebundenes Typ I Glykoprotein. Seine beim Menschen aus 277 Aminosäuren bestehende Sequenz beinhaltet eine hochkonservierte, extrazelluläre Region aus 4 Cysteinreichen, sich wiederholenden Domänen, die eine große Homologie zu anderen TNF-Mitgliedern aufweist [79]. Der 62 Aminosäuren-lange zytoplasmatische Anteil des Moleküls weist dagegen kaum Charakteristika der TNF-Familie auf und besteht aus zwei Domänen, cyt-N und cyt-C, die bei der Bindung der TRAF-Moleküle involviert sind, aber auch unabhängig davon den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktivieren können [80]. Die CD40 Expression wird kontrolliert durch posttranskriptionale und posttranslationale Regulation und durch alternatives Spleißen, wodurch neben der vollständigen Form auch zur Signaltransduktion befähigte Isoformen sowie Isoformen mit fehlender transmembraner Domäne entstehen, die nicht mehr zur Signaltransduktion befähigt sind. Es wird angenommen, dass die Modulation der Expression dieser Isoformen einen Mechanismus der Zellen zur Regulation ihrer Empfindlichkeit gegenüber CD40L darstellt [81].

Die Aktivierung von CD40 als ein TNF-R mit kostimulatorischen Eigenschaften, fördert die B-Zellaktivierung durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Rezeptoren (ICAM, CD23, B7.1/CD80, B7.2/CD86), sowie die

Differenzierung während der germinalen Zentrumsreaktion durch den positiven Effekt auf die Zytokin-Produktion (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$ ) und schützt die B-Zellen vor Apoptose [79].

Auch T-Zelllinien und T-Zellen des Blutes exprimieren funktionelles CD40, wenn auch in vergleichsweise geringer Menge, welches mit CD40L interagieren kann. Diese Möglichkeit der T-Zellaktivierung spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in T-T-Zellinteraktionen [82].

Daneben konnte die Expression des CD40-Rezeptors sowohl im gesunden Organismus als auch im Entzündungsgeschehen für eine Reihe weiterer Zellen mit hohem proliferativen Potential nachgewiesen werden [83]. Hierzu gehören nicht-hämatopoietische Zellen wie Myofibroblasten, Fibroblasten, epitheliale und endotheliale Zellen, aber auch neoplastische Zellen. Ebenso wurde seine Expression auch auf Monozyten, dendritischen Zellen (DC), Mastzellen sowie basophilen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen [84, 85]. So stellt beispielsweise die CD40-Expression auf dendritischen Zellen einen ganz entscheidenden Schritt in der endgültigen Ausdifferenzierung zu einer kompetenten Antigen-präsentierenden Zelle dar und ermöglicht in der Folge eine effektive T-Zellaktivierung [86].

Dass CD40 eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen spielt, kommt darin zum Ausdruck, dass die Aktivierung des CD40 Rezeptors die Synthese der proinflammatorischen Cyclooxygenase-2 (COX-2) induziert [87]. So konnte sowohl in Knock-out-Tieren als auch, unter Verwendung von blockierenden Antikörpern, in verschiedenen Krankheitsmodellen zu Transplantation, Autoimmunität und Infektionskrankheiten gezeigt werden, dass die CD40-CD40L Interaktion ein, das Krankheitsgeschehen förderlicher Faktor ist. In Bezug auf neoplastische Zellen diktiert Dauer und Stärke der CD40 Aktivierung, abhängig von der Art der malignen Zellen, ob Stimulation oder Unterdrückung des Tumorwachstums eintritt [88].

Wie wichtig dieser Rezeptor ist, zeigt sich somit bereits an seinem Vorkommen auf verschiedensten Zelltypen und seinen vielfältigen Funktionen [86].

### **2.3.2.2 CD40L**

CD40L, auch unter den Bezeichnungen CD154, gp39, T-BAM oder TRAP bekannt, ist ein transmembranes Typ II Glykoprotein mit der, für Mitglieder der TNF-Superfamilie charakteristischen, extrazellulären Domäne [66]. Es besitzt die typische Sandwich-Struktur aus zwei  $\beta$ -Faltblättern mit einer sogenannten „*Jellyroll*“-Topologie und formt ein dreifach

symmetrisches Homotrimer. Bedingt durch posttranslationale Modifikationen weist dieses Molekül beim Menschen ein variables Molekulargewicht zwischen 32 und 39 kDa auf [79]. Daneben existieren noch zwei kürzere Varianten mit 18 bzw. 31kDa, die ihre Fähigkeit beibehalten haben Trimere auszubilden und CD40 zu binden, um biologische Signale auszusenden, was darauf hindeutet, dass CD40L auch in dieser Form als ein Zytokin agieren kann [89]. Die lösliche Form des CD40L, extrahiert aus Überständen aktivierter T-Zellen oder rekombinant erzeugt, ist ein 18kDa großes Protein ohne transmembraner Domäne und nur partiell erhaltener extrazellulärer Domäne mit intakter „*TNF homology domain*“. Wie auch einige andere Mitglieder der TNF-Superfamilie ist die dimere und trimere lösliche Form biologisch aktiv und bedingt B-Zelldifferenzierung und Proliferation [89, 90], wohingegen die monomere Form der extrazellulären Domäne des löslichen CD40L weitgehend funktionslos ist [91].

CD40L wird transient auf aktivierten T-Zellen, vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nicht jedoch auf ruhenden T-Zellen exprimiert. Daneben konnte seine Expression häufig im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, auch auf verschiedensten anderen Zellen wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, aber auch auf aktivierten NK-Zellen, aktivierten B-Zellen und Thrombozyten, nachgewiesen werden [92, 93]. In nicht-hämatopoietischen Zellen wird CD40L auf glatten Muskelzellen und Gefäßendothelzellen exprimiert. Eine sehr starke Expression konnte in atherosklerotischen Läsionen und abgestoßenen Nierentransplantaten nachgewiesen werden [94-96].

Die Expression des CD40L auf der Oberfläche aktivierter B-Zellen germinaler Zentren soll in erster Linie dem Erhalt der germinalen Zentren und dem Überleben der Zellen dienen. Ob sie jedoch auch einen Einfluss auf die Formation germinaler Zentren, B-Zellexpansion und terminale Differenzierung zu Antigen-präsentierenden Zellen und somit auf die humorale Immunantwort hat, wird kontrovers diskutiert [97-100].

Die strenge Regulation der schnellen transienten CD40L-Expression wird über verschiedene Mechanismen gesteuert. Der intrinsischen Regulation dient neben der Abgabe von preformiertem, löslichem CD40L auch die sehr schnelle, aber nur transiente Expression des CD40L auf der Zelloberfläche und die schnelle Herunterregulation der CD40L-mRNA nach Bindung des CD40 an den Liganden. So konnte bereits 5-15 Minuten nach Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD40L auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Eine zweite Welle der CD40L Expression, die eine *de novo* Protein-Synthese erfordert, kann auf der Zelloberfläche aller CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bereits 1-2 Stunden nach Aktivierung

nachgewiesen werden und erreicht ihren Höhepunkt nach 6-8 Stunden, gefolgt von einem graduellen Verlust. Detektierbar bleibt die Protein-Expression bis zu 20 Stunden nach Aktivierung der Zellen [101]. Eine ähnliche Kinetik bei deutlich geringerer Expression zeigt auch eine kleine Subpopulation an CD8<sup>+</sup>T-Zellen [102]. Daneben kann die Restriktion der Expression über verschiedene andere Mechanismen gesteuert werden. Hierzu zählen eine Rezeptor-medierte Endozytose des CD40L mit anschließender lysosomaler Degradation, proteolytische Spaltung des CD40L sowie Abgabe von löslichem CD40, welches CD40L bindet.

*In vivo* findet die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen statt. Von besonderer Bedeutung für die adaptive Immunantwort ist hierbei die Interaktion zwischen B- und T-Zelle durch Ausbildung einer immunologischen Synapse innerhalb germinaler Zentren. So fördern die kostimulatorischen Signale der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen die B-Zellproliferation und die Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen [103]. Diesen Effekt macht man sich auch für die *in vitro* Kultur zunutze, durch Zugabe von löslichem rekombinantem CD40L. Zu einer Repression der CD40L-Expression kommt es durch hohe Konzentrationen an IFN- $\gamma$  oder TGF- $\beta$  [104, 105].

*In vitro* kann durch verschiedenste Arten der T-Zellaktivierung eine CD40L Expression stimuliert werden. Zum Einsatz kommen hierbei die Stimulantien Phytohämagglutinin (PHA), Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) plus Ionomycin, aber auch anti-CD3-Antikörper. Eine Vorbehandlung der T-Zellen mit Cyclosporin A oder Glucocorticoiden verhindert dagegen die Induktion der CD40L Expression [106].

### 2.3.2.3 CD40-Signaltransduktion

CD40 gehört zur Gruppe der TNF-R Familie ohne „*death domain*“. Obwohl CD40 keine Domäne mit Kinaseaktivität besitzt, kann seine Ligation mit CD40L verschiedene „*second messenger*“ Systeme aktivieren. Nach erfolgter Ligation kommt es zur Trimerisation und Bündelung (clustering) der CD40-Moleküle in lipidreichen Mikrodomänen der Plasmamembran, den sogenannten „*lipid rafts*“ [107, 108] und anschließender Rekrutierung von intrazellulären Adaptorproteinen an die zytoplasmatische Domäne des CD40-Moleküls [109, 110]. Diese Adaptorproteine, von denen bislang 6 verschiedene identifiziert wurden, werden als TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) bezeichnet und sind in der Lage durch Aktivierung weiterer Signaltransduktionswege, wie beispielsweise den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), verschiedene Transkriptionsfaktoren der

AP-1- und der Rel/NF $\kappa$ B-Familie zu induzieren [83, 111, 112].

Im Säuger konnte für TRAF2, 3, 5 und 6 eine Assoziation mit CD40 nachgewiesen werden. Jedes Mitglied der TRAF-Familie besitzt eine hochkonservierte Carboxyl-Domäne, die sogenannte TRAF-Domäne. Diese vermittelt die Bindung an definierte Aminosäuremotive des TRAF-Rezeptors innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des CD40-Moleküls. Mit Ausnahme von TRAF1 besitzen alle TRAFs eine Zinkfinger-Domäne die essentiell für die Trimerisierung des TRAF-Moleküls und damit für die durch CD40 angestoßene Signalkaskade ist [83, 109]. Neben der Zinkfinger-Domäne sind auch die RING-Finger-Domäne und ein Isoleucin-Zipper entscheidend an Protein-Protein-Interaktionen zur Assoziation mit CD40 oder zur Homo-/Hetero-Dimerisierung des nachgeschalteten NF $\kappa$ B beteiligt [113].

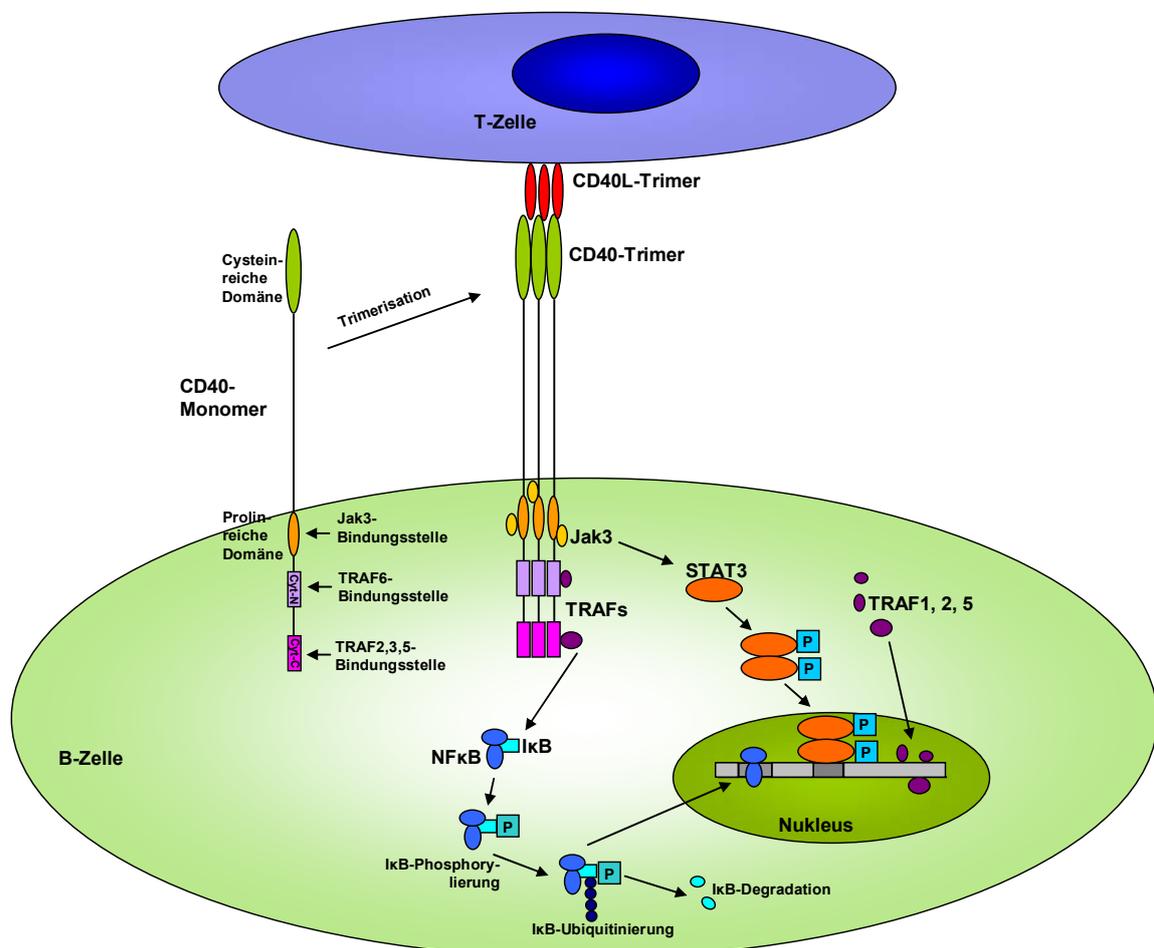


Abbildung 2.2 Schema der Signaltransduktion durch CD40

Durch die Bindung des CD40L an CD40 kommt es zu dessen Trimerisierung und nachfolgend zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalswegs oder zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B über den TRAF-Signalsweg. (Nach Xu: "The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation" [114])

Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnten die Bindungsstellen der TRAF-Proteine identifiziert werden. Während TRAF2, 3 und 5 an cyt-C, den membranabgewandten Anteil der zytoplasmatischen Domäne des CD40-Moleküls binden, erfolgt die Bindung des TRAF6 an cyt-N, den membranzugewandten Anteil [115].

Die Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden führt zu einer intrazellulären Konformationsänderung, welche die Assoziation eines trimeren TRAF-Moleküls an den zytoplasmatischen Anteil mit 3 CD40-Molekülen ermöglicht [116]. Bezüglich der Rekrutierung der verschiedenen TRAFs bestehen Unterschiede hinsichtlich des Oligomerisationsgrades des CD40-Rezeptors, was somit einen Einfluss auf den verstärkenden Effekt des CD40-„*Signaling*“ hat [117, 118].

TRAFs besitzen die Fähigkeit an eine Vielzahl von Proteinkinasen zu binden, was nach Bindung an CD40 zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren und letztlich zur Regulation unterschiedlicher Zielgene führt [119]. Zu den am besten charakterisierten Signalwegen gehört hierbei der klassische und alternative NFκB-Signalweg. Während der klassische Weg durch eine Vielzahl inflammatorischer Signale wie Zytokine, Viren, TLR- und Antigen-Rezeptor-Stimulation aktiviert wird und essentiell für den Aufbau und Erhalt der angeborenen Immunität ist [120, 121], erfolgt die Aktivierung des alternativen Wegs über Zytokine wie BAFF und CD40L durch Aktivierung der NFκB induzierenden Kinase und spielt eine zentrale Rolle in Entwicklung und Erhalt sekundärer lymphatischer Organe [122, 123]. Insbesondere TRAF2 scheint essentiell für die NFκB-Aktivierung und für die Translokation in den Nukleus zu sein. Auch TRAF6 scheint, abhängig vom Zelltyp, eine Rolle in der Aktivierung des NFκB über den alternativen Weg zu spielen [124]. In unstimulierten Zellen wird NFκB, assoziiert an inhibitorische Proteine der „*inhibitory κB*“ (IκB)-Familie, im Zytoplasma gespeichert. Durch Bindung der TRAFs oder anderer Moleküle kommt es zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation des IκB, wodurch der inhibierende Effekt auf die NFκB-Vorläufer p100 und p105 aufgehoben wird und diese durch limitierte Proteolyse in die NFκB-Mitglieder p52 und p50 überführt werden. Mit Hilfe der, allen Angehörigen der NFκB-Familie gemeinsamen, Rel-homologen Domäne (RHD) kommt es nun im Rahmen des klassischen NFκB-Wegs zur Dimerisation der NFκB-Moleküle p50 mit RelA, im Rahmen des alternativen NFκB-Wegs zur Dimerisation der Moleküle p52 mit RelB, wodurch in beiden Fällen die Translokation in den Nukleus und Sequenz-spezifische Bindung an die DNA möglich wird [125]. Hierdurch wird insbesondere die Transkription von Genen beeinflusst, die für Chemokine, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Enzyme kodieren. NFκB reguliert so die

Produktion von inflammatorischen Mediatoren und Apoptoseinhibitoren [126]. Obwohl NFκB per se nicht für die Lymphozytenentwicklung benötigt wird, unterdrückt es durch Hochregulation der Expression von Bcl-2 und anderen anti-apoptotischen Genen die Apoptose von Lymphozyten während ihrer frühen Entwicklungsphase [127].

Die Assoziation zwischen CD40 und den spezifischen TRAF-Molekülen kontrolliert die CD40-mediierte humorale Immunantwort. Dass hierbei die TRAF-Moleküle als Mittler fungieren, konnte durch gezielte Mutagenese der TRAF-Bindungsstellen nachgewiesen werden [128]. Eine Zerstörung der TRAF2, TRAF3 und TRAF6-Bindungsstelle hat keinerlei Einfluss auf die B-Zellproliferation und die frühe Immunglobulin-Produktion, jedoch sind spätere Ereignisse während einer humoralen Immunantwort, wie die Formation germinaler Zentren nach Immunisierung, Affinitätsreifung der B-Zellrezeptoren, Aufbau und Erhalt einer langanhaltenden humoralen Immunität, TRAF-abhängige Prozesse. Insbesondere die Bindung von TRAF6 ist für die terminale Phase der CD40-induzierten B-Zelldifferenzierung erforderlich. Durch Zerstörung der TRAF6-Bindungsstelle bleiben Affinitätsreifung und Generierung langlebiger Plasmazellen aus [128]. Eine Inaktivierung des TRAF5-Gens resultiert dagegen in einer verminderten B-Zellproliferation und Hochregulation verschiedener Oberflächen-Rezeptoren, wie beispielsweise CD23, den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und Fas nach einer CD40-Stimulation [129].

Neben der Rekrutierung der Mitglieder der TRAF-Familie ist auch die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges möglich. Im membran zugewandten Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne des CD40-Moleküls befindet sich eine Prolin-reiche Sequenz zur Bindung der Janus-Kinase 3 (JAK3) [130]. Diese Kinase bedingt die Phosphorylierung und Dimerisierung von „*signaltransducer and activator of transcription*“ (STAT)-Molekülen, insbesondere STAT3 [130], aber auch STAT5 und STAT6 [131], wodurch eine Translokation in den Nukleus und Regulation der Transkription möglich ist [132, 133]. STAT-Moleküle wirken als Transkriptions-Aktivatoren von Genen, die für Zytokine kodieren [134].

Zusammenfassend lässt sich die Signaltransduktion des CD40-Rezeptors als ein komplexes Netzwerk verschiedenster Faktoren beschreiben, innerhalb dessen intrazelluläre Komponenten wie TRAF-Moleküle über den klassischen NFκB-Weg einen entscheidenden Einfluss darauf haben, ob die Zelle überleben wird oder in Apoptose geht.

### 2.3.2.4 Funktionen im Säuger

Wie bereits beschrieben, kommt der Interaktion zwischen CD40 und CD40L innerhalb des Immunsystems die größte Bedeutung zu, wenngleich sich die Expression dieser Moleküle nicht auf die Zellen des Immunsystems beschränkt.

Das weitverbreitete Vorkommen dieses Rezeptor-Ligandenpaares lässt vermuten, wie vielfältig seine Funktionen sind. Innerhalb dieser Arbeit soll jedoch das Augenmerk auf die Interaktion zwischen B-Zelle und T-Zelle zum Aufbau der T-Zell-abhängigen adaptiven Immunantwort gelegt werden.

Die Interaktion von CD40 der Antigen-präsentierenden Zellen mit CD40L der T-Zellen ist essentiell für die Initiation und den Fortbestand einer T-Zell-medierten Immunantwort. Für die Aktivierung der T-Zellen sind zwei Signale unbedingt erforderlich. Das erste Signal stellt die Interaktion zwischen dem Antigen-beladenen „*major histocompatibility complex II*“ (MHC Klasse II)-Molekül der Antigen-präsentierenden Zellen, zumeist dendritische Zellen, und dem T-Zellrezeptor-Komplex sowie dem CD4-Molekül der CD4+ T-Zelle dar. Komplettiert wird die T-Zellaktivierung durch die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) der Antigen-präsentierenden Zelle und dem CD28-Molekül bzw. dem „*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*“ (CTLA-4)-Molekül auf der Oberfläche der T-Zelle [135]. Fehlt die Kostimulation, so kommt es trotz Antigenkontakt weder zu einem Priming noch zu einer Expansion der CD4+ T-Zelle.

Das von der B-Zelle ebenfalls erkannte, gebundene und prozessierte Antigen wird der aktivierten T-Zelle an MHC Klasse II gebunden präsentiert. Erkennt die T-Zelle über ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) das präsentierte Antigen, so kommt es zur Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen den beiden Zellen, wodurch bidirektional stimulatorische Signale ausgetauscht werden können [136, 137]. Der initiale Kontakt, der die beiden Zellen einander annähert, wird über Adhäsionsmoleküle vermittelt. Hierbei bindet das „*intracellular adhesion molecule-1*“ (ICAM-1) der Antigen-präsentierenden B-Zelle an das „*lymphocyte functional antigen-1*“ (LFA-1) der T-Zelle. Für die Aktivierung der B-Zellen sind ebenfalls zwei Signale essentiell. Das erste Signal stellt die Interaktion zwischen dem Antigen-beladenen „*major histocompatibility complex II*“ (MHC Klasse II)-Molekül der Antigen-präsentierenden B-Zelle und dem T-Zellrezeptor-Komplex sowie dem CD4-Molekül der CD4+ T-Zelle dar. Das zweite Signal besteht in der Kontaktaufnahme zwischen den kostimulatorischen Molekülen CD40 der B-Zelle und CD40L der T-Zelle. Fehlt der CD40L so kommt es trotz Antigenkontakt zum Untergang der Zelle, wodurch die Entstehung autoreaktiver B-Zellen unterbunden wird [138]. Als

weiteres unterstützendes Signal wirken die von den T-Helferzellen sezernierten Zytokine wie beispielsweise IL-4, IL-5 und IL-6, die die Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen begünstigen.

Die Interaktion zwischen CD40 und CD40L als zweites Signal führt zur Amplifizierung der Immunantwort und unterbindet dabei Anergie und Toleranzinduktion. Die Genexpression kostimulatorischer Moleküle und Zytokine wird hochreguliert, was die Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zelle zur Folge hat [135, 139]. Während es *in vitro* zur Adhäsion zwischen B-Zellen, anhaltender Zellproliferation und Differenzierung kommt [140, 141], bedingt die Interaktion *in vivo* die Formation germinaler Zentren innerhalb derer es zu Expansion, Affinitätsreifung und Immunglobulin-Klassenwechsel kommt. Dies geschieht unter Einflussnahme auf die Expression von Genen, die Zellzyklus, Rekombination und Differenzierung kontrollieren und letztlich die terminale Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen bedingen [142, 143]. Eine Blockade der CD40-CD40L Interaktion mittels blockierender Antikörper oder genetischer Ablation von CD40 oder CD40L führt nachweislich zu einer kompletten Aufhebung der Thymus-abhängigen humoralen Immunität [140]. Während die Wechselwirkung des Rezeptor-Ligandenpaares absolut essentiell ist für eine primäre IgM-Antwort auf ein Thymus-abhängiges Antigen, ist sie für die Generierung sekundärer Immunglobulin-Antworten nicht zwingend erforderlich. Auch die Immunantwort auf Thymus-unabhängige Antigene bleibt hiervon weitgehend unbeeinflusst [144].

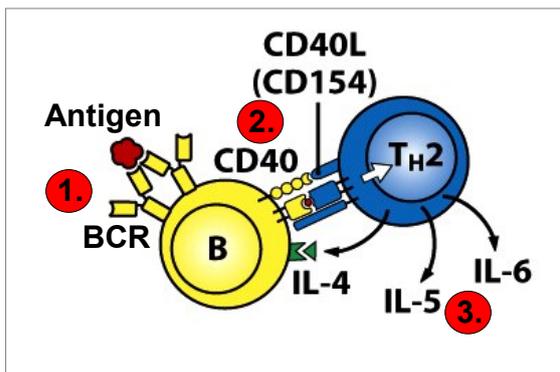


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der B-Zellaktivierung

Zur B-Zellaktivierung sind 2 Signale, die B-Zellrezeptor-Verknüpfung durch gebundenes Antigen (1.) sowie die Kostimulation über die CD40-CD40L-Interaktion zwischen B- und T-Zelle (2.), unabdingbar. Die von der stimulierten T-Zelle sezernierten Zytokine (3.) fördern die B-Zellaktivierung sind aber nicht zwingend erforderlich.

(Aus: Janeway „Immunobiology“ [145])

Neben der Regulierung Thymus-abhängiger humoraler Immunantworten ist CD40-CD40L aber auch an der Entwicklung einer zellmedierten Immunität beteiligt. Die CD40-CD40L Interaktion ist ganz entscheidend am „*priming*“, also der Aktivierung der Zellen nach Antigen-Kontaktaufnahme der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, sowie am sogenannten „*cross priming*“ zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen beteiligt, und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der gegen Tumore, Viren und Alloantigene

gerichteten zytotoxischen T-Zellen [146]. Ein Umstand der im Zusammenhang mit der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen, Atherosklerose, T-Zellabhängiger Autoimmunerkrankungen und Tumorentstehung, aber auch bei der Abstoßung von Transplantaten auftritt [147-149]. So unterdrücken Tumorzellen Immunantworten durch Suppression der CD40L-Expression. Ob eine CD40 Stimulation einen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt auf die Tumorzellen ausübt oder das Überleben und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika fördert, hängt zum einen von der Tumorart und dem Differenzierungsgrad der stimulierten Zellen, zum anderen von Stärke und Dauer der CD40 Stimulation ab [78, 88, 150, 151].

#### **2.3.2.4.1 Rolle in der Aktivierung von B-Zellen**

Dem „Zwei-Signale-Modell“ der Lymphozyten-Aktivierung zufolge, ist für eine optimale Aktivierung Antigen-spezifischer Lymphozyten, neben der spezifischen Erkennung des Antigens durch den B- oder T-Zellrezeptor Signal 1, die Interaktion kostimulatorischer Moleküle als Signal 2 erforderlich.

Voraussetzung für eine optimale B-Zellaktivierung ist eine vorgeschaltete effektive T-Helferzell-Aktivierung, die über 2 Signale vermittelt wird und zu einer Hochregulation der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40L und CD28 führt [152].

Analog zur T-Zellaktivierung erfolgt auch die B-Zellaktivierung über die Vermittlung zweier Signale. So erhalten B-Zellen ihr erstes Signal über die Erkennung und Bindung des Antigens mit Hilfe ihres Antigen-spezifischen B-Zellrezeptors. Nach Prozessierung und Präsentation des Peptid-MHC-II-Komplexes auf der Zelloberfläche kann die B-Zelle nun Kontakt mit aktivierten T-Zellen aufnehmen. Die Interaktion zwischen Peptid-MHC-Komplex der B-Zelle mit dem T-Zellrezeptor wird über akzessorische Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1/LFA-1 verstärkt, wodurch eine immunologische Synapse zur Transduktion aktivierender Signale entsteht [153, 154]. Vervollständigt wird die B-Zellaktivierung mit Übermittlung des zweiten Signals durch die Interaktion der Rezeptor-Ligandenpaare kostimulatorischer Moleküle. Einer der potentesten Stimulatoren von B-Zellen ist die Ligation von CD40 durch CD40L. Über die CD40-Ligation wird die Expression anderer kostimulatorischer Moleküle wie MHC Klasse II, CD80 und CD86 hochreguliert [155], wodurch wiederum die Antigen-Präsentation, aber auch die Aktivierung von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen gefördert wird [151].

Für die Aktivierung sind unbedingt beide Signale erforderlich. So führt eine CD40-Stimulation ohne vorherigen Antigenkontakt zu einer verstärkten Expression des

Apoptose-induzierenden Rezeptors Fas, was einen wirksamen Schutz vor Weiterentwicklung unspezifischer B-Zellen darstellt [156]. Auch das alleinige Signal über den B-Zellrezeptor nach Kontaktaufnahme mit dem Antigen ohne anschließende T-Zellhilfe induziert die Apoptose, wodurch die Weiterentwicklung autoreaktiver B-Zellen verhindert wird [138].

Morphologisch nachweisbar ist die B-Zellaktivierung bereits wenige Stunden nach Antigenkontakt anhand der Induktion verschiedener Zelloberflächenmoleküle, aber auch durch den Eintritt in den Zellzyklus und die Zunahme der Zellgröße.

#### **2.3.2.4.2 Bildung und Erhaltung germinaler Zentren**

Als Folge einer T-Zellabhängigen Antigen-spezifischen B-Zellantwort kommt es innerhalb follikulärer B-Zellzonen sekundärer lymphatischer Organe nach Antigenkontakt zur germinalen Zentrums-Reaktion, die der Affinitätsreifung der B-Zellrezeptoren, dem Immunglobulin-Klassenwechsel und letztlich dem Aufbau eines B-Zellgedächtnisses dient. Das germinale Zentrum (GC) ist eine anatomische Struktur, die durch extensive, lokale Expansion der durch Antigenkontakt aktivierten B-Zellklone entsteht und der Bildung hochaffiner Antikörper gegen eindringende Pathogene dient.

Initial wird das in der T-Zellregion der sekundär lymphatischen Organe durch interdigitierende dendritische Zellen lokalisierte, prozessierte und an MHC-Klasse II-Molekülen gebundene Antigen den T-Zellen präsentiert [157]. Daraufhin beginnen die Antigen-spezifischen T-Zellen innerhalb der T-Zellzone des lymphatischen Organs zu proliferieren. Nach Migration dieser T-Zellen in den, an das B-Zellareal angrenzenden Bereich, kommt es zum Aufbau einer immunologischen Synapse mit B-Zellen, die durch Kontaktaufnahme zu demselben Antigen ebenfalls aktiviert wurden [157]. Als Folge dieser Interaktion verbleibt ein Teil der aktivierten B-Zellen im Bereich des Primärfokus, wo es unter T-Zellhilfe zur Differenzierung zu zunächst IgM-, später auch IgG-sezernierenden Plasmablasten kommt [158-160]. Unter dem Einfluss von Signalen, die aktivierte B-Zellen über ihren Chemokin-Rezeptor BLR1 empfangen [161], migriert ein anderer Teil der aktivierten B-Zellen zusammen mit den aktivierten T-Zellen in benachbarte Follikel. Durch klonale Expansion der B-Zellen kommt es zur Ausbildung des Primärfollikels. Sowohl T-Zellen als auch die hier lokalisierten Antigen-präsentierenden follikulären dendritischen Zellen (FDC) senden Signale aus, die für Überleben, Expansion und nachfolgende Differenzierungsschritte der Antigen-spezifischen B-Zellen erforderlich sind [162].

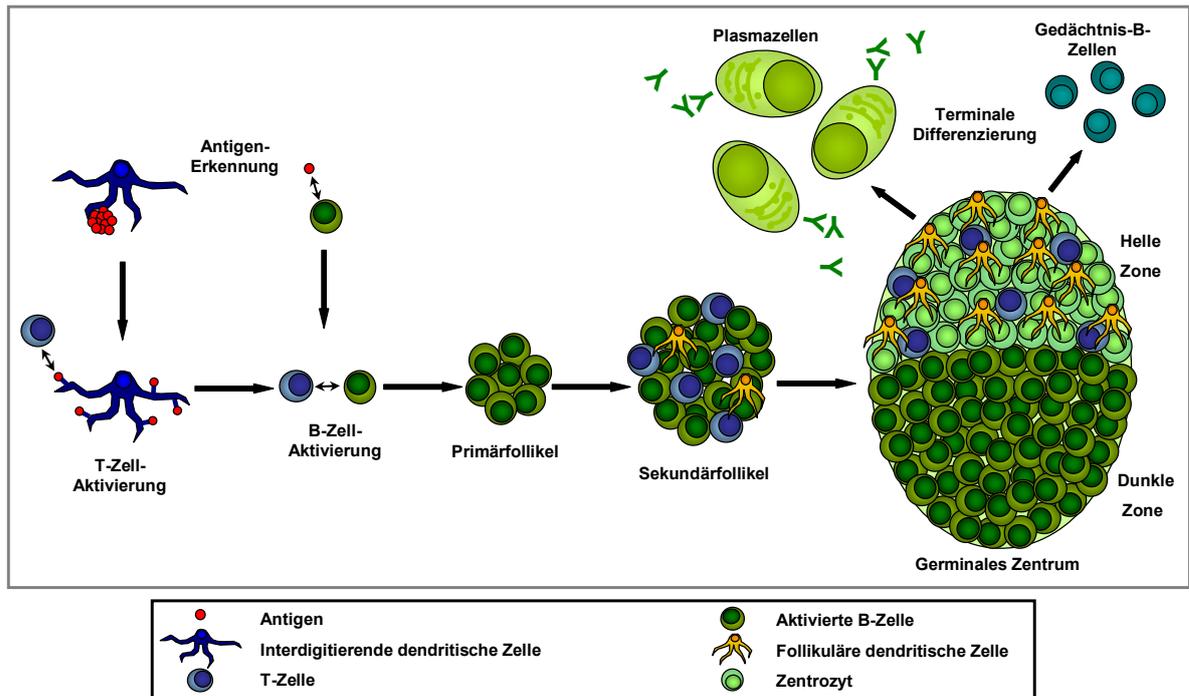


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Bildung eines germinalen Zentrums

Nach der Antigen-Erkennung und Bindung durch DCs wird dieses den naiven T-Zellen präsentiert und solche mit passendem TCR aktiviert. Aktivierte B-Zellen interagieren mit den spezifischen T-Zellen was in der klonalen Expansion der B-Zellen und Ausbildung eines Primärfokus resultiert. Durch weitere Expansion entsteht schließlich das GC mit Polarisation in eine apikale helle Zone und basale dunkle Zone. (Nach Cozine: „The primary germinal center response in mice“ [163] )

Durch anhaltende Expansion entsteht aus dem Primärfollikel zunächst der Sekundärfollikel und letztendlich das germinale Zentrum, welches als solches bezeichnet wird, sobald die Struktur eine Polarisation aufweist. Während die apikale Region des germinalen Zentrums im Bereich der Antigen-Eintrittspforte als helle Zone bezeichnet wird und neben FDCs und einer kleinen Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen überwiegend aus kleinen, sich nicht teilenden B-Zellen, den Zentrozyten aufgebaut ist [164], wird die basale Region als dunkle Zone bezeichnet und besteht hauptsächlich aus stark proliferierenden B-Zellklonen, den Zentroblasten sowie Stromazellen [159, 165]. Für die Entwicklung und den Erhalt der lymphoiden Architektur der Follikel und die sich anschließende Segregation in helle und dunkle Zone des GCs, aber auch die korrekte Positionierung der Zellen innerhalb des GCs, ist die Chemokin-Expression der Stromazellen und Chemokin-Rezeptor-Expression der motilen Zellen von größter Bedeutung [166-168]. So kommt es in der hellen Zone zur Interaktion der CXCR5 hoch exprimierenden Zentrozyten und T-Helferzellen mit den CXCL13 exprimierenden Stromazellen. In der dunklen Zone hingegen interagieren die CXCR4 hoch exprimierenden Zentroblasten mit CXCL12 exprimierenden Stromazellen [166, 169]. Dass die Position der germinalen Zentrumszellen nicht statisch ist, konnte erst

in den vergangenen Jahren mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie nachgewiesen werden. Auf diese Art und Weise konnte gezeigt werden, dass B-Zellen des germinalen Zentrums hochmotil sind und zwischen der dunklen und hellen Zone umherwandern [169].

Die strukturelle Trennung des germinalen Zentrums in zwei Bereiche spiegelt sich auch in einer funktionellen Trennung wider. So durchlaufen die Zentroblasten der dunklen Zone zunächst mehrere Zyklen der Proliferation und somatischen Hypermutation ihrer variablen Antikörpergene bis eine Arretierung des Zellzyklus eintritt und die Zelle in die helle Zone übertritt, wo es durch Selektion hochaffiner Varianten des Antigen-Rezeptors zur Affinitätsreifung kommt. Die hier lokalisierten follikulären dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit Immunkomplexe abzufangen und für lange Zeit an ihre Komplementrezeptoren gebunden festzuhalten [170], wodurch zum einen die Affinitätsreifung des B-Zellrezeptors vorangetrieben wird, zum anderen das immunologische Gedächtnis aufrecht erhalten wird [171].

Die Mehrzahl der zufällig auftretenden Mutationen im Immunglobulin-Gen führt zu einer verschlechterten Affinität gegenüber dem Antigen. Zentrozyten, die das Antigen gar nicht binden oder einen Rezeptor zu geringer Affinität aufweisen, erhalten keine für das Überleben notwendigen Signale mehr, wodurch es zur negativen Selektion mit Apoptose-Induktion kommt [172]. Sterbende Zentrozyten werden dann durch die in der hellen Zone lokalisierten Makrophagen („*tingible body macrophages*“) phagozytiert [165]. Zentrozyten dagegen, die Mutationen aufweisen, welche zu einer verbesserten Affinität des B-Zellrezeptors und dadurch stärkeren Antigenbindung führen, werden positiv selektioniert. Durch die erfolgreiche Bindung des Antigens erhalten sie über T-Zellhilfe die für Überleben und Differenzierung notwendigen Signale wie beispielsweise CD40L [173]. Positiv selektionierte Zentrozyten können wiederholt in die dunkle Zone übertreten, um weitere Zyklen der Mutation und Selektion zu durchlaufen oder zur Gedächtnis-B-Zelle oder langlebigen Plasmazelle differenzieren, die das germinale Zentrum verlässt [174].

Von großer Bedeutung für die B-Zellproliferation, aber auch die Formation und den Fortbestand germinaler Zentren ist der CD40 Signalweg [142, 143]. Dabei haben sowohl die Stärke als auch die Dauer der CD40 Stimulation großen Einfluss auf das Schicksal der Antigen-erkennenden B-Zellen. Während eine fehlende CD40-Stimulation die Formation germinaler Zentren unterbindet, kann eine überschießende CD40-Stimulation ebenfalls bewirken, dass es nicht zur Formation germinaler Zentren, sondern zur Ausbildung von kurzlebigen Plasmablasten kommt [175, 176]. Eine adäquate CD40-Stimulation begünstigt zwar die Entstehung germinaler Zentren und induziert die Expression der anti-

apoptotischen Proteine Bcl-XL und c-FLIP, wodurch die B-Zellen vor Fas-medierter Apoptose geschützt sind [177, 178], für eine terminale Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen ist CD40 jedoch ungeeignet. Durch Interaktion mit CD40L werden die B-Zellen in einem Stadium kurz vor der terminalen Differenzierung arretiert, wodurch indirekt die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen gefördert wird. Es wird vermutet, dass durch Arrest des Zellzyklus und Suppression der Antikörper-Synthese das undifferenzierte Stadium der B-Zellen des germinalen Zentrums aufrecht erhalten wird, um eine weitere Affinitätsreifung zu ermöglichen [179]. Würden hochaffine B-Zellklone bereits im germinalen Zentrum Antikörper sezernieren, hätte dies zur Folge, dass die geringen Antigenmengen, die den Selektionsprozess antreiben, sofort maskiert würden, wodurch der Selektionsprozess weitaus weniger effizient wäre. Dass aus der germinalen Zentrumreaktion dennoch Plasmazellen hervorgehen, die in die Peripherie entlassen werden, ist auf den Einfluss weiterer Zytokine wie beispielsweise IL-10 und IL-6 zurückzuführen.

### **Proliferation**

Nach Aktivierung der B-Zellen stellt morphologisch betrachtet deren Proliferation den ersten Schritt dar, der zur Formation des germinalen Zentrums führt. Die aktivierten B-Zellen innerhalb des Primärfollikels erhalten über die folliculären T-Helferzellen die für Überleben und Differenzierung notwendigen Signale. Dass die CD40-Ligation dabei einen wichtigen proliferationssteigernden Stimulus darstellt, konnte anhand von *in vitro* Studien nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass ruhende B-Zellen, die mit anti-CD40-Antikörper oder rekombinantem CD40L kultiviert werden, proliferieren, größer werden und aufgrund der erhöhten Expression an Adhäsionsmolekülen wie LFA-1/ICAM-1 und CD23/CD21 Aggregate formen [180], wohingegen neutralisierende anti-CD40L-Antikörper die Proliferation inhibieren [143].

Dass die CD40-Ligation nicht allein für die massive Expansion der B-Zellen, die zur Formation eines germinalen Zentrums führt, verantwortlich sein kann, war bereits aus den Ergebnissen zur Untersuchung des Hyper-IgM-Syndroms hervorgegangen. Denn Patienten, die an diesem Syndrom leiden, weisen unveränderte B-Zellzahlen und IgM-Titer auf, was darauf hindeutet, dass die B-Zellen trotz fehlender CD40L Stimulation in der Lage sind zu proliferieren und in reife IgM-sezernierende Zellen zu differenzieren [77].

Auch abhängig vom Differenzierungsgrad der B-Zellen hat die CD40-Ligation einen unterschiedlichen Effekt. Während naive B-Zellen ein exponentielles Wachstum zeigen und schließlich zu Gedächtnis-B-Zellen oder IgM und IgG-sezernierenden Zellen

differenzieren, kommt es in Gedächtnis-B-Zellen nicht zur Proliferation, jedoch zur Differenzierung in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen und letztendlich zum Zelltod. Auch das Wachstum von Lymphom-B-Zellen wird durch CD40 Ligation inhibiert [181]. Neben dem Differenzierungsgrad hat auch die Stimulationsdauer einen entscheidenden Einfluss. So konnten *in vitro* Studien zeigen, dass eine kurzzeitige Stimulation die Differenzierung der Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen favorisiert, wohingegen eine länger währende Stimulation die Expansion und Differenzierung naiver B-Zellen begünstigt.

Eine erhebliche Steigerung der Stärke und Dauer der Proliferation CD40L stimulierter B-Zellen konnte *in vitro* durch Zugabe weiterer Zytokine erzielt werden. So induziert die Ligation des CD40-Rezeptors auch die Empfänglichkeit der B-Zellen für verschiedene Zytokine, insbesondere IL-2  $\gamma$ -Ketten-Zytokine [182], die in der Lage sind die B-Zellproliferation und Differenzierung zu modulieren. Es bestehen jedoch Unterschiede in der proliferativen Wirkung verschiedener Zytokine in Bezug auf den Differenzierungsgrad der B-Zellen. So bewirkt eine Zugabe von IL-4 oder IL-13 die Proliferation naiver B-Zellen [183], wohingegen IL-2 und IL-10 die Proliferation aller B-Zellen steigert [184].

*In vitro* mit CD40L und IL-4 stimulierte B-Zellen sezernieren unmutiertes IgM und IgG und regulieren die Expression von dem an Prozessen wie somatische Hypermutation und Klassenwechsel beteiligten Enzym „*activation-induced cytidine deaminase*“ (AID) sowie die Oberflächenmarker von aktivierten B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen wie CD38 und CD27 hoch, nicht jedoch den Plasmazell-Oberflächenmarker CD138. Diese Zellen sind weder voll ausdifferenzierte Plasmazellen noch Gedächtnis-Zellen, sondern Zwischenstadien, wie sie auch temporär in germinalen Zentren anzutreffen sind [185].

### **Apoptotische und antiapoptotische Wirkung**

Die Apoptose in B-Zellen dient gleichermaßen der Selektion Antigen-spezifischer B-Zellen und der Eliminierung autoreaktiver B-Zellen. Sie wird über ein komplexes Netzwerk an Signalen reguliert, die B-Zellen über ihre Rezeptoren (B-Zell-Rezeptor, CD40, Fas) zu empfangen vermögen und zusätzlich über die Einwirkung bestimmter Zytokine.

Die Entscheidung ob eine B-Zelle überlebt oder in Apoptose geht ist davon abhängig, in welchem Aktivierungsstadium sich die Zelle befindet, ob zytolytische Faktoren einwirken und letztlich auch vom Grad der Signalexpression [186]. So führt die alleinige CD40-Ligation ohne B-Zellrezeptor-Signal zur Induktion einer verstärkten Fas (CD95)-

Expression auf der Zelloberfläche, wodurch die Sensitivität gegenüber einer Fas-mediierter Apoptose gesteigert wird [187, 188]. Kommt es dagegen zur simultanen Aktivierung des B-Zellrezeptors, wird dadurch die Resistenz gegenüber der Fas-mediierter Apoptose erhöht [189]. Entscheidend ist hierbei die Dauer der B-Zellrezeptor-Bindung. Eine zu lang andauernde Ligation des B-Zellrezeptors führt in immaturren B-Zellen zur klonalen Deletion [190], aber auch eine zu starke oder zu schwache Reaktivität als Ergebnis der somatischen Hypermutation der variablen Regionen der Immunglobulin-Gene wie sie im Zuge der germinalen Zentrumsreaktion auftreten kann, wird ebenfalls durch Apoptose-Induktion reguliert [191]. Dieser Effekt kann allerdings durch Zugabe von IL-4 verhindert werden [189, 192].

CD40-Aktivierung kann auch die Reexpression der Telomerase induzieren, was zu der verlängerten Lebensspanne der Gedächtnis-B-Zellen führt [193]. Eine endgültige Differenzierung aktivierter, reifer B-Zellen in Plasmazellen wird jedoch verhindert [179, 194]. Die Hochregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und MHC Klasse II, aber auch der anti-apoptotischen Gene der Bcl-Familie (Bcl-xl und Bcl2) in aktivierten B-Zellen des germinalen Zentrums, inhibiert ebenfalls die Apoptose-Induktion [140, 177, 178, 195].

In transformierten B-Zellen, wie beispielsweise in aus B-Zell-Lymphomen isolierten Zellen, konnten teilweise gegensätzliche Effekte nachgewiesen werden. So bewirkte die *in vitro* Kultivierung solcher Zellen mit CD40L eine verminderte Proliferationsrate und induzierte Apoptose [196]. In einem gesunden Organismus ruft die Aktivierung von CD40 eine zytotoxische T-Zellantwort hervor, die der Eliminierung von Lymphomen dient [197].

### **Affinitätsreifung und Klassenwechsel**

Die wichtigste Funktion der germinalen Zentrums-Reaktion besteht in der Generierung hochaffiner B-Zellen, die das germinale Zentrum am Ende der Differenzierungs- und Selektionsprozesse als Gedächtnis-B-Zellen mit hochaffinem B-Zellrezeptor oder als hochaffine Antikörper-sezernierende Plasmazellen verlassen. Neben der optimalen Anpassung der B-Zellrezeptoren an das Antigen durch den Prozess der Affinitätsreifung kommt es zur Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels von primär auf allen B-Zellen exprimiertem IgM zu den Isotypen IgG und IgA.

Hierbei stellt die somatische Hypermutation den wichtigsten Mechanismus zur Diversifizierung der variablen Regionen der Immunglobulin-Gene im Rahmen der Affinitätsreifung dar. Sowohl die leichte Kette als auch die schwere Kette des

Immunglobulins besitzt neben den *joining* (J)-Gensegmenten die *variable* (V)-Gensegmente. Daneben besitzt die schwere Kette noch die *diversity* (D)-Gensegmente. Erzeugt wird die große Diversifizierung durch die Einführung von Punktmutationen mit Hilfe des Enzyms „*activation-induced cytidine deaminase*“ (AID) [198], welches *in vivo* ausschließlich von B-Zellen des germinalen Zentrums hoch exprimiert wird [199]. In naiven B-Zellen konnte seine Expression dagegen nicht nachgewiesen werden. Erst naive B-Zellen, die Antigen-Kontakt erhielten, einen passenden B-Zellrezeptor besitzen und die nötige T-Zellhilfe erhielten beginnen AID zu exprimieren. Diese sogenannten Progerminalen Zentrumszellen stellen ein Zwischenstadium dar in der Entwicklung von der murenen naiven B-Zelle zur B-Zelle des germinalen Zentrums [200]. Auch *in vitro* konnte in stimulierten B-Zellen die Expression der AID mRNA hochreguliert werden. Als Stimulantien eignen sich LPS, IL-4 und löslicher CD40L, welche über die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und STAT6 eine Hochregulation der AID-Expression bewirken [201]. Insbesondere für IL-4 und CD40L konnte in diesem Zusammenhang ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden. An der Regulation der AID-Expression ganz entscheidend beteiligt ist aber auch der Transkriptionsfaktor Pax5.

Die Aufgabe der AID ist die Einführung von Punktmutationen durch die Desaminierung des Nukleotids Cytidin (dC) zu Uracil (dU), was bevorzugt im Bereich sogenannter AID-Hotspots auf einzelsträngiger DNA stattfindet [202, 203]. So kann dieses Enzym beispielsweise während des Transkriptionsakts seine Wirkung entfalten, wenn innerhalb der Transkriptionsblase kurze Bereiche einzelsträngiger DNA vorliegen. Agiert hierbei die AID allein, so kommt es zu Punktmutationen in Form einer Transition, was einen Austausch der Pyrimidinbase Cytidin gegen Thymin oder Uracil bedeutet. Wird dagegen das dU durch ein weiteres Enzym, die „*uracil DNA glykosylase*“ (UNG) herausgeschnitten, so kann es in der Folge auch zu Punktmutationen in Form einer Transversion kommen, was einen Austausch der Pyrimidinbase gegen eine Purinbase zur Folge hat. Die daraus hervorgehenden veränderten V-Gensegmente können zu einer gesteigerten oder verminderten Affinität gegenüber dem Antigen führen. Eine Verschlechterung der Reaktivität der Zelle hat die Induktion der Apoptose zur Folge [191]. Der Immunglobulin-Klassenwechsel, als ein Prozess bei dem B-Zellen durch einen Wechsel des Isotyps von IgM zu IgG oder IgA die Effektorfunktionen ihrer Immunglobulin-Moleküle, jedoch nicht ihre Antigen-Spezifität ändern, tritt als Antwort auf Antigen-Stimulation und kostimulatorische Signale auf [144]. Voraussetzung für die Induktion der „*class switch recombination*“ (CSR), also dem Immunglobulin-

Klassenwechsel ist auch hier die Stimulation von B-Zellrezeptoren und CD40- und/oder Toll-like Rezeptoren (TLR).

Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zu einem Austausch der konstanten Region der schweren Ketten ( $C_H$ ) des Immunglobulin-Gens durch intrachromosomale Deletion und DNA-Rekombination [204] innerhalb der sogenannten „*switch*“ (S)-Regionen des Immunglobulin-Gens. Im Bereich dieser DNA-Sequenzen, die mit Ausnahme des  $C\delta$  jedem C-Gensegment der schweren Ketten vorgeschaltet sind, initiiert wiederum das Enzym AID die Rekombinationsprozesse, indem es Cytidine desaminiert und zu Uracil konvertiert [198]. Mit Hilfe der UNG wird Uracil herausgeschnitten, wodurch basenfreie Stellen entstehen [205]. Erst jedoch durch ein drittes Enzym, die „*apurinic/apriminic endonuclease*“ (APE1) kommt es zur Durchtrennung des Phosphat-Rückgrats und damit zum Einzelstrangbruch der DNA [206]. Da die AID beide Einzelstränge attackiert, können so nah beieinander liegende Einzelstrangbrüche entstehen, die durch sogenannte „*mismatch repair proteins*“ in DNA-Doppelstrangbrüche konvertiert werden [207]. Mit Hilfe einer Vielzahl weiterer zumeist ubiquitärer Enzyme wird eine „*end joining*“ Rekombination durchgeführt [208] und das verbliebene C-Gensegment mit den V(D)J-Gensegmenten vereinigt.

Zur Festlegung auf ein bestimmtes C-Gensegment, und damit auf eine bestimmte Immunglobulin-Klasse, kommt es durch Einwirken des CD40L und weiterer von T-Helferzellen und dendritischen Zellen sezernierten Zytokinen [209]. Durch Bindung der Zytokine an Zytokin-responsive Elemente der den S-Regionen vorgeschalteten Keimbahn-Promotoren kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B oder STAT6 [210]. So induzieren beispielsweise IL-4 und IL-13 in humanen B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgG4 und IgE [211], TGF- $\beta$  zu IgA [209] und IL-2 und IL-10 zu IgM, IgG1 und IgA [184].

Zur Initiierung des Klassenwechsels ist aber auch unbedingt Proliferation erforderlich. So ist ein Minimum von 2 kompletten Zellteilungen für einen Wechsel zu IgG oder IgA notwendig [210]. Ursache hierfür ist die stark zellteilungsbezogene Expression des Enzyms AID, welches den Prozess des Isotypenwechsels einleitet. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von AID nur dann zu einer erhöhten Frequenz des Immunglobulin-Klassenwechsels führt, wenn gleichzeitig die Frequenz der Zellteilungen gesteigert wurde [211]. Umgekehrt konnte in stimulierten, aber dennoch ruhenden B-Zellen zwar AID-Expression nachgewiesen werden, zum Klassenwechsel kam es jedoch nicht [212]. AID ist somit essentiell für den Immunglobulin-Klassenwechsel. Defekte in

der Expression führen zu schwerer Immundefizienz. So konnten als Ursache für die autosomale Variante des „*X-linked Hyper-IgM-Syndrome*“ Mutationen im AID-Gen nachgewiesen werden [213].

Am Ende des langen Differenzierungs- und Selektionsprozesses der B-Zellen steht die terminale Differenzierung zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle. Diese kann nach Antigen-Kontakt sowohl aus naiven Marginalzonen-B-Zellen, folliculären B-Zellen, B-Zellen des GCs, als auch aus den Gedächtnis-B-Zellen hervorgehen [2]. Ob und welche dieser genannten B-Zell-Subpopulationen diese abschließende Differenzierung erfährt, hängt sehr stark von der Art des Antigens, der Dosis und der Lokalisation des Zusammentreffens ab [213]. So reagieren die in Pleura und Peritoneum lokalisierten B1-Zellen bevorzugt auf T-Zellunabhängige Antigene und bilden die erste Stufe einer Immunabwehr gegen eingedrungene Pathogene durch Sekretion ihrer präformierten „natürlichen“ Antikörper. Nach Aktivierung durch Antigen-Kontakt migrieren sie zur Milz, in welcher sie zur Plasmazelle differenzieren. Auch die im Marginalsinus der Milz lokalisierten B-Zellen reagieren bevorzugt auf T-Zellunabhängige Antigene [214], insbesondere Bakterien, die im Blut zirkulieren. Nach Antigen-Kontakt kommt es zur Migration dieser an sich sessilen B-Zellen in die rote Pulpa der Milz mit anschließender massiver Proliferation und Ausbildung von Foci innerhalb derer eine Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmablasten erfolgt. Zirkulierende mature folliculäre B-Zellen (B2-Zellen) sind in der Lage nach Antigen-Kontakt und T-Zellhilfe eine plasmazytäre Differenzierung zu durchlaufen. Auch hier kommt es zur Proliferation und Ausbildung von extrafolliculären Foci, innerhalb sekundärer lymphatischer Organe mit Differenzierung in Plasmablasten oder kurzlebige Plasmazellen. Während dieser frühen extrafolliculären Immunantwort gebildete Antikörper-sezernierende B-Zellen können einen Klassenwechsel durchlaufen, besitzen jedoch keine somatisch mutierten Immunglobulingene. Erst die Formation germinaler Zentren ermöglicht die Generierung hochaffiner B-Zellen. Im Rahmen der GC-Reaktion kommt es auch zum Aufbau eines humoralen Gedächtnisses als zweite Stufe der Immunabwehr [215, 216].

Während aus der extrafolliculären Immunantwort ausschließlich kurzlebige Plasmazellen hervorgehen, kommt es während der germinalen Differenzierung zur Ausbildung langlebiger Plasmazellen, die in Überlebens-Nischen im Knochenmark, in geringem Umfang auch in Milz und Lymphknoten verweilen und durch Kontaktaufnahme zu Stromazellen die für das Überleben notwendigen Signale erhalten. Die lange Lebensdauer dieser Zellen wird über Hochregulation anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl2 und Mc11

mediert [217]. Da der Platz begrenzt ist, werden im Fall einer akuten Infektion die in den Nischen angesiedelten langlebigen Plasmazellen vertrieben und damit Platz für neue Plasmazellen geschaffen [218].

Obwohl Plasmazellen weniger als 1% der Zellen in lymphatischen Organen repräsentieren, sind sie allein für die Produktion der großen Mengen an im Körper zirkulierenden Antikörpern verantwortlich. Bis heute ist wenig darüber bekannt, welche intrinsischen und extrinsischen Faktoren für ihren Erhalt wichtig sind. Sicher ist jedoch, dass ihre Bildung streng kontrolliert werden muss, da eine Fehlregulation zu Autoimmunität oder Bildung multipler Myelome führen kann.

Zur Initiierung der Plasmazell-Differenzierung ist neben dem Antigen-Kontakt auch T-Zellhilfe notwendig. So ist als zweites Signal zur Aktivierung der follikulären B-Zellen eine CD40L-Stimulation erforderlich. Diese bewirkt aber nur im begrenzten Umfang eine Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen. Weder Zytokine allein, noch die CD40-Aktivierung allein ist ausreichend, eine terminale Differenzierung in hochaffine Antikörper-sezernierende Plasmazellen zu initiieren. Erst die Kombination dieser von T-Zellen oder dendritischen Zellen sezernierten Zytokine wie Interleukine haben einen verstärkenden Effekt und können auch *in vitro* eine Differenzierung fördern. Die CD40L-Stimulation ist essentiell für die Formation und den Erhalt der GCs, und fördert die Ausbildung von Gedächtnis-B-Zellen und den Klassenwechsel, muss jedoch für die terminale Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen beendet werden [179, 194]. So konnte gezeigt werden, dass erst die Unterbrechung des CD40-Signals bei fortgesetzter Stimulation mit Interleukinen wie beispielsweise IL-10 und IL-2, zur terminalen Differenzierung führt [194].

### **2.3.2.5 Einfluss des CD40-CD40L-Systems auf Transkriptomebene**

Ein Schwerpunkt der Forschung der vergangenen Jahre lag auf der molekularen Ebene der Plasmazell-Differenzierung. Man ging dabei zunächst von einem Wettstreit zweier Gruppen von Transkriptionsfaktoren aus. Auf der einen Seite die Faktoren Pax5 und Bcl6, die für die Aufrechterhaltung der B-Zellidentität verantwortlich sind; auf der anderen Seite die Faktoren Blimp1 und Xbp1, die für die Festlegung auf die Entwicklung zur Plasmazelle verantwortlich sind [219]. Nach diesem Schema ist Blimp1 allein notwendig und ausreichend, die Plasmazell-Differenzierung zu initiieren. Von diesem Modell wird aber zunehmend Abstand genommen, seitdem gezeigt werden konnte, dass auch in Blimp1-defizienten B-Zellen eine Plasmazell-Differenzierung möglich ist, und ein Stadium der „Prä-Plasmazelle“ identifiziert wurde, gekennzeichnet durch eine verminderte Pax5-

Expression vor Hochregulation der Blimp1-Expression [220]. Im Folgenden soll auf die Funktion der drei wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der B-Zell-Differenzierung eingegangen werden.

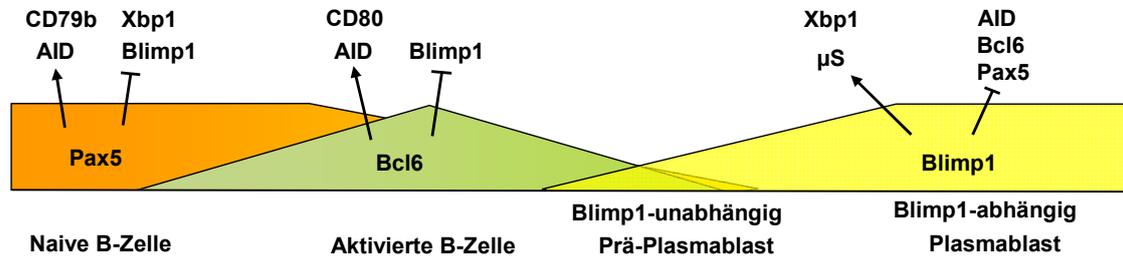


Abbildung 2.5 Regulation der Plasmazell-Differenzierung auf Transkriptomebene

Dargestellt sind die verschiedenen B-Zellstadien von der naiven B-Zelle bis zur Plasmazelle sowie die damit verbundenen genetischen Interaktionen der Transkriptionsfaktoren Pax5, Bcl6 und Blimp1. ↑ bedeutet einen positiven Einfluss auf die Expression, ⊥ weist auf eine repressive Aktivität hin.

(Nach Kallies: *Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp1* [220])

### Pax5 (paired box protein 5), der "key regulator of lineage identity"

Pax5, erstmals identifiziert als ein DNA-bindender Faktor, der mit den für die schwere (Ig<sub>H</sub>) und leichte Kette (Ig<sub>κ</sub>) kodierenden DNA-Segmenten des Immunglobulin-Genes interagiert [221], gilt als der Hauptregulator der B-Zellidentität und frühen B-Zellentwicklung [222].

Pax5 ist einer von 9 beim Säuger identifizierten Transkriptionsfaktoren der Pax-Familie und wird als einziger im hämatopoietischen System exprimiert. Das kennzeichnende Merkmal dieser Protein-Familie ist eine konservierte gepaarte Domäne („paired domain“), die als eine zweigeteilte DNA-Bindungsregion fungiert und jeweils N- und C-terminale Subdomänen besitzt. Jede dieser Subdomänen beinhaltet ein „homeodomain-like Helix-turn-Helix“-Motiv, welches an definierten Stellen der Pax5-Erkennungssequenz der DNA-Helix bindet [223]. So ist die alleinige Bindung der N-terminalen gepaarten Domäne ausreichend, um verschiedene Proteine der Ets-Familie, wie z.B. CD79a (Igα), zu rekrutieren und damit dessen Expression zu steigern [224]. Pax5 kann als Transkriptions-Aktivator oder als ein Transkriptions-Repressor wirken. Die Regulation der Transkriptions-Aktivität hin zum Aktivator erfolgt hierbei über eine Interaktion von Histon-Acetyltransferasen mit einer C-terminalen Transaktivierungs-Domäne. Die Regulation hin zum Transkriptions-Repressor erfolgt dagegen über die Interaktion von Korepressoren der Groucho Proteinfamilie, die Teil eines großen Histon-Deacetylase-Komplexes sind, mit einem konservierten Oktapeptid-Motiv des Pax5 [225].

Die Festlegung der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zelllinie, mit Verlust der Plastizität zur Umdifferenzierung, wurde bisher als ein unidirektionaler und irreversibler Prozess angesehen [226]. Neueste Studien zeigen jedoch, dass eine Umorientierung hämatopoietischer Zellen durch ektopes Zytokin-Signaling oder forsierte Expression der linienspezifischen Transkriptionsfaktoren möglich ist [227].

Pax5 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zugehörigkeit hämatopoietischer Vorläuferzellen zur B-Zelllinie festlegt. Er ist essentiell für die fetale und adulte B-Lymphopoese [228] und insbesondere für die Entwicklung der Pro-B-Zelle zur maturaen B-Zelle [229]. Pax5 fungiert jedoch nicht als ein „*Master-Regulator*“, da er unfähig ist hämatopoietische Stammzellen und erythro-myeloide Vorläuferzellen auf die Differenzierung zur B-Zelle festzulegen. So ist er innerhalb der transkriptionellen Hierarchie den Transkriptionsfaktoren PU.1, Ikaros, E2A und EBF1 nachgeschaltet, was mit Hilfe Pax5-defizienter Pro-B-Zellen gezeigt werden konnte [228]. Lediglich auf lymphoide Vorläuferzellen kann er einwirken und zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren eine Entwicklung entlang der B-Zellschiene induzieren. Neben Pax5 sind die IL-7-Rezeptor-Stimulation [230] und die Expression der Transkriptionsfaktoren E2A und EBF1 absolut essentiell [231]. Das Fehlen der Faktoren E2A und EBF1 bewirkt eine Blockade der Entwicklung zur B-Zelle, wohingegen das Fehlen von Pax5 eine Arretierung im Stadium der Prä-Pro-B-Zelle zur Folge hat [232]. Diese Zellen behalten den Phänotyp einer frühen B-Zelle, charakterisiert durch die Expression B-Zellspezifischer Gene wie CD79b (Ig $\beta$ ), IgL, VpreB1 und D-J-Rekombination im IgH-Lokus [233]. In diesem Stadium ist auch *in vivo* durch Substitution von IL-7 und weiteren Zytokinen eine Umdifferenzierung in funktionelle Makrophagen, Granulozyten, DC, natürliche Killerzellen, Osteoklasten [232] oder T-Lymphozyten möglich [234, 235].

Auf molekularer Ebene erfüllt Pax5 zwei Aufgaben: die Repression der B-Zellunspezifischen Gene [236] und die Aktivierung der Expression B-Zellspezifischer Gene während der gesamten B-Zellentwicklung [237]. Erst bei terminaler Differenzierung oder in maturaen Pax5-inaktivierten B-Zellen erfolgt eine Reexpression der B-Zellunspezifischen Gene [236].

Mikroarray-Analysen identifizierten insgesamt über 170 durch Pax5 aktivierte Gene und über 110 von Pax5 reprimierte Gene, die für regulatorische und strukturelle Proteine kodieren, und die an Prozessen wie B-Zell-Signaltransduktion, Adhäsion, Migration, Antigen-Präsentation und GC-Formation beteiligt sind [236]. So partizipiert Pax5 am Zusammenfügen des Prä-B-Zellrezeptor-Komplexes durch Aktivierung der Expression der

$\mu$  Kette und Kontrolle des zweiten  $V_H$ - $J_H$ -Rekombinationsschrittes des IgH-Gens [228, 238]. Es fördert die Gen-Expression der am Prä-B-Zell-Signalweg beteiligten Komponenten, wie dem kostimulatorischen Rezeptor CD19, der Signal-Transduktionskette CD79a (Ig $\alpha$ ) und dem zentralen Adaptor-Protein BLNK, aber auch von VpreB1 [228]. Zu den von Pax5 reprimierten Genen zählen neben den Genen die für die Multipotenz hämatopoietischer Zellen verantwortlich sind auch Notch1, das lymphatische Vorläuferzellen auf die T-Zellentwicklung festlegt [239].

Auch Prozesse wie somatische Hypermutation, Immunglobulin-Klassenwechsel und Genkonversion werden über Pax5 reguliert. So konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der AID-Expression und der Pax5-Expression aufgezeigt werden [240].

Der letzte Schritt der B-Zellentwicklung ähnelt dem Wechsel der Zelllinien-Zugehörigkeit. Während B-Zellen im Falle der Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle ihre B-Zellidentität beibehalten, kommt es bei der Differenzierung in Plasmazellen zu einem schnellen und radikalen Wechsel ihres Gen-Expressions-Programms. Initiiert durch eine effiziente B-Zellrezeptor-Stimulation über Antigenkontakt [219] wird Pax5 während der terminalen Differenzierung von der muren B-Zelle zur Plasmazelle reprimiert [236]. Dies ist erforderlich, da eine Vielzahl der Pax5-reprimierten Gene für eine Plasmazell-Differenzierung unbedingt erforderlich ist. Neben Pax5 ist Bcl6 an der Suppression der Blimp1-Expression und damit am Erhalt der B-Zellidentität beteiligt [241]. Hier konnte allerdings eine wechselseitige Repression zwischen Pax5 und Blimp1 nachgewiesen werden [242]. Bei Repression von Pax5 kommt es zur verstärkten Expression des entscheidend an der Induktion der Ig-Sekretion beteiligten Transkriptionsfaktors Xbp-1 [241]. So zeigen Pax5-defiziente B-Zellen eine erhöhte IgM-Sekretion.

### ***Bcl6 (B cell lymphoma 6), der „key regulator of germinal center B cell differentiation“***

Bcl6, zuerst als Proto-Onkogen mit Beteiligung an chromosomalen Verlagerungen in verschiedenen B-Zell-Lymphomen identifiziert, gehört der Zinkfinger-Familie der Transkriptionsfaktoren an [243]. Dieses nukleäre Phosphoprotein bindet über seine 6 Zinkfinger-Motive spezifisch an der DNA und kann so unter Rekrutierung weiterer Korepressor-Moleküle seine Wirkung als Transkriptions-Repressor entfalten [244]. Die von Bcl6 regulierten Zielgene sind an Prozessen wie Lymphozyten-Aktivierung, Differenzierung, Zellzyklus, Apoptose und Entzündung beteiligt, wobei in vielen Fällen nicht klar ist, ob Bcl6 direkt oder indirekt in die Transkription dieser Gene eingreift.

Da in B-Zellen die höchste Expression in maturen B-Zellen des germinalen Zentrums auftritt [245], keine oder nur eine geringe Bcl6-Expression dagegen in naiven prä-GC B-Zellen und in post-GC Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen nachweisbar ist [245, 246], wird davon ausgegangen, dass Bcl6 für die Formation und den Erhalt von germinalen Zentren erforderlich ist [247]. So konnte gezeigt werden, dass Bcl6-defiziente Mäuse keine germinalen Zentren aufweisen und infolgedessen keine affinitätsgereiften Antikörper bilden können [247]. Die zwei wichtigsten Funktionen, die Bcl6 innerhalb der germinalen Zentren erfüllt, sind das Vorantreiben des Zellzyklus und die Inhibition der terminalen Differenzierung. Über hohe Bcl6-Expression kann auf diese Weise der Phänotyp des Zentrozyten aufrechterhalten werden. Der Zellzyklus wird durch eine Förderung der Proliferation und Unterdrückung der zellintrinsicen Antwort auf die im Rahmen von somatischer Hypermutation und Klassenwechsel auftretenden DNA-Schäden vorangetrieben und die Induktion der Apoptose verhindert [248]. Wird jedoch eine gewisse Grenze der DNA-Schädigung überschritten, so werden Gene wie „*ataxia telangiectasia mutated*“ (ATM) aktiviert, die eine Phosphorylierung und Degradation des Bcl6 bedingen und so die Wiederherstellung der Antwort auf DNA-Schäden bewirken [249]. Eine positive Regulation der Bcl6-Expression wird über den Transkriptionsfaktor IRF8 erreicht, der einerseits über den STAT5-Signalweg die Bcl6-Transkription steigert, andererseits auch das Bcl6-Protein stabilisiert [250]. Auch über die Aktivierung von STAT3 durch das von folliculären T-Helferzellen sezernierte Zytokin IL-21 kommt es zu einer verstärkten Bcl6-Expression [251].

Eine negative Regulation der Bcl6-Level wird über verschiedene Mechanismen wie beispielsweise Zellteilung, B-Zellrezeptor-Stimulation, CD40-Ligation oder mitogene Stimulation herbeigeführt und ermöglicht so, abhängig von Zeitpunkt, Dauer und Stärke des Stimulus, die Differenzierung der B-Zelle. Kombinationen, die Bcl6 herunter- und gleichzeitig Blimp1 hochregulieren, begünstigen die Differenzierung zur Plasmazelle, solche, die Bcl6 herunterregulieren ohne Blimp1 zu induzieren, begünstigen dagegen die Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle [252]. So führt eine B-Zellrezeptor-Stimulation zur Aktivierung der MAP-Kinase, was eine Phosphorylierung und Degradation über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg [253] des Bcl6 zur Folge hat [254], während es nach CD40-Stimulation zur NFκB-Aktivierung und daraus resultierender verstärkter IRF4-Expression kommt. Aufgrund der antagonistischen Wirkung der Blimp1-Expression auf die Bcl6-Expression bewirkt der Transkriptions-Aktivator IRF4 mit Induktion der Blimp1-Expression indirekt eine Bcl6-Repression [255].

Bcl6 besitzt die Fähigkeit die Transkription spezifischer Zielgene dadurch zu reprimieren, indem es an dieselbe Stelle bindet, an die normalerweise der Transkriptions-Aktivator STAT6 bindet, der hauptsächliche Effektor des IL-4-induzierten Signalwegs. Dadurch ist Bcl6 beispielsweise auch in der Lage die STAT6-mediierte, IL-4-induzierte Expression von Immunglobulin- $\epsilon$ -Keimbahn-Transkripten zu reprimieren und kann damit den Klassenwechsel zu IgE modulieren [256].

Als ein direktes Zielgen wurde beispielsweise CD80 (B7-1) identifiziert. Dieser wichtige Kostimulator für B-/T-Zellinteraktionen [257] wird in naiven, neoplastischen, aber auch frühen GC-B-Zellen nur in sehr geringer Menge [258], in aktivierten B-Zellen, späten Zentrozyten und Gedächtnis-B-Zellen dagegen sehr hoch exprimiert [257]. Bcl6 bindet direkt an die CD80-Promotorregion und entfaltet eine stark inhibitorische Wirkung auf die NF $\kappa$ B-induzierte Transkription, ohne dabei die NF $\kappa$ B-Bindung zu behindern. Eine Aktivierung der B-Zelle über den CD40-Signalweg führt zur Bcl6-Repression und ermöglicht so die Transkription CD40-induzierter und NF $\kappa$ B-mediiertes Gene [259]. Damit kommt Bcl6 die Aufgabe der Prävention einer prämaturnen oder unterschwelligen NF $\kappa$ B-abhängigen Transkription vor Auftreten eines optimalen CD40-Signals zu. Über die Inhibition der CD80-Expression wird die B-/T-Zellinteraktion noch nicht ausreichend expandierter und selektierter GC-B-Zellen verhindert. Ein Umstand der allerdings bei konstitutiver Bcl6-Expression auch zur Entstehung von Lymphomen beitragen kann [258].

Um eine Plasmazell-Differenzierung zu ermöglichen muss der Transkriptionsfaktor Blimp1 die Vorherrschaft gewinnen. Hierzu ist eine Repression der Transkriptionsfaktoren Pax5 und Bcl6 notwendig, da diese den B-Zell-Phänotyp aufrecht erhalten [219]. Unklar ist jedoch, ob für die Plasmazell-Differenzierung unbedingt eine komplette Repression der B-Zellspezifischen Transkriptionsfaktoren notwendig ist, da in Experimenten Bcl6-positive Plasmazellen nachgewiesen werden konnten [260].

Induktoren der Plasmazell-Differenzierung und damit der Bcl6-Repression sind neben B-Zellrezeptor und CD40-Stimulation auch Mitogene und Zytokine. So hat die Stimulation mit LPS und CpG [261] einen reprimierenden Effekt [262], aber auch das im Rahmen von T-Zellantworten gebildete IL-21 [263] ist in der Lage über Aktivierung des STAT3-Signalweges die Blimp1-Expression hochzuregulieren und damit indirekt die Bcl6-Expression herunterzuregulieren [264], was für die effektive Plasmazell-Bildung nach Immunisierung essentiell ist. Die *in vitro* Stimulation mit verschiedenen Kombinationen dieser Induktoren führt nicht zwangsläufig zur Generierung von Plasmazellen. So kann bei Repression von Bcl6 mit gleichzeitiger Expression von Blimp1 die Plasmazell-

Differenzierung, bei ausbleibender Blimp1-Expression dagegen die Generierung von Gedächtnis-B-Zellen favorisiert werden.

### **Blimp1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), der “master regulator of plasmacell differentiation”**

Blimp1, auch PRD1BF-1 („*positive regulatory domain 1-binding faktor 1 of the human IFN- $\beta$ -promotor*“), vor 16 Jahren als Transkriptions-Repressor des IFN- $\beta$ -Promotors identifiziert [265], konkurriert mit den beiden IFN-Regulatoren IRF-1 und IRF-2 um dieselbe Bindungsstelle am IFN- $\beta$ -Promotor. Blimp1 gehört wie auch Bcl6 zu den Transkriptionsfaktoren der Zinkfinger-Familie, besitzt aber einzigartige, nicht-redundante Funktionen [266]. Seine 5 Zinkfinger-Motive am C-Terminus fungieren als DNA-Bindungs-Domänen, wobei nur die beiden ersten Domänen für die Erkennung und Bindung der Promotor-Region notwendig sind [267]. Daneben besitzt es eine, die transkriptionelle Repression mediierende Prolin-reiche, N-terminale Region, die für die Assoziation mit dem transkriptionellen Korepressor hGroucho und Histon-Deazetylasen zuständig ist; sowie eine PR-Domäne, die in der Lage ist, ein Protein mit Histon-Methyltransferase-Aktivität zu rekrutieren [268]. Daraus wird ersichtlich, dass die reprimierende Funktion auf der Rekrutierung von Protein- und Korepressor-Komplexen beruht, die Blimp1 in die Lage versetzen die Histon-Proteine der zu reprimierenden Gene durch Deazetylierung und Methylierung so zu modifizieren, dass eine geschlossene, repressive Chromatin-Struktur entsteht.

Seine wichtigste Funktion ist die terminale Differenzierung der maturen B-Zelle zur Plasmazelle [219], wobei für deren Initiierung Blimp1 nicht unabdingbar ist, da gezeigt werden konnte, dass Blimp1-defiziente B-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zur Antikörper-Produktion fähig waren. Mit Hilfe einer Mauslinie mit konditionellem Blimp1-Knock-out konnte so gezeigt werden, dass der terminalen Differenzierung vorgeschaltete Schritte unverändert ablaufen. Erst ab dem Stadium der Immunglobulin-Sekretion wird der Einfluss ersichtlich. Die Sekretion aller Isotypen ist stark reduziert und die germinalen Zentren sind vergrößert, was auf eine Blockade der Entwicklung ab dem späten GC- und post-GC-Stadium hindeutet [269].

Seine Expression beschränkt sich fast ausschließlich auf Plasmablasten und Plasmazellen, wobei die Stärke der Blimp1-Expression sehr stark mit dem Differenzierungsgrad der Plasmazellen korreliert. Aus einer sekundären Immunantwort hervorgegangene Plasmazellen weisen eine stärkere Expression auf, als die im Rahmen primärer Immunantworten gebildeten Plasmazellen. Daneben konnte bei einer kleinen Population

von ca. 1-5% unstimulierten oder nur IL-4-stimulierten B-Zellen [270] sowie 5-15% der GC-B-Zellen eine geringe Blimp1-Expression nachgewiesen werden [271]. Während in Gedächtnis-B-Zellen kein Blimp1 nachweisbar ist [272], ist die Blimp1-Expression der langlebigen Plasmazellen in Milz und Knochenmark für das Überleben dieser Zellen essentiell [273]. In B-Zellen der frühen B-Zellstadien führt die forsierte Blimp1-Expression zum Zelltod, weil Blimp1 in immaturren oder nur teilweise aktivierten B-Zellen Apoptose induzieren kann [274].

Seine Expression kann durch verschiedenste Stimuli wie Antigene, Mitogene und Zytokine induziert werden, wobei neben dem B-Zelldifferenzierungsstadium auch die Art, Stärke und Dauer des Signals einen entscheidenden Einfluss auf die Blimp1-Expression hat. Allen voran sind hier LPS, CpG, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-21 zu nennen [275]. Die Kostimulation mit CD40L führt hingegen zu einer massiven Reduktion der Blimp1-Expression, was sowohl in primären B-Zellen als auch in der murinen B-Zelllinie CH12 nachgewiesen werden konnte [270]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Unterbrechung des von Mitogenen und Zytokinen verwendeten Signalwegs, durch Aktivierung und Bindung von Repressor-Faktoren an die Promotor-/Enhancer-Region dieser Gene oder durch Suppression kernregulatorischer Gene, nach erfolgreicher CD40-Ligation sein.

Blimp1 ist daneben ganz entscheidend an der Ig-Sekretion beteiligt. Während aktivierte, aber undifferenzierte B-Zellen äquimolare Mengen des sekretorischen Gen-Produkts  $\mu$ S (sekretorische Form der schweren Kette des IgM) und des nicht an der Synthese sekretorischer Immunglobuline beteiligten Gen-Produkts  $\mu$ M (membrangebundene Form der schweren Kette des IgM) exprimieren [276], kommt es durch eine Stimulation der B-Zellen mit Mitogenen oder Zytokinen, wie LPS, IL-5 oder IL-6 ohne CD40-Ligation zu einer verstärkten Expression von  $\mu$ S-mRNA bei unveränderter Expression der  $\mu$ M-mRNA. Eine CD40-Stimulation hingegen reprimiert die sekretorischen Gen-Produkte, wodurch eine Fortsetzung des Selektionsprozesses im germinalen Zentrum ermöglicht wird [179].

Hinsichtlich der Blimp1 aktivierenden Signale gibt es spezie-spezifische Unterschiede. So bewirken in B-Zellen der Maus B-Zellrezeptor-, CD40- und IL-4-Signale eine Blockade der LPS-induzierten Blimp1-Induktion, wohingegen dieselben Signale in humanen B-Zellen die Expression von IL-21 und dadurch die Blimp1-Expression induzieren [263]. Die Blimp1-Expression wird dabei in erster Linie auf der Ebene der Transkriptions-Initiation reguliert [277]. So aktivieren „*pattern recognition receptors*“ den NF $\kappa$ B-Weg und Zytokine den STAT3-Signalweg, die jeweils als Blimp1-Transkriptions-Aktivatoren

wirken.

Eine negative Regulation der Blimp1-Expression erfolgt über Bcl6. Dieses kann einerseits zusammen mit seinem Korepressor MTA3 direkt an den für Blimp1-kodierenden Genlokus binden, andererseits über den Transkriptions-Regulator AP-1 die Expression indirekt beeinflussen [278].

Genexpressions-Analysen identifizierten über 250 Gene die durch Blimp1 beeinflusst werden [262]. Diese lassen sich drei Programmen zuordnen: das Proliferations-Programm, welches z.B. c-myc [279] und andere Gene beinhaltet, die für den Eintritt in den Zellzyklus und die Zellteilung wichtig sind und durch Blimp1 reprimiert werden; ein Programm, das in die Ig-Sekretion involviert ist, unter anderem J chain, Xbp-1, sowie Ig<sub>H</sub>- und Ig<sub>L</sub>-Gene beinhaltet, die durch Blimp1 induziert werden; und ein Programm das für aktivierte und GC-B-Zellen charakteristisch ist, das AID, kostimulatorische Moleküle und Chemokin-Rezeptoren kodierende Gene, aber auch Transkriptionsfaktoren wie Pax5 und Bcl6 beinhaltet, die durch Blimp1 ebenfalls reprimiert werden [219].

Zu den über Blimp1 induzierten Genen gehört auch der ubiquitär exprimierte Transkriptions-Aktivator Xbp-1, der die Aktivierung multipler an der Immunglobulin-Sekretion beteiligter Gene fördert. Xbp-1 ermöglicht es den Zellen durch Induktion der „*unfolded protein response*“ dem enormen Stress standzuhalten, der im Zusammenhang mit der massiven Antikörper-Produktion, -Faltung und -Sekretion im endoplasmatischen Retikulum auftritt [280]. Neben der Blimp1-Induktion scheint hierbei aber auch die Pax5-Repression einen entscheidenden Einfluss zu haben [281].

Auch die Expression der Blimp1-Gegenspieler Bcl6 und Pax5, die innerhalb der naiven B-Zellen und GC-B-Zellen die plasmazytäre Differenzierung reprimieren, wird direkt durch Blimp1 reprimiert und umgekehrt [242].

Von dem ursprünglichen Modell der direkt miteinander konkurrierenden Transkriptionsfaktoren wird zunehmend abgewichen, seitdem gezeigt werden konnte, dass ein B-Zellstadium mit bereits reprimiertem Pax5 bei gleichzeitig noch nicht nachweisbarer Blimp1-Expression existiert – der sogenannte Präplasmablast. Dies deutet darauf hin, dass die Plasmazelldifferenzierung durch eine Änderung der Pax5-Aktivität initiiert wird, wohingegen Blimp1 der Konsolidierung und Amplifizierung des Differenzierungsschrittes dient [220, 282].

Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass Blimp1 auch von T-Zellen exprimiert wird. Vor allem Antigen-stimulierte T-Zellen und regulatorische T-Zellen exprimieren Blimp1 hoch. Es scheint dabei weniger einen Einfluss auf die T-Zellentwicklung als vielmehr auf die T-

Zellfunktion zu haben. So bedingt die fehlende Blimp1-Expression in T-Zellen die Entwicklung einer inflammatorischen Erkrankung in Form einer Colitis [283, 284].

### 2.3.2.6 CD40-CD40L im Huhn

Trotz vieler Ähnlichkeiten bestehen auch große Unterschiede zwischen dem Immunsystem der Vögel und dem der Säuger. Diese Unterschiede beziehen eine Reihe von immunregulatorischen Molekülen mit ein, zu denen auch die Mitglieder der TNF-/TNF-Rezeptor-Familie zählen. So konnten bislang beim Huhn weder TNF- $\alpha$  noch Lymphotoxin- $\alpha$  nachgewiesen werden [285]. Aufgrund der frühen phylogenetischen Aufzweigung in die Klasse der Vögel und der Säuger ist davon auszugehen, dass die inzwischen identifizierten orthologen Mitglieder dieser Superfamilie neben strukturellen auch funktionelle Unterschiede aufweisen. Für einige der bereits identifizierten Mitglieder, wie Fas/FasL, Ox40L, Trail/TrailL, CD30/CD30L [286], Rank/RankL [287], konnten jedoch zum Säuger analoge Funktionen nachgewiesen werden. Daneben gelang es auch die orthologen Moleküle BAFF [31] und CD40/CD40L [48] beim Huhn nachzuweisen. Neben ähnlichen Effekten auf die B-Zellhomöostase konnten jedoch für Hühner-BAFF deutliche Unterschiede hinsichtlich der BAFF-bindenden Rezeptoren und der BAFF-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden [31, 32, 288].

Vor einigen Jahren konnten beim Huhn mit Hilfe von Sequenzanalysen einer EST-Datenbank, die dem Säuger ähnlichen Sequenzen für CD40 und CD40L identifiziert werden. Diese Sequenz des Hühner-CD40L (ChCD40L) weist eine Homologie von 44 bis 49% zu Säuger-Sequenzen auf, wobei die größte Ähnlichkeit zur Sequenz der Maus besteht. Im Bereich der TNF-Domäne findet sich hierbei die höchste Übereinstimmung. Für die nachfolgenden Untersuchungen zu den biologischen Effekten dieser orthologen Moleküle wurden neben dem rekombinanten CD40L-Fusionsprotein auch monoklonale Antikörper gegen CD40 und CD40L generiert. So war einerseits mit Hilfe dieser Antikörper die Expression des CD40L auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen des Huhnes und die Expression des CD40-Rezeptors auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten analog zum Säuger nachgewiesen worden. Die Expression des CD40 konnte auf allen Subpopulationen der B-Zellen des Huhnes in allen Entwicklungsstadien der immunologisch bedeutsamen Organe wie Bursa Fabricii, Milz, Caecaltonsillen, peripheren Blutlymphozyten und Thymus nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass sowohl immature als auch mature Hühner-B-Zellen CD40L-Signale erhalten können. Die initialen Studien zu den biologischen Effekten, die mit dem löslichen trimeren CD40L-Fusionsprotein durchgeführt wurden, zeigten, dass die CD40-Aktivierung zur Induktion

der NO-Synthese in einer Makrophagen-Zelllinie führt und das Überleben von aus der Hühner-Milz isolierten B-Zellen in Zellkultur fördert [48]. Sowohl in Gesamt-Lymphozyten-kulturen als auch in Kulturen aufgereinigter peripherer B-Zellen oder auch bursaler B-Zellen konnte eine massive Proliferation induziert werden, wodurch erstmals eine Langzeitkultur primärer B-Zellen möglich war [15].

Neben der proliferationssteigernden Wirkung, konnte aber auch ein Effekt auf die Differenzierung der B-Zellen nachgewiesen werden. So kam es in Langzeitkulturen der B-Zellen mit CD40L zu einer Runterregulation der Bu1 und IgM-Expression und ab dem 18. Tag in Kultur zum Verschwinden dieser Oberflächen-Moleküle. Die Zellen blieben jedoch positiv für zytoplasmatisches IgM. Dies deutet darauf hin, dass durch die CD40-Ligation ein Differenzierungsprogramm gestartet wird, wodurch sich die Bu1 hochexprimierende immature B-Zelle über ein Zwischenstadium der gereiften, noch immer Bu1 exprimierenden B-Zelle zu einer Bu1-negativen, Oberflächen-Ig-negativen, aber intrazytoplasmatisch Ig-positiven B-Zelle differenziert. Da diese Zellen aber noch die Fähigkeit besitzen zu proliferieren, kann es sich nicht um terminal differenzierte Plasmazellen handeln, sondern um ein Vorstadium, dem sogenannten Plasmablasten [15].

B-Zellen von KLH-immunisierten Tieren, die mit CD40L kultiviert wurden, zeigten weitaus höhere anti-KLH IgM und IgG-Titer als die B-Zellen der Kontrolltiere. Dies deutet darauf hin, dass auch die Kapazität der Immunglobulin-Sekretion durch CD40L-Stimulation erhöht wird und somit auch beim Huhn die CD40-CD40L Interaktion unabdingbar ist für die Initiierung des Immunglobulin-Klassenwechsels im Rahmen einer adaptiven Immunantwort auf T-Zellabhängige Antigene [15].

Versuche mit bursalen B-Zellen legten noch weitere Funktionen in der frühen B-Zellentwicklung offen, die so beim Säuger nicht nachweisbar sind, da weder bei Mensch noch Maus ein Äquivalent zum bursalen Stadium der B-Zellentwicklung existiert. Bursale B-Zellen sind hochempfindlich für Apoptose [289, 290] und ihre Isolation resultiert in einer schnellen Induktion der endogenen Apoptose in mehr als 80% der Zellen innerhalb einer 6-stündigen Kultur. Eine Stimulation mit CD40L kann zwar den Zelltod nicht komplett verhindern, ist aber in der Lage, die Lebenszeit deutlich zu verlängern [290].

Auch die Oberflächen-IgM-positive, immature bursale Lymphom-Zelllinie DT40, deren Eigenschaften denen der bursalen B-Zellen sehr ähnlich sind [289], kann durch Verknüpfung des oberflächlichen IgM (sIgM) in Apoptose getrieben werden [291]. Dieser Effekt, der durch B-Zellrezeptor-Stimulation induzierten Apoptose, konnte auch durch CD40-Ligation mit rekombinantem CD40L nicht verhindert werden und bewirkte einen

Anstieg der Apoptoserate [48]. Somit verhalten sich DT40-Zellen auf CD40L-Stimulation äquivalent zu Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten humanen B-Zellen, in denen die CD40-Ligation ebenfalls Apoptose induzieren kann [292]. Dieser Effekt wurde auch für eine ganze Reihe transformierter Säugerzellen, einschließlich verschiedener Lymphomzellen beschrieben [181, 293].

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das CD40-CD40L-System mit Anpassungen an das spezielle B-Zellsystem des Huhnes konserviert ist und eine äquivalente Wirkung zum System des Säugers aufweist.

## 2.4 Kostimulatorische Moleküle

Kostimulatorische Moleküle lassen sich basierend auf ihren Homologien in zwei große Gruppen einteilen: die erste Gruppe bilden die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie zu denen unter anderem CD28 und der induzierbare T-Zell-Kostimulator (ICOS), aber auch das „*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*“ (CTLA-4) gehören; der zweiten Gruppe gehören einige Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie an, zu denen beispielsweise CD40, OX40, BAFF-R, TACI, BCMA, CD27, CD30 und RANK zählen [294]. Basierend auf ihren Funktionen lassen sich die kostimulatorischen Moleküle weiter untergliedern in solche, die positive kostimulatorische Signale aussenden, wie im Fall der Interaktion von CD40 mit CD40L oder auch CD28-CD80/CD86, und in solche, die negative Signale an die T-Zelle aussenden, wie im Fall der CTLA-4-CD80/CD86 Interaktion [295, 296].

Die Ligation von CD40 auf den B-Zellen durch den auf aktivierten T-Zellen verstärkt exprimierten CD40L setzt in den B-Zellen eine Kaskade an Ereignissen in Gang, die zur Expression stimulatorischer akzessorischer Oberflächenmoleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7-2) führt [297].

Nicht aktivierte B-Zellen sind nicht in der Lage diese Oberflächenmoleküle spontan zu exprimieren. Erst die Kokultur mit aktivierten T-Zellen befähigt sie dazu und kann, beispielsweise durch Zugabe von anti-CD40L-Antikörper, inhibiert werden [298].

Eine Überexpression kostimulatorischer Moleküle konnte im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, die mit erhöhter CD40L-Expression einhergehen, nachgewiesen werden [299].

Die Interaktion zwischen CD28/CTLA-4 der T-Zelle mit dem Heterodimer CD80/CD86 der Antigen-präsentierenden Zellen ist eine bereits sehr gut charakterisierte Interaktion kostimulatorischer Moleküle. Obwohl die von T-Zellen exprimierten Rezeptoren CD28 und CTLA-4 beide der Immunglobulin-Superfamilie angehören, eine etwa 30%ige

Sequenzhomologie aufweisen und an dieselben Liganden binden, bestehen große Unterschiede hinsichtlich Expressionsmuster und immunologischer Funktion [300]. Während CD28 konstitutiv sowohl auf naiven wie auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wird CTLA-4 erst nach T-Zellaktivierung, abhängig von der T-Zellrezeptor-Signalstärke aus intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert.

Der Ligand B7, ein Heterodimer aus CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), wird von Antigen-präsentierenden Zellen und somit auch von B-Zellen exprimiert [301, 302]. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der beiden transmembranen Typ I Proteine, die eine 25%ige Sequenzhomologie aufweisen, und der weitgehend überlappenden Funktionen, bestehen große Unterschiede hinsichtlich Expression und biochemischer Merkmale.

CD86 wird konstitutiv in geringer Menge als Monomer auf B-Zellen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert, wobei es Rezeptor-induziert zur Dimerisierung kommen kann. Seine Expression kann schnell hochreguliert werden, so dass bereits nach 4-5 Stunden der Höhepunkt erreicht wird. Die Expression des Dimers CD80 dagegen erfolgt langsam und erst nach Induktion, wird aber auch länger (4-5 Tage) aufrecht erhalten. Obwohl beide Moleküle mit denselben Liganden interagieren, besteht ein Unterschied hinsichtlich der Affinität. So besitzt CD86 eine 5-10-fach geringere Affinität und bindet nur verhältnismäßig schwach an CD28, während CD80 stark an CTLA-4 bindet [303, 304].

Dennoch genügt die eher schwache Interaktion zwischen CD28 und CD86 zur Initiierung der T-Zellaktivierung. Auch die früh einsetzende Expression des CD86 deutet auf seine Wichtigkeit für die Initiierung von Immunantworten hin.

Die Bindung der CD80/CD86-Moleküle an die kostimulatorischen Rezeptoren der T-Zellen, CD28 und CTLA-4, ist essentiell für die Aktivierung und Regulation der T-Zellimmunität [305]. Dabei stellt die Bindung des CD28 an CD80/CD86 ein positives Signal auf die T-Zellen dar, was zur T-Zellproliferation, Zytokinproduktion und Inhibition der T-Zelltoleranz führt [306, 307], wohingegen die Interaktion mit CTLA-4 ein negatives Signal darstellt, was zur Attenuierung der T-Zellaktivierung, Limitierung oder Beendigung einer Immunantwort [308] und Induktion der T-Zellanergie führt [296].

Die Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen ist ausschlaggebend für die Maximierung der protektiven Immunantworten bei gleichzeitiger Erhaltung der immunologischen Toleranz und Verhinderung einer Autoimmunität.

Die Ligation des CD80/CD86 führt jedoch nicht nur zur T-Zellstimulation, sondern sendet bidirektionale Signale aus. So werden insbesondere durch CD28-CD86 Interaktion positive

Signale in B-Zellen transduziert, die eine B-Zellproliferation, verstärkte IgG und IgE-Produktion, aber auch terminale Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen zur Folge haben. Während CD86 die Expression anti-apoptotischer Moleküle hochreguliert [302], besitzt CD80 eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und führt zur Hochregulation pro-apoptotischer Moleküle [309].

## **2.5 Interleukin 10**

Die Interleukine als Zytokine, die zwischen den T- und B-Lymphozyten vermitteln, haben essentielle Funktionen im Aufbau des adaptiven Immunsystems. Insbesondere den Interleukinen 2, 4, 5, 6 und 10 kommt im Zusammenhang mit der B-Zellentwicklung beim Säuger große Bedeutung zu. So hat eine alleinige CD40-Stimulation nur geringes Potential zur B-Zelldifferenzierung, wohingegen das Zusammenspiel mit Interleukinen dieses um ein Vielfaches zu steigern vermag [310].

### **2.5.1 Struktur**

Interleukin 10 (IL-10) ist Mitglied einer nach ihm benannten Zytokin-Familie der neben IL-10 die Zytokine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 und IL-29 angehören [311]. Sie alle kennzeichnet eine ähnliche genomische Organisation der Intron-Exon-Struktur, sowie strukturell ähnlich aufgebaute Rezeptoren mit zum Teil identischen Komponenten [312]. Speziesübergreifend lässt sich eine hohe strukturelle Homologie erkennen. So besitzt das murine Homolog eine 80%ige Übereinstimmung mit dem humanen IL-10.

Sowohl das humane IL-10-Gen, welches sich aus 5 Exons und 4 Introns zusammensetzt, als auch die Gene der übrigen Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie liegen in zwei Genclustern angeordnet in syntänischen Regionen auf Chromosom 1. Das IL-10-Gen kodiert dabei für ein 17 bis 19kDa großes Molekül, welches über zwei Disulfidbrücken zu einem Homodimer verbunden wird [313]. Es setzt sich dabei aus zwei ineinandergreifenden und 180° gegeneinander rotierten Polypeptidketten zusammen, die in V-Struktur angeordnete Domänen bilden. Diese Domänen sind die Bausteine des 4-alpha-helikalen (Bündel)Proteins [314, 315].

### **2.5.2 IL-10-Signaltransduktion**

Die IL10-Aktivität wird über Bindung an den IL-10-Rezeptorkomplex ausgeübt [316]. Hierbei bilden die beiden Rezeptoren, IL-10R1 und IL-10R2, ein Heterodimer und zwei solcher Heterodimere einen Rezeptor-Komplex [317]. IL10-R1 bindet IL-10 mit hoher Affinität und rekrutiert IL-10R2, welcher nicht an der Ligand-Bindung beteiligt ist, aber die Signaltransduktion ermöglicht. Die meisten hämatopoietischen Zellen exprimieren auf

der Zelloberfläche IL-10R1 konstitutiv in geringer Menge, können jedoch über verschiedene Stimuli die Expression hochregulieren. Nicht-hämatopoietische Zellen, wie Fibroblasten und epitheliale Zellen, reagieren auf Stimulation ebenso mit Hochregulation von IL-10R1. IL-10R2 wird dagegen von den verschiedensten Zellen konstitutiv exprimiert.

Über Bindung des IL-10 wird die Janus-Kinase 1 (Jak1) des IL-10R1, aber auch die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) des IL-10R2 aktiviert, was zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils des jeweiligen Rezeptors führt und die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors „*signal transducer and activator of transcription 3*“ (STAT3), in geringerem Umfang auch von STAT1 und STAT5, an den IL-10R1 zur Folge hat [312]. Nach Homodimerisation des STAT3 und Abspaltung vom Rezeptorkomplex kommt es zur Translokation in den Nukleus und Bindung an die STAT-Bindungselemente innerhalb der Promotoren einer Vielzahl an Genen [317]. Dabei resultiert die IL-10/IL-10-R Interaktion in der transkriptionellen Aktivierung mehrerer hundert Gene, zu denen unter anderem auch die Janus-Kinasen und Tyrosin-Kinasen selbst gehören [318]. Dadurch ergibt sich ein positiver Feedback-Loop der IL-10-Genexpression [319]. Ebenfalls über STAT3 wird der „*suppressor of cytokine signaling 3*“ (SOCS3) aktiviert, der die Quantität und Qualität der STAT-Aktivierung kontrolliert [320]. SOCS3 wird über IL-10 induziert und übt negativ regulatorische Effekte auf verschiedene Zytokingene aus, nicht jedoch auf IL-10 selbst. Neben dem Jak/STAT-Signalweg wird durch IL-10 auch der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert. Dennoch scheint STAT3 der dominierende Transkriptionsfaktor zu sein, der die IL-10-Aktion mediiert. Die STAT3-Aktivierung ist notwendig, aber nicht ausreichend für die anti-inflammatorische Wirkung des IL-10. So führt die STAT3-Aktivierung über IL-6 nicht zu anti-inflammatorischen Immunantworten [320].

Während die Transkriptionsfaktoren die den IL-10-Promotor regulieren in allen Zelltypen dieselben sind, sind die Signalwege die die Expression von IL-10 induzieren zelltypspezifisch [321]. Hieran beteiligte Transkriptionsfaktoren sind Sp1, Sp3, STAT3, C/EBP $\beta$ , IRF-1, c-Maf, AP-1, NF $\kappa$ B und CREB. So kann beispielsweise eine Stimulation der Toll-like Rezeptoren 4 (TLR4) über NF $\kappa$ B oder die Stimulation mit Katecholaminen über CREB die IL-10-Expression steigern [322, 323]. Die negative Regulation der IL-10-Expression erfolgt über Interferone und ist bei IFN $\alpha$  über IRF-1 und bei IFN $\gamma$  durch STAT1 mediiert. Auch für IL-6 konnte eine IL-10-Repression über den STAT3-Signalweg nachgewiesen werden [324].

Ein Großteil der IL-10-Wirkung beruht auf der Inhibition der NFκB-Kinase-Aktivität, wodurch NFκB-induzierte Gene nicht exprimiert werden können [325, 326]. In der Folge werden viele Immun-responsive Gene, wie beispielsweise IFN-induzierte Gene inhibiert [327], was Effekte auf die Reifung und Funktion der Antigen-präsentierenden Zellen hat.

### 2.5.3 Funktionen im Säuger

1989 wurde IL-10 erstmals beschrieben als ein von Th2-Zellen produziertes Zytokin, welches die IFNγ-Synthese in Th1-Zellen inhibiert [328], weshalb es zunächst den Namen „*cytokine synthesis inhibitory factor*“ (CSIF) erhielt. Hier ist darauf hinzuweisen, dass die Entdeckung in einer Zeit erfolgte, als man noch am Th1:Th2-Denkmuster festhielt, wonach Th1-Zellen pro-inflammatorische und Th2-Zellen anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen [329, 330]; ein Paradigma welches in den vergangenen Jahren eine Neuordnung erfahren musste, da inzwischen allgemein anerkannt ist, dass Th1- und Th2-Zellen sowohl anti- wie auch pro-inflammatorische Eigenschaften besitzen und somit gleichermaßen an Entzündungsreaktionen, Gewebsschädigungen und Pathogen-Elimination beteiligt sind [331].

IL-10 ist ein pluripotentes Zytokin und wird von einer Vielzahl an hämatopoietischen wie auch nicht-hämatopoietischen Zellen gebildet. Neben sämtlichen T-Zellsubpopulationen wie Th2, Treg, Th1 und Th17 [332], sind insbesondere Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen die wichtigsten Quellen. Aber auch B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen sind in der Lage IL-10 zu exprimieren. Unter den nicht-hämatopoietischen Zellen sind die Keratinozyten, epithelialen Zellen und Tumorzellen zu nennen [318, 333]

Als ein potentes anti-inflammatorisches Zytokin ist IL-10 einer der wichtigsten Regulatoren von Infektionen. Zur Bekämpfung einer Infektion wird eine koordinierte Immunantwort benötigt, im Rahmen derer initiale pro-inflammatorische Mechanismen das Pathogen beseitigen, dann aber durch IL-10 herunterreguliert werden, bevor es zu pathologischen Veränderungen kommt. Unabhängig von der Natur des auslösenden Pathogens hemmt IL-10 die Aktivität der Th1, NK-Zellen und der Makrophagen, also all jener Zellen die für Gewebsschädigungen verantwortlich sind, durch Inhibition der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene [334, 335], Inhibition der NO-Produktion [336] und der MHC Klasse II-Expression [337]. Über die Hemmung der pro-inflammatorischen Th1-Immunantwort, durch Limitierung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1α/β, IL-6, IL-12, IL-18 und TNFα aber auch vieler Chemokine [318], werden Th2-Immunantworten gefördert

[338]. Zu den wichtigsten Zielzellen gehören neben den T-Lymphozyten die Makrophagen und dendritischen Zellen. Neben der Hemmung der Zytokin-Produktion dieser Zellen wird auch deren Antigen-Präsentation durch Repression der MHC Klasse II-Moleküle [337] aber auch der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 beeinflusst [339]. IL-10 verhindert auch die Differenzierung der dendritischen Zellen aus den monozytären Vorläuferzellen und die anschließende Reifung, während reife dendritische Zellen unter IL-10-Einfluss die Differenzierung der Treg-Population fördern, was Th1 und Th2 Effekte hemmt und damit die Immunpathologie limitiert [340]. Die autokrine IL-10-Produktion der dendritischen Zellen hat eine verminderte Chemokin-Produktion und damit verringerte Migrationsrate in die regionären Lymphknoten zur Folge. Damit entfällt die Differenzierung der naiven T-Zellen und Rekrutierung der Th1-Zellen, was zur Persistenz des Infektionserregers führt [341]. Die Suppression der pro-inflammatorischen Immunantworten in Geweben führt somit zwar zu einer reduzierten Immunpathologie, aber auch häufig zu einer verschlechterten Pathogenkontrolle.

Dass sowohl der Zeitpunkt als auch die Menge des vorhandenen IL-10 einen entscheidenden Einfluss auf den sicheren Verlauf einer Infektion haben, konnte im Rahmen verschiedener Studien durch Manipulation der IL-10-Menge bewiesen werden.

So fördert eine Verringerung der IL-10-Menge *in vivo* die Resistenz gegenüber intrazellulären Pathogenen, wohingegen hohe IL-10-Mengen den Erreger schützen und damit die Empfänglichkeit des Organismus für intrazelluläre Erreger begünstigen. Die Ablation des IL-10-Signals mittels anti-IL-10 Antikörper oder durch Knock-out des IL-10-Gens führt zu schwerer, meist tödlich verlaufender Immunpathologie. So entwickeln IL-10 Knock-out-Mäuse eine letal verlaufende Colitis [342] und zeigen spontan Autoimmunerkrankungen [343]. Mäuse mit IL-10-Überexpression sind dagegen nicht in der Lage Infektionen zu kontrollieren, da aufgrund der immunsuppressiven Wirkung die Elimination der Pathogene nicht gelingt [344, 345].

### **2.5.3.1 Einfluss auf B-Lymphozyten**

Der Einfluss des IL-10 auf die B-Zellen schließt die gesamte B-Zellentwicklung, von der Differenzierung der Vorläuferzelle bis hin zur Plasmazelle, ein. So wirkt IL-10 als ein potenter Kofaktor positiv auf die Proliferation sowohl der B-Zell-Vorläufer als auch der reifen, aktivierten B-Zellen ein [346], ein Effekt der durch IL-2 und IL-4 noch verstärkt wird [347]. Abhängig vom Aktivierungsstadium der B-Zelle wird über IL-10 die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 [348, 349] und die Telomerase-Aktivität [350] hochreguliert und damit das Überleben gefördert. Über die verstärkte MHC Klasse

II-Expression und CD80/CD86-Expression ergibt sich ein positiver Effekt auf die B-Zellaktivierung [351].

Durch CD40-Ligation stimulierte B-Zellen verändern ihre Responsivität gegenüber anderen Zytokinen, so dass es in der Folge zu additiven oder synergistischen Effekten auf die B-Zellproliferation und Differenzierung kommt. Insbesondere die Ansprechbarkeit gegenüber den Zytokinen IL-4, IL-10 [184, 352], aber auch IL-1, IL-2, IL-5 und IL-13 wird erhöht. Eine CD40-Aktivierung ist für die Initiierung der Differenzierung essentiell, bewirkt jedoch auch unter dem kostimulatorischen Einfluss anderer Zytokine keine terminale Differenzierung vom proliferierenden B-Zellblasten zur Plasmazelle. Erst die Unterbrechung des CD40-Signals bei fortgesetzter Stimulation mittels IL-10 und IL-2 führt zur terminalen Differenzierung [194]. Entscheidend hierbei ist allerdings auch das Differenzierungsstadium der B-Zelle zum Zeitpunkt der Zytokin-Stimulation. So können Gedächtnis-B-Zellen aktiv in den Zellzyklus eintreten und unter dem Einfluss von IL-10 und IL-2 die Differenzierung zur Antikörper-sezernierenden Zelle vollziehen. Naive B-Zellen hingegen benötigen die CD40-Stimulation, um zunächst einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu durchlaufen, bevor sie die terminale Differenzierung vollziehen können [176, 353].

Der Immunglobulin-Klassenwechsel von aktivierten B-Zellen erfordert auch *in vitro* einerseits die CD40-Ligation, andererseits ein zweites Signal in Form eines oder mehrerer Zytokine [354, 355]. So bewirkt IL-4 und IL-13 einen Isotyp-Wechsel zu IgG4 und IgE [183, 211], wohingegen IL10 einen Wechsel zu IgG1 und IgG3 einleitet [356]. IL10 in Kombination mit TGF $\beta$  hingegen bewirkt einen Isotypwechsel zu IgA [357]. Es scheint jedoch eine Hierarchie des Zytokin-medierten Isotypwechsels zu IgG zu geben, mit einer hohen Rate unter IL-4-, etwas geringeren Rate unter IL-13- und der geringsten Rate unter IL-10-Einfluss. Eine Zunahme erfolgt durch die synergistische Wirkung von IL-4 mit IL-10, ein Effekt der auch die B-Zellproliferation betreffend gesehen wird [184]. IL-4 allein oder in Kombination mit IL-10 führt zu einer gesteigerten IgG1- (ca. 70%), IgG2- (15%), IgG3- (10%), aber nur geringen IgG4 -Expression (5%) der CD40L-stimulierten naiven B-Zellen des Menschen.

Ein IL-10-mediierter Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG wird gleichzeitig auch durch Aktivierung von Toll-like Rezeptor 9 über Bindung von CpG-DNA erreicht. CpG-DNA ist dabei in der Lage, die IL-10-Expression hochzuregulieren [358, 359], welches seinerseits die TLR9-Expression hochreguliert, wodurch sich ein synergistischer Effekt auf die B-Zellaktivierung ergibt. Dies ist ein Effekt, der im Zusammenwirken mit IL-2, IL-4, IL-6

und IL-13 nicht gesehen wird.

Nicht nur der Isotypwechsel, sondern auch die Immunglobulin-Sekretion wird durch IL-10 gefördert. Insbesondere IL-10 in Kombination mit IL-2 zeigt einen kostimulatorischen Effekt auf die Antikörper-Sekretion CD40-aktivierter B-Zellen [347]. So konnte anhand von ELISPOT-Assays gezeigt werden, dass IL-10 *in vitro* geradezu alle CD40-aktivierten B-Zellen zur Immunglobulin-Sekretion stimuliert [352, 360].

Auch auf transkriptioneller Ebene hat IL-10 einen Einfluss auf die Differenzierung zur Plasmazelle. So bewirkt es eine Induktion des Transkriptionsfaktors Blimp1[361], was nochmals seinen entscheidenden Einfluss auf die humorale Immunantwort unterstreicht.

#### 2.5.4 Interleukin 10 im Huhn

Vor wenigen Jahren konnte die cDNA des Hühner-IL-10 (ChIL-10) aus einer EST-Datenbank gewonnen werden. Zur Erstellung dieser EST-Datenbank waren Zellen der Caecal-Tonsillen eines *Eimeria tenella*-infizierten Huhnes verwendet worden [362]. Das ChIL-10-Gen kodiert für ein 178 Aminosäuren langes Polypeptid, das eine 42 bis 45%ige Aminosäuren-Übereinstimmung mit humanem und murinem IL-10 aufweist. Auch die genomische Exon-Intron-Struktur ist dem der Säuger sehr ähnlich. So besteht das ChIL-10-Gen auch aus 5 Exons und 4 Introns, ist aber in seiner Struktur kompakter als das Säuger-Gen. Während Zytokingen-Promotoren des Huhnes im Allgemeinen eine hohe Nukleotid-Identität mit den Mammalier-Orthologen aufweisen [363, 364], trifft dies für den IL-10-Promotor nicht zu. So ist der ChIL-10-Promotor dem des Fugu-IL-10 ähnlicher als dem des humanen IL-10. Im Promotorbereich konnten multiple potentielle Sp1-Bindungsstellen identifiziert werden, was vermuten lässt, dass diesem Transkriptionsfaktor eine prominente Rolle in der Kontrolle der IL-10-Genexpression zukommt [365].

Analog zum Säuger kann auch beim Huhn eine Untergliederung der Zytokine in Th1- und Th2-Zytokine vorgenommen werden. Die IL-10-Zytokin-Familie umfasst beim Huhn nur die 4 Mitglieder IL-10, IL-19, IL-22 und IL-26, im Gegensatz zu den 6 Mitgliedern beim Säuger. IL-10 wirkt auch im Huhn als ein negativer Regulator von Th1-Immunantworten und verschiebt so die Th1:Th2-Balance während einer Infektion. Als ein anti-inflammatorisches Zytokin verhindert es die Entwicklung einer starken, IFN $\gamma$ -getriebenen Antwort durch Repression des IFN $\gamma$ -Gens [362].

Auch das Expressionsmuster betreffend ergeben sich Unterschiede. Während in Mammaliern proliferierende B-Zellen und B-Lymphomzellen konstitutiv IL-10 mRNA exprimieren [366, 367], wird es im Huhn nicht konstitutiv in der Milz oder dem KM

exprimiert, und auch Mitogen-aktivierte B-Zellen der Milz oder Bursa zeigen keine verstärkte IL-10-Expression. In lymphatischen Geweben lässt sich ChIL-10 in der Bursa, in Caecal-Tonsillen und in geringer Menge auch im Thymus nachweisen. In nicht-lymphatischen Geweben konnte eine Expression in Leber und Lunge nachgewiesen werden, was wiederum dem Expressionsmuster des Menschen und der Maus entspricht. Interessanterweise ist ChIL-10 in der Bursa, nicht jedoch in Mitogen-aktivierten B-Zellen der Bursa nachzuweisen, was vermuten lässt, dass entweder nicht-B-Zellen wie Stromazellen IL-10 exprimieren oder die Mitogenstimulation der B-Zellen deren IL-10-Expression abschaltet [362].

Aufgrund vergleichender Untersuchungen für die Protozoon-Infektion mit *Eimeria maxima* resistenter und empfänglicher Hühnerlinien konnte ein entscheidender Einfluss des genomischen Hintergrunds auf die ChIL-10-Expression nachgewiesen werden. So korreliert die Resistenz der Tiere mit der Stärke der T-Zellantworten auf Infektionen, insbesondere der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN $\gamma$  und IL-2. Empfängliche Tiere exprimieren im Vergleich zu den resistenten Tieren bereits ohne Stimulation höhere Mengen an IL-10, welches die IFN $\gamma$ -Produktion hemmt [362].

## **2.6 Interleukin 6**

### **2.6.1 Struktur**

Das Zytokin IL-6 ist ein 185 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 26kDa. Trotz oftmals sehr begrenzter Aminosäuren-Identität werden Zytokine wie IL-6, IL-11, IL-12 und das Hormon Erythropoietin aufgrund der übereinstimmenden Topologie in der Zytokin-Familie der sogenannten langkettigen 4-helikalen Bündelproteine zusammengefasst. Diese Zytokine besitzen alle eine ähnliche dreidimensionale Struktur, charakterisiert durch ein Kernbündel, bestehend aus 4  $\alpha$ -Helices die über unterschiedlich lange Schleifen (Loops) miteinander verbunden sind. IL-6 weist neben dieser Struktur noch eine fünfte Helix auf [368]. Das für IL-6 kodierende Gen umfasst 5 Exons und 4 Introns sowie eine über Speziesgrenzen hinweg konservierte Promotorregion. Im IL-6-Gen auftretende Polymorphismen werden für die Resistenz oder Empfänglichkeit gegenüber verschiedener Krankheiten verantwortlich gemacht [369].

### **2.6.2 IL-6-Signaltransduktion**

Seine biologische Aktivität übt es über die Bindung an den IL-6-Rezeptor aus, der eine ungewöhnliche Organisation aufweist. Ein einzelner Rezeptorkomplex setzt sich aus zwei Polypeptidketten, dem 80kDa schweren IL6-Rezeptor und dem 130kDa schweren

Signaltransducer gp130, zusammen [370]. Der IL-6-Rezeptor kann dabei in transmembraner oder löslicher Form vorliegen. Der lösliche Rezeptor bindet mit derselben Affinität und wirkt als antagonistischer Rezeptor zum membranständigen Rezeptor. Die transmembrane Form besitzt eine kurze intrazytoplasmatische Region und wird nach Bindung des IL-6-Moleküls zur Assoziation mit gp130 stimuliert. Der lösliche Rezeptor kann mit dem IL-6 zusammen einen Komplex bilden, welcher dann mit transmembranem gp130 assoziiert, wodurch das Signal über die Membran hinweg transduziert wird und damit zelluläre Ereignisse auslöst. Der Signaltransducer gp130 wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert [371] und wird von Mitgliedern der Hämatoopoietin-Rezeptor-Familie mitverwendet. Dieser Familie gehören neben IL-6 auch Zytokine, wie beispielsweise „*leukemia inhibitory factor*“ (LIF), Onkostatin M (OSM) oder „*ciliary neurotrophic factor*“ (CNTF), IL-11 und Cardiotropin-1, an.

Der vollständige IL-6/IL-6-Rezeptorkomplex wird gebildet durch jeweils zwei Moleküle des IL-6, IL-6-Rezeptors und gp130. Nach Homodimerisation und Aktivierung des gp130 werden die intrazytoplasmatisch lokalisierte Janus-Kinase und Tyrosin-Kinase aktiviert, was die Phosphorylierung und STAT3-Rekrutierung zur Folge hat. Nach Dimerisation des Transkriptionsfaktors STAT3 kommt es zur Translokation in den Nukleus und Regulation der Genexpression. Die Signaltransduktion von IL-6 ist ein typisches Beispiel für den Jak/STAT-Signalweg, der eine sehr schnelle Transduktion des Signals von der Membran zum Kern erlaubt [372, 373].

Eine negative Regulation erfolgt über die Zytokine IL-4, IL-6, IFN $\gamma$  und GM-CSF, die den Jak/STAT-Signalweg durch Induktion der „*suppressors of cytokine synthesis*“ (SOCS) 1 und 3 inhibieren. Während SOCS1 direkt mit den Janus-Kinasen interagiert, inhibiert SOCS3 durch Bindung an den Rezeptorkomplex. Als weitere negative Regulatoren agieren die konstitutiv exprimierten Proteininhibitoren der aktivierten STATs (PIAS), die die STAT-mediierte Gentranskription blockieren.

### 2.6.3 Funktionen im Säuger

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, dessen Multifunktionalität sich bereits in den vielen Namen widerspiegelt, die es seit seiner Entdeckung im Jahre 1986 erhielt. Erstmals wurde es als IFN $\beta$ 2 bezeichnet, bis sich herausstellte, dass es keine IFN-Aktivität besitzt [374]. Dann erhielt es den Namen B-Zellstimulatorischer Faktor 2, da es einen starken stimulatorischen Effekt auf das Wachstum muriner Plasmazytomzellen und humaner Myelomzellen zeigt [375]. IL-6 ist ein starker Induktor der Akute-Phase-Proteine, wie

beispielsweise C-reaktives Protein, Amyloid-A Protein und Fibrinogen, weshalb es auch den Namen Hepatozyten-stimulierender Faktor erhielt [376]. Über die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bewirkt IL-6 eine verstärkte Kortisolausschüttung und durch Einwirkung auf Zellen des Nervensystems des Hypothalamus einen Anstieg der Körpertemperatur [377, 378]. Daneben fördert es die Differenzierung von hämatopoietischen Zellen wie Makrophagen [379], Megakaryozyten und T-Zellen [380] sowie nicht-hämatopoietischer Zellen wie Osteoklasten und Chondrozyten, um nur einige der vielen Funktionen, die dieses Zytokin besitzt, zu nennen.

Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen wird ersichtlich, dass verschiedenste Zellpopulationen zur IL-6-Produktion befähigt sind. Hauptquelle stellen dabei die mononukleären Zellen, wie beispielsweise T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen, aber auch B-Lymphozyten dar. Daneben konnte auch für nicht-hämatopoietische Zellen, wie Astrozyten, Mikroglia-Zellen und Endothelzellen, eine IL-6-Produktion nachgewiesen werden [381, 382].

Eine seiner wichtigsten Funktionen ist jedoch die Regulation von Immunantworten im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen. Zusammen mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und der IL-17-Familie bildet es die Familie der pro-inflammatorischen Zytokine. So konnte gezeigt werden, dass eine IL-6-Überexpression die Ursache für die Pathogenese vieler inflammatorischer Erkrankungen ist. Auch für die Induktion und Pathogenese experimentell induzierter, aber auch natürlich auftretender Autoimmunerkrankungen konnte eine Beteiligung IL-6-abhängiger Signalwege nachgewiesen werden [383]. Eine fehlende IL-6-Produktion, wie in IL-6 Knock-out-Mausmodellen gezeigt, führt dagegen zu einer verschlechterten Abwehr aufgrund der ausbleibenden Lymphozyten-Akkumulation in Entzündungsherden [384].

Ähnlich wie bei IL-10 ist auch bei IL-6 eine strenge Regulation erforderlich, um das Ausmaß und die Dauer der Immunantwort zu kontrollieren.

### **2.6.3.1 Einfluss des IL-6 auf B-Lymphozyten**

Welch einen großen Einfluss IL-6 auf die B-Zellentwicklung hat, wurde bereits bei seiner Identifizierung vor über 20 Jahren erkannt. So war eine seiner ersten nachgewiesenen Funktionen der stimulatorische Effekt auf murine Plasmazytomzellen und humane Myelomzellen.

IL-6 übt seinen Einfluss auf aktivierte, nicht jedoch auf ruhende primäre B-Zellen aus, sowie auf bestimmte B-Zell-Lymphome. Während in der Maus IL-5 einen der wichtigsten

Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren von primären B-Zellen, aber auch B-Zell-Lymphomen und Hybridomen darstellt [385], gilt ebensolches für den Einfluss des IL-6 auf die B-Zellen des Menschen, mit dem Unterschied, dass IL-6 keine wachstumsfördernde Wirkung auf primäre B-Zellen, jedoch auf B-Zell-Lymphome und Hybridome hat.

Sein hauptsächlich Einfluss bezieht sich auf die Differenzierung der aktivierten B-Zelle zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle. So kann nach erfolgreicher B-Zellrezeptor- und CD40-Stimulation eine schnelle terminale Differenzierung durch IL-6 und IL-10 induziert werden [352], ein Effekt der auch in Gedächtnis-B-Zellen gesehen wird [386]. Auf transkriptioneller Ebene kommt es hierbei über den STAT3-Signalweg zu einer Hochregulation der Blimp1 [272, 387] und Xbp-1 Expression [281, 388]. Umgekehrt kann Xbp-1 die IL-6-Expression hochregulieren, was einem Amplifikationsloop entspricht.

Die zeitgleich gesteigerte Expression von CD40- und IL-6 CD40L-stimulierten B-Zellen wird im Zusammenhang mit der germinalen Zentrumsreaktion gesehen und dient einem Vorantreiben des Differenzierungsprogrammes. Über das CD40L-Signal wird so in der B-Zelle der JNK-Signalweg aktiviert, in dessen Folge es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt, der die IL-6-Expression nachfolgend hochreguliert. AP-1 ist zwingend erforderlich, da seine Inhibition die IL-6-Expression komplett unterbindet. Allerdings muss die Aktivierung des AP-1 nicht zwingend über den JNK-Signalweg erfolgen [389].

Desweiteren gilt IL-6 als ein wichtiger Überlebensfaktor von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen *ex vivo* und *in vitro*. Mit abgeschlossener Differenzierung zur Plasmazelle verlieren die Zellen die Fähigkeit IL-6 und IL-10 zu exprimieren, bei gleichzeitig erhaltener Expression von TGF $\beta$ , dem Suppressor verschiedenster lymphoider und hämatopoietischer Zellaktivitäten [390]. Es wird vermutet, dass im Knochenmark lokalisierte Plasmazellen aufgrund ihrer hohen Lebensspanne den maximalen Differenzierungsgrad erreicht haben und die IL-6-Expression einstellen. Stromazellen sezernieren allerdings IL-6 und schaffen so optimale Bedingungen für das Überleben langlebiger Plasmazellen [361, 391].

Neben der Differenzierung und dem Überleben hat IL-6 auch einen entscheidenden Einfluss auf die Steigerung der Immunglobulin-Sekretion, sowohl *in vitro* generierter [392], als auch aus dem Knochenmark isolierter Plasmazellen [391].

Wie wichtig eine strenge Regulation der IL-6-Expression ist, wird daraus ersichtlich, dass eine kontinuierlich erhöhte IL-6-Expression polyklonale Plasmazytose induziert. IL-6 ist

der am besten dokumentierte autokrine Wachstumsfaktor der Myelom-Zellen [393], die im Vergleich zu Plasmazellen einen immaturen Phänotyp, massive Proliferation und kontinuierliche IL-6-Expression zeigen. Die gesteigerte IL-6-Expression führt dabei über den Jak/STAT-Signalweg zur Hochregulation anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 [394]. Auch im IL-6-transgenen Mausmodell kommt es zur Entwicklung einer letal verlaufenden Plasmazytose mit Plasmazell-Infiltration verschiedenster Organe [395]. Ein Prozess der mit gegen IL-6 gerichteten Antikörpern gestoppt werden kann.

Eine komplette Blockade der IL-6-Produktion wie im Knock-out-Mausmodell führt zu einer massiven Inhibition der Antikörper-Antwort nach Immunisierung und Ausbleiben der Entzündungsreaktionen aufgrund der eingeschränkten Akute-Phase-Reaktion [396].

#### **2.6.4 Interleukin 6 im Huhn**

Vor wenigen Jahren konnte die partielle IL-6 cDNA des Huhnes in einer EST-Datenbank identifiziert und mit Hilfe der „*suppression subtractive hybridization*“ Technologie vervollständigt werden [363, 397].

Die genomische Exon-Intron-Struktur des ChIL-6 ist insgesamt kompakter und weist nur 4 Exons anstelle der 5 Exons beim Säuger auf, da die beiden ersten Exons im Huhn als ein fusioniertes Exon vorliegen. Der Promotor des ChIL-6 ist dem des Säugers-Zytokins sehr ähnlich und besitzt alle bekannten Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme des cAMP-Response-Element sowie nur einem Glukokortikoid-Response-Element (GRE) anstelle der zwei beim Mammalier und einer revers orientierten Bindungsstelle des NF-IL-6. Polymorphismen im Bereich des Promotors, wie sie vom Säuger bekannt sind und mit der Resistenz oder Empfänglichkeit gegenüber bestimmter Krankheiten in Verbindung gebracht werden [369], konnten im Huhn bisher nicht identifiziert werden [398].

Das ChIL-6-Polypeptid besteht aus 194 Aminosäuren und weist nur eine 35%ige Sequenzidentität zum humanen IL-6 auf. Drei Cystein-Reste, ein einzelnes Tryptophan und einige weitere Sequenzmotive im zentralen Bereich des ChIL-6-Moleküls sind konserviert, was eine ähnliche Tertiärstruktur vermuten lässt.

Auch der ChIL-6-Rezeptor besitzt eine charakteristische Zytokinrezeptor-Domäne sowie eine gp130-Domäne mit 61%iger Sequenzübereinstimmung zum humanen gp130 [399].

Da über die Funktionen des IL-6 im Huhn bisher wenig bekannt ist, wurde rekombinantes ChIL-6 in *E. coli*, COS7-Affenzellen und Hühner LMH-Zellen erzeugt und sowohl in Zellkultur wie auch *in vivo* getestet. Sowohl das bakteriell exprimierte wie auch das

eukaryotisch His-getagte ChIL-6 ist biologisch aktiv, da es nach intravenöser Applikation in adulten Hühnern über Stimulation der hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse einen Anstieg der Serum-Kortikosterol-Titer bewirkt [397], was auf eine konservierte pro-inflammatorische Wirkung dieses Zytokins hindeutet. In Zellkultur bewirkt rekombinantes ChIL-6 das Überleben und die Proliferation der IL-6-abhängigen Maus-Hybridomzelllinie 7TD1 [400].

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Tatsache, dass das Huhn als lebensmittellieferndes Tier in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen wird und die Tierpopulationen der Geflügelhaltungsbetriebe immer mehr anwachsen, wird ersichtlich wie wichtig eine effiziente Infektionskontrolle zum Erhalt der Tiergesundheit aber auch zum Schutz des Verbrauchers ist. Bis zum heutigen Tage kommt es in Geflügelhaltungsbetrieben zu massiven Tierverlusten hervorgerufen durch Krankheitserreger welche einen ausgesprochenen B-Zelltropismus aufweisen. Die Untersuchung der genauen Abläufe und auftretenden Veränderungen die in Verbindung mit dem Eingreifen jener Erreger in die B-Zellhomöostase auftreten war bislang nur eingeschränkt möglich aufgrund der fehlenden Kultursysteme für primäre B-Zellen. Mit der Dissertation von Iris Morgenroth zur „Charakterisierung des CD40-CD40L Systems als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns“ wurde eine Grundlage geschaffen für die *in vitro*-Kultur primärer B-Zellen des Huhnes. Erstmals können nun Studien zu Wirt-Pathogen-Interaktionen mit B-Zelltropischen Viren und zur post-bursalen Biologie durchgeführt werden.

Mit zunehmender Bedeutung des Huhnes als Tiermodell für die GALT-Spezies, der einige unserer domestizierten Haussäugetiere angehören, aber auch aus Evolutionsbiologischer Sicht ist es erforderlich die genauen Vorgänge der B-Zellentwicklung und Differenzierung beim Huhn zu erforschen. Aufgrund der anatomischen und funktionellen Besonderheiten, die die B-Zellentwicklung des Huhnes aufweist, wird ersichtlich, dass im Tiermodell Maus gewonnene Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf die Klasse der Vögel übertragen werden können. So werden im Tiermodell Maus Zytokine als essentielle Faktoren der terminalen Differenzierung von der naiven B-Zelle zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle beschrieben. Ob jedoch die beim Huhn identifizierten orthologen Zytokine dieselben Funktionen besitzen wie sie für den Säuger postuliert sind, ist in den meisten Fällen noch nicht hinreichend untersucht.

Aufbauend auf den Ergebnissen, die im Rahmen der Dissertation von Iris Morgenroth gewonnen wurden, sollen in der vorliegenden Arbeit die Effekte des rekombinanten ChCD40L allein und in Kombination mit den rekombinanten Proteinen ChIL-10 und ChIL-6 auf die B-Zellentwicklung in der *in vitro*-Kultur untersucht werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Gewinnung der primären Lymphozyten aus Blut oder Organen wurden die Hühnerlinien M11 (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp), LSL (Lohmann's selected Leghorn) und CB Prag verwendet. Die Eier der Linie M11 stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee, LSL-Eier sowie -Tiere wurden von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven zur Verfügung gestellt.

Die Eier wurden am Institut ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Gitterrostkäfigen oder Volieren gehalten. Gefüttert wurde handelsübliches Alleinfuttermittel, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

### 4.2 Gewinnung von primären Hühnerleukozyten

#### Material

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

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

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

##### Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>

##### Heparinlösung (500 U/ml)

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

#### 4.2.1 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten

Die für die Blutentnahme benötigten Spritzen wurden unter sterilen Bedingungen mit ca. 0,2ml Heparinlösung beschichtet. Es wurden Kanülen der Größe 0,7 x 40mm verwendet.

Entnahmestellen waren die rechtsseitige Vena jugularis oder die Venae ulnaris.

Eine Auftrennung des Vollbluts in die einzelnen Fraktionen wurde durch *Slow-Speed-Zentrifugation* erreicht. Hierzu wurde das Blut in ein 15ml Zentrifugations-Röhrchen überführt und anschließend bei 600xg für 15 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die den Erythrozyten aufliegenden Lymphozyten wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig aufgewirbelt und abpipettiert. In ein anderes Zentrifugations-Röhrchen überführt

wurden die Lymphozyten nun zweimal mit PBS durch Zentrifugation bei 225xg für 10 min. bei 4°C gewaschen.

Im Anschluß daran folgte die quantitative und qualitative Beurteilung der Lymphozyten durch eine Lebend-/Tot-Färbung mittels Trypanblau-Färbung (10µl Trypanblau-Lösung ad 10µl Zellsuspension) in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer.

#### **4.2.2 Gewinnung von Leukozyten aus Organen**

Die ausgewählten Hühner wurden nach mechanischer Betäubung durch Blutentzug getötet. Zunächst wurde das Abdomen mit 70% Ethanol benetzt. Danach wurde die Haut abgezogen und mit einer Schere die Bauchhöhle so weit eröffnet, dass das Sternum nach kranial geklappt werden konnte.

Mit sterilen chirurgischen Instrumenten wurden die entnommenen Organe sofort in steriles, kaltes PBS überführt und auf Eis gelagert.

Im Anschluß daran wurden die jeweiligen Organe (Milz, Bursa) mit einem sterilen Spritzenstempel durch ein in PBS stehendes, autoklaviertes Sieb gepresst (Maschenweite 0,75x0,75mm). Die daraus erhaltene Organsuspension wurde in einem 50ml Zentrifugations-Röhrchen für 3 min. zur Sedimentation der großen Gewebstücke auf Eis gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Überstand bis auf ca. 4ml abgenommen und mit PBS durch Zentrifugation bei 225xg für 10 min. bei 4°C gewaschen.

Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI resuspendiert und auf 10ml Ficoll Separation Solution geschichtet.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Dichtezentrifugation) bei 650xg für 12 min. bei 20°C wurde die dem Ficoll aufliegende Lymphozytenschicht (Interphase) abgenommen und in PBS mind. zweimal per Zentrifugation gewaschen.

Die qualitative und quantitative Beurteilung der Zellen erfolgte wie 4.2.1 beschrieben mittels Trypanblau-Färbung.

### **4.3 Zellkultur**

#### **4.3.1 Medien und Zusätze**

Soweit nicht anders angegeben wurden die im Folgenden aufgeführten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert. Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang aufgeführten Bezugsquellen.

**Standardmedium**

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

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

**B-Zell-Medium**

445ml	IMDM <sup>2</sup>
40ml	FBS <sup>2</sup>
10ml	Hühnerserum <sup>4</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>
50µl	Selen/Insulin/Transferrin-Lösung <sup>5</sup>
500µl	β-Mercaptoethanol <sup>1</sup>

**Medium für DT40-Zellen**

370ml	DMEM <sup>2</sup>
50ml	FBS <sup>2</sup>
50ml	Tryptosephosphat-Puffer
25ml	Hühnerserum <sup>4</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

**Medium für HD11-Zellen**

445ml	RPMI 1640 <sup>4</sup>
40ml	FBS <sup>2</sup>
10ml	Hühnerserum <sup>4</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>

**Medium für 7TD1-Zellen**

445ml	RPMI 1640 <sup>4</sup>
50ml	FBS <sup>2</sup>
5ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>2</sup>
500ng	rChIL-6 <sup>29</sup>

**Einfriermedium**

9ml	FBS <sup>2</sup>
1ml	DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO) ) <sup>1</sup>

Lagerung als Aliquot bei -20°C

**PBS-EDTA, pH 7,2**

200mg	EDTA (Ethyldiamintetraacetic Acid Tetra Natrium Hydrat, (HOOC-CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> -COOH) <sub>2</sub> ) <sup>6</sup>
ad 1000ml	PBS

pH mit HCl und NaOH auf 7,2 eingestellt  
für Arbeiten in der Zellkultur autoklaviert; Lagerung bei RT

**Trypsin-EDTA, pH 7,2**

45ml	Aqua bidest., steril
5ml	Trypsin-EDTA-Lösung, 10x <sup>2</sup>

Lagerung des Trypsin-EDTA, 10x als Aliquot bei -20°C  
Für 1x-Lösung:  
5ml 10x  
ad 50ml sterilem Aqua bidest.  
Lagerung bei 4°C

### 4.3.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Spezies	Transformation	Medium	Referenz
<b>DT40</b>	Bursale B-Zellen	Huhn	Aviäres Leukosevirus	DT40- Medium	[289]
<b>HD11</b>	Myeloide Zellen	Huhn	Aviäres Leukosevirus	HD11- Medium	[401]
<b>7TD1</b>	Milz-B-Zellen/ Zellen	Myelom- Maus	Hybridom	7TD1- Medium	[400]
<b>HEK-293</b>	embryonale Zellen, Niere	Mensch	Humanes Adenovirus	Standard	[402]
<b>HEK-293-T</b>	embryonale Zellen, Niere	Mensch	Humanes Adenovirus	Standard	[403]

Tabelle 4.1 Verwendete Zelllinien

### 4.3.3 Primäre Zellen

Aus Blut oder Organen gewonnene primäre Zellen wurden auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und im jeweiligen Medium aufgenommen und bei 40°C kultiviert.

#### 4.3.3.1 Kurzzeitkulturen (bis zu 72 h)

Die Zellen für Kurzzeitkulturen bis 72 h wurden mit einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml in Standardmedium oder B-Zell-Medium aufgenommen. In 24-Loch-Platten erfolgte die Kultivierung in 1ml Medium pro Delle. Wurden 96-Loch-Platten verwendet erfolgte die Kultivierung in 200µl Medium pro Delle.

#### 4.3.3.2 Langzeitkulturen (bis zu 21 d)

Für eine länger als 72 h währende Kultur der Zellen wurden diese ebenso in Standard-Medium oder B-Zell-Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte dabei in 24-Loch-Platten bei einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml und 1ml pro Delle.

Abhängig von der Proliferation der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage eine Teilung. Hierzu wurden 500µl des Mediums entnommen und verworfen. Daraufhin wurden 500µl frisches Medium der Delle zugesetzt und die Zellen in Suspension verbracht und wiederum 500µl der Zellsuspension in eine neue Delle pipettiert. Abschließend wurden jeder Delle 500µl frisches Medium zugesetzt.

### 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 1,8ml in entsprechende Gefrierröhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol befüllten 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 50ml Röhrchen überführt. Dann wurden 50ml kaltes PBS zugegeben, die ersten 10ml tropfenweise, um das zellschädigende DMSO langsam auszuverdünnen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (225xg, 10 min, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in Kulturmedium resuspendiert und in Kultur genommen.

### 4.4 Vektoren und Klonierung

#### 4.4.1 Verwendete Konstrukte

Laborinterne Konstrukte Nr.	Insert	Vektor	Klonierungsenzyme	Resistenz
<b>K019</b>	ChIL-10	pcl-neo	NotI	Amp/Neo
<b>K011</b>	ChIL-6	pQE9		Amp
<b>K002</b>	ChBAFF	pCR3-HA-Flag	PstI und EcoRI	Amp/Neo
<b>K060</b>	ChIL-10	pCR3-HA-Flag	PstI und EcoRI	Amp/Neo
<b>K077</b>	ChIL-6	pCR3-HA-Flag	BamHI und ApaI	Amp/Neo

Tabelle 4.2 Verwendete Konstrukte

Das Konstrukt K019 wurde von Dr. Lisa Rothwell (Institute of Animal Health, Compton, UK) kloniert und uns für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt K011 wurde uns von Prof. Peter Staehli, Institut für Virologie, Universität Freiburg zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konstrukte K060 und K077 erstellt. Der Ablauf der einzelnen Klonierungen ist im Folgenden kurz dargestellt, die genauen Methoden folgen in den nächsten Punkten dieses Kapitels.

### **Klonierung von chicken Interleukinen in einen pCR3-Vektor**

Um das rekombinant gewonnene chicken Interleukin später leichter nachweisen und aufreinigen zu können wurde eine Umklonierung des Interleukins in einen Vektor mit Flag-Tag vorgenommen. Hierzu musste die Sequenz für das chicken Interleukin mittels PCR amplifiziert werden. Um die Genauigkeit der PCR zu erhöhen wurde hierzu eine *proof reading* Polymerase verwendet. Mittels spezifischer Primer wurden an das Insert die Enzymschnittstellen angefügt, die für die spätere Ligation des Inserts in den neuen Vektor nötig sind. Über eine Agarose-Gelelektrophorese wurde die Länge des Amplifikats überprüft, anschließend das verbliebene Amplifikat mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mit dem Kit NucleoSpin® Extract II<sup>7</sup> aufgereinigt.

In einem vierfachen Ansatz (insgesamt 20 µg Plasmid) wurde der pCR3-HA-Flag Vektor mit den Restriktions-Endonukleasen geschnitten, aus einem präparativen Gel mittels Skalpell die Vektorbanden herausgeschnitten und ebenfalls mit dem Kit NucleoSpin® Extract II<sup>7</sup> aufgereinigt. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA mit der Calf Intestine Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Vektor und Insert wurden mit einer T4-Ligase zusammengefügt und das resultierende Plasmid in den E.coli Stamm JM109 transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bebrütet, um am darauffolgenden Tag einzelne Kolonien von der Platte zu picken und in einer kleinen Menge LB-Medium hochzuschütteln. Unter Verwendung der Bakterien-Suspension als Template wurde in einer konventionellen PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese der Ligationserfolg überprüft. Abschließend wurde in einem Verdau die korrekte Orientierung des Inserts im Vektor überprüft. Hierzu wurden Restriktions-Endonukleasen ausgewählt deren Schnittstellen im Insert und Vektor liegen, so dass anhand der Fragmentlänge die korrekte Ligation überprüft werden konnte.

### **4.5 RNA-Präparation**

Die Isolierung der Gesamt-RNA der Zellen erfolgte dabei mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion.

#### **Material**

**Trizol Reagenz (Trifast®)**<sup>22</sup>

Lagerung: 4°C

**Chloroform ad analysis**<sup>1</sup>

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**Isopropanol**<sup>23</sup>

**70% Ethanol**

70ml	Ethanol absolut <sup>23</sup>
30ml	Aqua bidest., nukleasefrei

**Durchführung**

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von RNAase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden vor Arbeitsbeginn mit 10 % SDS-Lösung behandelt. Volumenangaben beziehen sich auf 1ml Trizol zur RNA-Isolation aus maximal  $1 \times 10^7$  Zellen.

Um die Gesamt-RNA aus Zellen zu isolieren wurden diese in 1ml Trizol je  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen, stark gevortext und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Probe 15 Sekunden lang stark geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (12.000xg, 6°C, 15 Minuten) kam es zur 3-phasigen Auftrennung der Suspension. Am Grund des Gefäßes milchig-rosa die organische Phase vorwiegend aus Proteinen, darüber die weiße Interphase mit der DNA und darüber die wässrige Phase mit darin enthaltener RNA. Nach vorsichtiger Abnahme der wässrigen Phase wurde diese in ein neues Gefäß überführt und in 500µl Isopropanol aufgenommen. Innerhalb der folgenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Ausfällung der RNA. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000xg, 6°C, 10 Minuten) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 Minuten bei 7.500xg und 6°C zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde das RNA-Pellet getrocknet, in 20µl nukleasefreiem Aqua bidest. aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bei 260nm und 280nm bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

**4.5.1 Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™**

Vorraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen mRNA Nachweis in der konventionellen oder quantitativen Polymerase Kettenreaktion ist der Einsatz von mRNA guter Qualität. Hierfür wurde die gewonnene RNA einer Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bioanalyzer Systems von Agilent unterzogen. Dieses auf der Lab-on-a-Chip Technologie basierende System ermöglicht es, die Kettenlänge der RNA-Moleküle digitalisiert zu erfassen und der RNA Qualität auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S rRNA und deren Verhältnis einen Zahlenwert, die RNA Integrity Number (RIN) von 1 (stark degradiert) bis 10 (intakte RNA) zuzuordnen. Für unsere Versuche wurde als Ausschlusskriterium für die Verwendung der RNA in der qPCR eine RIN von 7 festgelegt.

Die zu analysierenden RNA-Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufgetragen und mittels ‚Agilent 2100 Expert‘ Software ausgewertet.

## 4.6 cDNA-Synthese

### Material

**QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen™)<sup>24</sup>**

**Super Script III (Invitrogen™)<sup>4</sup>**

**RevertAid (Fermentas™)<sup>9</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

### Durchführung

Mit Hilfe der rekombinanten reversen Transkriptase (RT) wurde die in der Gesamt-RNA enthaltene messenger-RNA (mRNA) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche daraufhin als Matrize sowohl in der konventionellen als auch in der quantitativen PCR eingesetzt wurde. Zur Gewinnung von Matrizen für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde das „Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit“ oder nach erfolgtem DNase Verdau (DNase I) das „Superscript III Kit“ verwendet, wohingegen für die konventionelle PCR das „RevertAID cDNA Synthese Kit“ zum Einsatz kam. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 4.7 Erstellen von Primern

### 4.7.1 Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion

Die Primer für die konventionelle PCR wurden mit der Software Primer Express 3.0 von Applied Biosystems erstellt. Eine Liste aller verwendeten Primerpaare für die konventionelle PCR ist unter 5.1 im Ergebnisteil aufgeführt.

Auf dieselbe Art und Weise waren auch die eingesetzten Klonierungsprimer generiert worden, mit deren Hilfe Schnittstellen für die Restriktions-Endonukleasen an das zu ligierende Insert angefügt wurden.

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Tabelle 4.3 Verwendete Primer zur Klonierung und Erfolgskontrolle

Sequenzen der Enzymschnittstellen sind unterstrichen; s:sense, as:antisense

Primer	Sequenz	Verwendung
<b>ChIL-10 s</b>	5' ATAT <u>CTGCAGTGCACCCTGCCTGCCCA</u> 3'	Klonierung in pCR3-HA-Flag, Erfolgskontrolle
<b>ChIL-10 as</b>	5' GCGC <u>GAAATTC</u> TACTTCCTCCTCCTC 3'	Klonierung in pCR3-HA-Flag, Erfolgskontrolle
<b>ChIL-6 s</b>	5' ATACTCGAGCCGCTGCCCGCCGC 3'	Erfolgskontrolle
<b>ChIL-6 as</b>	5' CGC <u>TCTAGAT</u> CAGGCACTGAAACTC 3'	Erfolgskontrolle

#### 4.7.2 Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion

qPCR-Primer wurden ebenfalls mit der Primer Express Software von Applied Biosystems generiert. Allerdings wurde hier besonders auf die Größe des Amplikons (maximal 150 bp) und eine einheitliche Annealing Temperatur (59°C) aller Primer-Paare geachtet. Die Spezifität der Primerpaare wurde mittels Sequenzierung bestätigt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand einer linearen Standardkurve gewährleistet.

Eine Liste aller verwendeten Primerpaare für die qPCR ist unter 5.2.2.4.2 im Ergebnisteil aufgeführt.

#### 4.8 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht durch Verwendung einer hitzestabilen Polymerase und spezifischen Primern die Amplifikation von DNA-Fragmenten anhand einer DNA-Matrize. Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler nach einem definierten Temperatur-Programm. Pro Zyklus werden hierbei drei Phasen durchlaufen. Durch Erhitzung auf 95°C kommt es zunächst zur Denaturierung der DNA-Doppelstrangstruktur, gefolgt von der Anlagerung der Primer, bei der Primer-spezifischen Temperatur. In der Phase der Elongation synthetisiert die Polymerase bei 72°C den komplementären DNA-Strang.

Insgesamt wurden 35 solcher Zyklen wiederholt, denen initial eine Denaturierungsphase von 15 Minuten bei 95°C vorgeschaltet und abschließend eine finale Elongationsphase von 5 Minuten bei 72°C nachgeschaltet wurden.

#### Material

**HotFirePol-DNA Polymerase<sup>8</sup>**

**10x Polymerase Puffer B<sup>8</sup>**

**dNTP 2mM<sup>9</sup>**

**MgCl<sub>2</sub> Lösung 25mM<sup>8</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**Primer 1 pmol/ µl<sup>10</sup>**

Lagerung aller Reagenzien bei -20°C.

#### Durchführung

Ansatz für eine PCR-Reaktion:

5 µl	sense-Primer
5 µl	antisense-Primer
2,5µl	Polymerase-Puffer B
2 µl	MgCl <sub>2</sub> Lösung

2,5 µl	dNTP
0,2 µl	HotFirePol-DNA Polymerase, Endkonzentration 1 U
3µl	cDNA oder Aqua bidest, nukleasefrei für Negativkontrolle für PCR mit Plasmid-DNA oder Bakteriensuspension wurden 1µl Template verwendet.
ad 25µl	Aqua bidest., nukleasefrei

Bei mehreren Ansätzen wurde zunächst aus diesen Reagenzien ein Mastermix bereitet und auf die einzelnen Ansätze verteilt. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben im Thermocycler durchgeführt. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

#### 4.9 Polymerase Kettenreaktion mit Proofreading-Polymerase (Pfu)

Bei Amplifikation von DNA-Fragmenten für die anschließende Ligation in einen Expressions-Vektor wurde die hitzestabile Proof-reading Polymerase (Pfu) verwendet, die sich durch eine geringere Prozessivität, aber auch durch eine geringere Fehlerrate verglichen mit der Taq-Polymerase auszeichnet. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden an das zu ligierende DNA-Fragment Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt, so dass nach dem Verdau mit diesen Enzymen die Ligation in den geschnittenen Vektor vorgenommen werden konnte.

#### Material

**Reaktionspuffer (10-fach konzentriert)<sup>11</sup>**

**dNTP 2mM<sup>9</sup>**

**Primer 1pmol/µl<sup>10</sup>**

**Pfu (Pyrococcus furiosus) Polymerase<sup>11</sup>**

#### Durchführung

50µl-Ansatz für eine PCR-Reaktion:

5µl	10x Puffer mit MgSO <sub>4</sub>
5µl	dNTP
10µl	sense-Primer
10µl	antisense-Primer
0,5µl	Pfu-Polymerase (1,25 Units)
1ng	DNA-Template
variabel	Aqua bidest., nukleasefrei

Die Reaktion erfolgte wie bereits für die konventionelle Polymerasereaktion beschrieben durch zyklisches Aufheizen und Abkühlen im Thermocycler. Für den Schritt der Elongation wurde hierbei ein Zeitfenster von 2 Minuten pro 1000 zu prozessierender Basenpaare eingestellt. Die Analyse erfolgte in einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese.

#### 4.10 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR, Real Time RT-PCR) als Standard-Methode zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren wurde unter Verwendung des in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffs SYBR Green durchgeführt.

Um unspezifische Signale, hervorgerufen durch diesen Fluoreszenz-Farbstoff auszuschließen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

##### Material

**SYBR Green<sup>24</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**qPCR Primer<sup>10</sup> (5pmol/μl)**

##### Durchführung

Aus folgenden Reagenzien wurde ein Mastermix hergestellt:

Ansatz einer qPCR-Reaktion:

12,5μl	SYBR Green
8,5μl	Aqua bidest., nukleasefrei
1,5μl	Primer sense (s)
1,5μl	Primer antisense (as)

Zu dem Mastermix wurde anschließend 1μl der zu untersuchenden cDNA (Template) oder 1μl Wasser als Negativkontrolle dazu pipettiert.

Die verschiedenen Ansätze wurden im qPCR-Cycler nach folgendem Protokoll erhitzt:

<b>Initiationserhitzungsphase</b>	1x	95°C 15 min
<b>Amplifikationsphase</b>	<b>Denaturation</b>	40x 94°C 15 sec
	<b>Annealing</b>	59°C 30 sec
	<b>Extension</b>	72°C 30 sec
<b>Dissoziationsphase</b>	1x	95°C 15 sec 57°C 30 sec 95°C 15 sec

##### Auswertung

Für jedes, mittels Primer Express Software generierte Primerpaar wurde zunächst die Effizienz in der qPCR geprüft. Hierzu wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve auf der über 7 Verdünnungsstufen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$ ) log<sub>10</sub> titrierten cDNA einer Hühner-Milz erstellt, und anschließend die Effizienz E über lineare Regression aus der Steigung m der qPCR-Kurve im linearen Bereich des qPCR-Laufs nach der Formel  $E=10^{(-1/m)}$  berechnet.

Die Auswertung der qPCR-Läufe, mit den zu untersuchenden Proben als Templates, erfolgte durch Schmelzkurven-Analyse und Berechnung der mRNA-Expressionslevel der untersuchten Gene. Für jede Probe erhält man einen CT, also den „Cycle Threshold“ der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-

Fluoreszenz ansteigt. Der Schnittpunkt der simoiden Kurve mit dem Threshold Cycle wird dann zum Vergleich der Expressionsstärken herangezogen. Hierbei ist zu beachten, dass hohe CT-Werte für eine geringe Menge an Template sprechen, da hier erst spät der Schwellenwert erreicht wird.

Nach Mittelung der CTs, der Duplikate/Triplikate der untersuchten Proben folgte die Berechnung des  $\Delta$ CT durch Abzug des Proben-CT von dem gemittelten CT des Housekeeping-Gens 18S rRNA (Normalisierung). Unter Abzug des  $\Delta$ CT-Werts der 0-Stundenprobe von den erhaltenen  $\Delta$ CT der Proben resultierte der  $\Delta\Delta$ CT-Wert der nachfolgend zur Berechnung der n-fachen Expression in die Gleichung  $2^{-\Delta\Delta CT}$  eingesetzt wurde.

#### 4.11 Agarose-Gelelektrophorese

Das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese dient dazu DNA Moleküle aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrats in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Eine anschließende Färbung des Gels mit dem in doppelsträngiger DNA interkalierenden Ethidiumbromid lässt die DNA-Stücke nach Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar werden.

#### Material

##### EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0)

186,1g Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-Dinatrium-Dihydrat  
( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$ )<sup>1</sup>  
20g Natriumhydroxid (NaOH)<sup>1</sup>  
ad 700ml Aqua dest.  
pH 8,0 mit NaOH eingestellt, Lagerung bei Raumtemperatur

##### 5xTBE Puffer

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

##### 0,5x TBE-Puffer

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

##### 1% Agarose

0,5g Agarose<sup>1</sup>  
50ml 0,5x TBE Puffer  
kurz vor Gebrauch ansetzen

##### 6x Loading Dye Solution (Ladepuffer)<sup>9</sup>

##### GeneRuler™50bp DNA Ladder plus<sup>9</sup>

##### oder DNA-Ladder-Mix (Marker)<sup>9</sup>

##### Ethidiumbromid-Stammlösung

10mg Ethidiumbromid<sup>6</sup>  
ad 1ml Aqua dest.  
bei 4°C lagern  
Gebrauchslösung: 1:1000 in Aqua dest. verdünnt

### Durchführung

Die 0,7 bis 2%igen Agarosegele wurden jeweils unmittelbar vor Verwenden gegossen. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 0,5x TBE-Puffer gekocht bis eine klare homogene Flüssigkeit ohne Schlieren entstanden war. Nach Abkühlen der Gel-Lösung auf ca. 60°C wurde die Elektrophoreseapparatur mit eingesetztem Probenaschenkamm blasenfrei befüllt. Nach Aushärten der Agaroselösung wurde der Probenaschenkamm entfernt und das Gel mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Die zu separierenden DNA-Lösungen wurden 6:1 mit einem gefärbten Ladepuffer (Loading Dye) versetzt (5µl Probe mit 1µl 6x Loading Dye) und in die Probenaschen geladen. Als Referenzgröße diente ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt bis die Proben ausreichend weit im Gel aufgetrennt waren, wobei der mitgeführte Marker der Orientierung diente. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung geschwenkt und anschließend unter UV-Licht photographiert.

### 4.12 Aufreinigung von DNA

DNA wie sie nach einem Restriktionsenzymverdau vorliegt, sowie aus Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gelen herausgeschnittene DNA-Banden, aber auch für eine anschließende Ligation vorgesehene PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II®-Kits*<sup>7</sup> aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

### 4.13 Sequenz-spezifische Hydrolyse von DNA durch Restriktions-Endonukleasen

Um die Plasmid-DNA des Vektors zu linearisieren und einen geschnittenen Vektor, aber auch Inserts mit definierten 5' und 3' Sequenzenden zu erhalten wurden diese durch Restriktions-Endonukleasen bei 37°C hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer bzw. Pufferkombinationen durchgeführt.

### Material

**Restriktions-Endonukleasen**<sup>9</sup>

**Restriktions-Endonuklease spezifischer Reaktionspuffer**<sup>9</sup>

**Aqua bidest., nukleasefrei**

Alle aufgeführten Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

## Durchführung

Ansatz für eine analytische Hydrolyse:

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

Ansatz für eine präparative Hydrolyse:

2 bis 3µg	Vektor-DNA
1,5µl	Restriktionsenzym 1
1,5µl	evtl. Restriktionsenzym 2
4µl	Enzymspezifischer Reaktionspuffer (10x)
ad 40µl	Aqua bidest., nukleasefrei

Die Reaktion erfolgte in einstündiger Inkubation bei 37°C und 600rpm im Thermomischer. Anschließend wurden die Enzyme bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. PCR-amplifizierte Inserts wurden mit dem oben genannten Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die durch Hydrolyse erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert und detektiert.

Für die Aufreinigung von Vektoren wurde eine präparative Hydrolyse durchgeführt.

### 4.14 Dephosphorylierung des Vektors

Um freie DNA-Enden für eine Ligation zu erhalten und eine Religation zu verhindern, wurde der verdaute Vektor mit einer aus dem Kälberdarm isolierten alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

## Material

**Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)<sup>9</sup>**

**CIAP Puffer<sup>9</sup>**

**Aqua dest., nukleasefrei**

Die angegebenen Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

## Durchführung

Ansatz für eine Reaktion:

10-40µl	Vektor
5µl	10x CIAP Puffer
ad 49µl	Aqua dest., nukleasefrei
1µl	CIAP

Die aufgereinigte und mittels Restriktions-Endonukleasen geschnittene Vektor-DNA wurde mit Puffer und Wasser gemischt. Nach Zugabe der Phosphatase folgte eine Inkubation bei 37°C und 600rpm für 30 Minuten. Auf einem Thermoblock wurde das Enzym anschließend für 15 Minuten bei 85°C inaktiviert.

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

Bei der Ligationsreaktion erfolgt die Verbindung der dephosphorylierten Enden der Vektor-DNA mit dem zu inserierenden DNA-Fragment. Hierzu werden Vektor und Insert in einem bestimmten molaren Verhältnis miteinander inkubiert.

##### Material

###### Rapid DNA Ligation Kit<sup>9</sup>:

Ligase  
Ligationspuffer  
DNA Dilutionspuffer

###### Aqua dest., nukleasefrei

##### Durchführung

Zur Berechnung des molaren 1:1-Verhältnisses von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA wurde folgende Formel verwendet:

$$x \text{ ng Insert} = \frac{\text{Länge Insert (bp)} \cdot x \text{ ng Vektor (idealerweise 100 ng)}}{\text{Länge Vektor (bp)}}$$

Bei Ligation von DNA-Fragmenten in den Vektor pCR3-HA-Flag wurde ein molares Verhältnis von 3:1 und 5:1 gewählt. Die Vektor-DNA Menge soll dabei idealerweise auf 100 ng eingestellt werden.

variabel	Vektor-DNA
variabel	DNA-Fragment
2µl	DNA Dilutions Puffer
ad 10µl	Aqua dest., nukleasefrei
10µl	Ligations Puffer
1µl	Ligase
<hr/>	<hr/>
21µl	Gesamt

Zunächst wurden Insert und Vektor gemäß dem errechneten Verhältnis mit dem DNA Dilutionspuffer und Wasser gemischt, dann Ligationspuffer und Ligase zugefügt und die Reaktionsgemische für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die Ligase zu inaktivieren folgte eine 20-minütige Inkubation bei 65°C und 600rpm im Thermomischer.

#### 4.16 Transformation von Bakterien

Die neu erstellte Plasmid-DNA wurde durch Transformation in den kompetenten E.coli Stamm JM109 eingebracht.

##### Material

###### JM109

Lagerung bei -80°C

**S.O.C. Medium**

5,1g	SOB Pulvermedium <sup>1</sup>
150ml	Aqua bidest.
2ml	KCl <sup>1</sup> zugeben (250mM)
Einstellen auf pH 7,0	
ad 200ml	Aqua bidest., Autoklavieren der Lösung
1ml	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup> -Lösung (2M, steril filtriert)
4ml	Glucose <sup>1</sup> Lösung (1M, steril filtriert)

**LB-Agar-Platten:**

25g	Luria Broth Base (LB)-Agar Pulver <sup>1</sup>
ad 1L	Aqua dest.; autoklaviert; Lagerung bei 4°C
Dem auf ca. 60°C abgekühlten, aber noch flüssigen Agar wurde Ampicillin <sup>11</sup> in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt.	

**Durchführung**

Die bei -80°C gelagerten Bakterien des E.coli-Stammes JM109 wurden für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Bei der Zugabe der Ligationsreaktion ist zu berücksichtigen, dass diese Bakterien aufgrund der chemischen Vorbehandlung äusserst instabile Zellwände besitzen. Daher wurden die 10µl Ligationsreaktion vorsichtig mit der Pipettenspitze eingerührt und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzebehandlung für 50 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Unmittelbar danach wurde der Transformationsansatz wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900µl S.O.C. Medium folgte eine einstündige Inkubation des Ansatzes bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator. Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension für 10 Minuten bei 1.000xg abzentrifugiert und das Pellet in 200µl S.O.C. Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Ansätze vollständig auf LB-Agar-Platten mit dem Selektionsfaktor Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nur E.coli mit integrierter Plasmid-DNA enthielten das Ampicillin und wurden selektioniert.

**4.17 Selektion plasmidpositiver Bakterienklone**

Zur Erfolgskontrolle der Ligation und anschließenden Transformation wurden jeweils 5 bis 10 Klone in einer konventionellen PCR (siehe 4.8) getestet.

**Material****LB-Medium**

25 g	Luria Broth Base (LB)-Pulver <sup>1</sup>
ad 1000 ml	Aqua dest.
pH 7,2 einstellen, sofort nach Herstellung autoklavieren; Lagerung bei 4°C	

**Ampicillin 100 µg/ml<sup>11</sup>**

Lagerung in 500 µl Aliquots bei -20°C

**Glycerol<sup>1</sup>****Primer<sup>10</sup> (siehe Tabelle 4.3)**

### **Durchführung**

Von den bebrüteten LB-Agarplatten wurden jeweils 5 – 10 Klone mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in jeweils 250µl sterilem LB-Medium mit dem Selektionsfaktor Ampicillin abgeworfen und für 3 Stunden bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine PCR mit Hilfe der Klonierungsprimer. Hierfür wurde jeweils 1µl der Bakteriensuspension als Template eingesetzt. In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese zeigte sich nur dann eine Bande der Basenpaarlänge des Inserts, wenn der Bakterienklon das vollständige Plasmid aufgenommen hatte.

Positive Klone wurden über Nacht in 6ml, den Selektionsfaktor Ampicillin enthaltendem LB-Medium, bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde ein Bakterienstock angelegt (850µl Bakteriensuspension + 150µl Glycerol) und aus der verbliebenen Bakteriensuspension das Plasmid mit Hilfe des „Wizard® Plus Miniprep Kits“(Promega)<sup>12</sup> isoliert.

## **4.18 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli-Bakterien**

### **Material**

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

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

### **Durchführung**

Die Aufreinigung des Plasmids aus der Bakteriensuspension erfolgte zunächst in kleinem Umfang mit Hilfe des „*Miniprep DNA Purification Kit*“. Sobald die korrekte Sequenz durch die Firma GATC Konstanz bestätigt wurde, folgte eine Aufreinigung im mittleren Maßstab mit Hilfe des „*Midiprep DNA Purification Kits*“. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

## **4.19 Erfolgskontrolle der Ligation**

Zur Überprüfung der korrekten Integration des Inserts in den Vektor wurde eine analytische Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen durchgeführt (siehe 4.13). Zu diesem Zweck wurde ein Enzym paar mit nur wenigen Schnittstellen ausgewählt, welches einerseits im Insert und andererseits im Vektor schneidet. In einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese konnte die korrekte Orientierung des Inserts im Vektor anhand der Fragmentlängen überprüft werden.

## 4.20 Rekombinante Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

### 4.20.1 Transiente Transfektion von HEK 293-T-Zellen

#### Material

1µg Plasmid

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

RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>

Metafectene<sup>13</sup>

#### Durchführung

Um eine 90%ige Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu erreichen, mussten diese bereits am Vortag der Transfektion ausgesät werden. Für Transfektionen in 24-Lochplatten wurden hierfür pro Delle  $5 \times 10^5$  Zellen in 0,5ml Standardmedium ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Konfluenz und Adhärenz die Transfektionslösung hergestellt. Hierzu wurden zunächst in zwei Polypropylen-Röhrchen jeweils 50µl RPMI 1640 Medium vorgelegt. In einem der vorbereiteten Röhrchen wurde 1µg Plasmid-DNA gelöst. In das zweite Röhrchen wurden 3µl Metafectene ohne Wandkontakt direkt in das Medium gegeben. Nach dem vorsichtigen Mischen der beiden Lösungen durch einmaliges Auf- und Abpipettieren folgte eine 15-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Abschließend wurde das Plasmid-Liposomen-Gemisch tropfenweise auf die adhärenenten Zellen gegeben. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HEK 293-Zellen bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Zellkultur-Brutschrank wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, abzentrifugiert und bei 4°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### 4.20.2 Stabile Transfektion von HEK 293-Zellen

Vorraussetzung für eine stabile Transfektion ist ein im Vektor enthaltenes Antibiotika-Resistenzgen. Durch Zusatz des Antibiotikums zum Zellkultur-Medium ist dann die Selektion transfizierter eukaryotischer Zellen möglich.

#### Material

1µg Plasmid

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

RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>

Metafectene<sup>13</sup>

Selektionsmedium:

450ml

50ml

RPMI 1640<sup>4</sup>

FBS<sup>2</sup>

Geneticin (G418)<sup>11</sup>(50mg/ml) 250 µg/ml  
Zusatz des Antibiotikums kurz vor Verwendung des Mediums.

### **Durchführung**

Die stabile Transfektion folgte zunächst dem Protokoll der transienten Transfektion mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der Transfektion durch Inkubation mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) einem Selektionsdruck ausgesetzt wurden. Die adhärennten transfizierten Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit gelöst und 10µl der Zellsuspension zu 20ml den Selektionsfaktor Geneticin enthaltendem Selektionsmedium gegeben. Diese Zellsuspension wurde dann mit 200µl pro Delle in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach ungefähr 2 bis 3 Wochen wuchsen sichtbare Kolonien. Sobald es zum Farbumschlag des Zellkulturmediums kam, wurden die Zellen aufsuspendiert, das gesamte Medium entnommen und verworfen, um dann die Delle wieder mit neuem Selektionsmedium aufzufüllen. Auf diese Weise wurde verhindert, dass plasmidnegative Klone sich aufgrund eines mit der Zeit einsetzenden Aktivitätsverlusts des zugesetzten Geneticins vermehren konnten. Sobald es wiederholt zum Farbumschlag des Medium kam, wurden die Zellen aufsuspendiert, in das nächstgrößere Zellkulturgefäß passagiert und unter weiter anhaltendem Selektionsdruck kultiviert.

### **4.21 Aufreinigung der rekombinanten Hühner-Interleukine über eine M2-Flag Gelmatrix**

Die im eukaryotischen Zellsystem exprimierten rekombinanten Zytokine waren alle mit einem Flag-Epitop markiert, wodurch eine affinitätschromatographische Aufreinigung der gesuchten Proteine aus den Zellkulturüberständen mit Hilfe der M2 Flag Gelmatrix möglich war.

### **Material**

**Anti-Flag® M2 Agarose from mouse<sup>6</sup>**  
Lagerung bei -20°C

Im Folgenden aufgeführte Puffer wurden autoklaviert, filtriert und bei 4°C gelagert.

**PBS, pH 7,2**

**Elutionspuffer: (Glycin-HCl 0,1M, pH 3,5)**

7,51g Glycin<sup>1</sup>  
ad 1Liter Aqua dest.  
mit HCl auf pH 3,5 eingestellt

**Neutralisationspuffer: (Tris-HCl 1M, pH 8,0)**

12,11g Tris, reinst<sup>1</sup>  
ad 100ml Aqua dest.  
mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

**PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub>**

0,2g NaN<sub>3</sub><sup>1</sup>  
ad 1Liter PBS, pH 7,2

**PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub> und 50% Glycerol**

0,2g NaN<sub>3</sub><sup>1</sup>  
50ml Glycerol<sup>1</sup>, für Molekularbiologie  
ad 100ml PBS, pH 7,2

**Dialyse-Puffer, pH 7,8**

23g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>1</sup>  
45g NaCl<sup>1</sup>  
1,65g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>1</sup>  
ad 5Liter Aqua dest.

**Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices, 10 kDa Cut-off<sup>14</sup>****Durchführung**

Um Zellen und Zelldedritus komplett aus den Überständen zu entfernen, wurden diese bei 3000 Umdrehungen und 4°C für 10 min. zentrifugiert, der pH mit Indikatorpapier überprüft, gegebenenfalls mit HCl oder NaOH neutralisiert und anschließend mittels 0,2µm Spritzenfilter steril filtriert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C Raumtemperatur. Nach Equilibrierung der Säule mit PBS wurde der Zellkulturüberstand mit einer peristaltischen Pumpe bei einer Flußgeschwindigkeit von 1ml/min. aufgetragen. Nach einem mindestens 30-minütigen Waschen der Säule mit PBS folgte die Elution des gebundenen Proteins. Hierfür wurde der Elutionspuffer auf die Säule aufgebracht, das Eluat aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung neutralisiert. Zum Re-Equilibrieren der Säule wurde diese nach der Elution mindestens 30 Minuten mit PBS gespült. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurde PBS-NaN<sub>3</sub> auf die Säule aufgebracht, zur Langzeitlagerung dagegen PBS-NaN<sub>3</sub> mit 50% Glycerol. Die Lagerung der Säule erfolgte bei 4°C. Die Eluate wurden gepoolt, in einen gewässerten Dialyseschlauch (*Cut-off* 14kDa) überführt und über Nacht bei 4°C unter Rühren in 5Litern Dialysepuffer umgepuffert. Größere Volumina wurden nach vorhergehender spektralphotometrischer Messung mittels spezieller Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert. Abschließend wurde nochmals der Proteingehalt spektralphotometrisch gemessen.

**4.22 SDS-PAGE****Material****4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8**

91g Tris<sup>1</sup>  
2g SDS<sup>1</sup>  
ad 500ml Aqua dest.,  
pH mit HCl auf 8,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

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

6,05g Tris<sup>1</sup>  
 0,4g SDS<sup>1</sup>  
 ad 100ml Aqua dest.  
 pH mit HCl auf 6,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

**APS 10%**

0,5g Ammoniumpersulfat (APS)<sup>1</sup>  
 ad 5ml Aqua bidest.,  
 Lagerung bei -20°C in Aliquots von 110µl

**TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyläthylendiamin)<sup>1</sup>****Trenngel 15%**

2,5ml Aqua bidest.  
 2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
 5ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>1</sup>  
 50µl APS 10%  
 10µl N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)<sup>1</sup>  
 in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

**Sammelgel 4%**

6,17ml Aqua bidest.  
 2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
 1,33ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>1</sup>  
 50µl APS 10%  
 20µl TEMED<sup>1</sup>  
 in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

**5x Elektrophoresepuffer**

15,1g Tris<sup>1</sup>  
 72,0g Glycin<sup>1</sup>  
 5,0g SDS<sup>1</sup>  
 ad 1000ml Aqua dest.  
 zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen; Lagerung bei 4°C

**6x Probenpuffer (Lämmli)**

7ml 4x TrisCl/SDS-Puffer pH 6,8  
 3ml Glycerol<sup>1</sup>  
 1g SDS<sup>1</sup>  
 1mg Bromphenolblau<sup>1</sup>  
 ad 10ml Aqua bidest.  
 Lagerung bei -20°C in 1ml Aliquots

**β-Mercaptoethanol (β-ME)<sup>1</sup>****Prestained Protein Molekulargewichtsmarker, 10-180kDa<sup>9</sup>****Durchführung**

In eine Gelgießvorrichtung passend für „BioRad mini Protean 3 Cell“ wurde zunächst das 15%ige 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 dem 4%igen Sammelgel überschichtet und der entsprechende Probenaschenkamm sofort eingesetzt. Nach weiteren 20 min. Polymerisationszeit des Sammelgels wurde

das Gel in die Kammer eingespannt, die Kämme entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zu 20µl der Proben wurden 4µl 6x Probenpuffer (Lämmli) gegeben. Wurde unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet, mussten zusätzlich 5% β-ME dazupipettiert werden.

Danach wurde die Probe im Thermomixer bei 600rpm für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden 20µl der Proben bzw. 6µl der Marker in die Geltaschen eingebracht, die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 25mA gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke bis zum Ende auf 50mA erhöht. Der Prozess wurde jeweils gestoppt, wenn die Bromphenolblau Lauffront des Probenpuffers aus dem Gel herauszulaufen begann.

#### 4.23 Coomassie-Färbung

##### Material

###### Coomassie-Färbelösung

450ml Methanol<sup>1</sup>  
100ml Essigsäure 96%<sup>1</sup>  
2,5g Coomassie-Brillant-Blau R-250<sup>1</sup>  
ad 1000ml Aqua bidest.  
Lagerung bei RT.  
Die Färbelösung wurde mehrfach verwendet.

###### Entfärbelösung

250ml Methanol<sup>1</sup>  
100ml Essigsäure 96%<sup>1</sup>  
ad 1000ml Aqua bidest.  
Lagerung bei RT.  
Die Entfärbelösung wurde nach Gebrauch zur Wiederverwendung mit Aktivkohle entfärbt.

##### Durchführung

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Gele für 30 Minuten in saurer, methanolischer Coomassie-Färbelösung denaturiert, fixiert und gefärbt. Das Entfernen des unspezifisch gebundenen Coomassie Brilliant Blau erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Stunden durch Inkubation in Entfärbelösung bis zur Vollentwicklung des Bandenmusters. Die Nachweisgrenze der Coomassie Brilliant Blau Färbelösung liegt bei 0,5µg Protein.

Die Gele wurden anschließend mit dem *Image Quant 300*, *GE Healthcare* abgebildet und das Bandenmuster mit der *ImageQuant Capture 300 Software* von *Molecular Dynamics* ausgewertet.

## 4.24 Western Blot

### Material

**SDS-PAGE (siehe 4.22)**

**Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa<sup>9</sup>**

**Blotting-Puffer, pH 8,3**

3,03g Tris<sup>1</sup>  
 14,4g Glycin<sup>1</sup>  
 ad 900ml Aqua dest.  
 100ml Methanol<sup>1</sup>

Mittels NaOH und HCl wurde pH 8,3 eingestellt.

Lagerung bei 4°C

**Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2µm<sup>15</sup>**

**Filterpapier<sup>16</sup>**

**Blockierlösung**

4g Magermilchpulver<sup>1</sup>  
 ad 100ml PBS-Tween

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

500µl Tween20<sup>1</sup>  
 ad 1000ml PBS, pH-Wert auf 7,2 eingestellt

**ECL-Lösung<sup>25</sup>**

**Antikörper:**

*Tabelle 4.4 Im Western Blot eingesetzte Antikörper*

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Herkunft	Konzentration	Referenz
<b>ChCD40L Nachweis im Western Blot</b>					
anti-ChCD40L	ChCD40L	IgG1	Maus	1µg/ml	[48]
anti-mouse IgG-POD	Maus IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	<sup>20</sup>
anti-mouse CD8	Maus CD8	IgG1	Ratte	1µg/ml	[48]
anti-rat IgG-POD	Ratten IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	<sup>36</sup>
<b>Flag-ChIL10 Nachweis im Western Blot</b>					
anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1µg/ml	<sup>6</sup>
anti-mouse IgG-POD	Maus IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	<sup>20</sup>

Flag-ChIL6 Nachweis im Western Blot					
anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1µg/ml	6
anti-mouse IgG-POD	Maus IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	20
anti-ChIL6	ChIL-6	IgG (polyklonal)	Kaninchen	10µg/ml	[404]
anti-rabbit IgG POD	Kaninchen IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	18

### Durchführung

Die Übertragung der mittels SDS-Gelelektrophorese größenmäßig aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zum immunochemischen Nachweis erfolgte im „BioRad Criterion<sup>TM</sup>“-Blotter.

Den Gelen wurde unmittelbar nach abgeschlossener SDS-PAGE eine Cellulosemembran aufgelegt und jeweils Gel und Membran zwischen zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen in ein „Blotting Sandwich“ eingebaut und in die Apparatur eingesetzt. Unter Einsatz eines auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlten Kühlelements und einen auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlten Blottingpuffer wurde der Blot-Vorgang mit dem „Bio-Rad Power-Pac 200“ bei 100 Volt für 30 Minuten durchgeführt.

Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren wurden die Membranen im Anschluss mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert oder über Nacht in Blockierlösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler gelagert.

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine wurden spezifische Antikörper in PBS-T angesetzt. Die Membran wurde nach sechsmaligem Waschen mit Waschlösung für jeweils 10 bis 20 min. in ein 50ml Zentrifugations-Röhrchen gegeben, um zu gewährleisten, dass diese während der Inkubation mit dem Primär-Antikörper stets vollständig bedeckt war. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Drehen/Schwenken bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht.

Ungebundener Primär-Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Membran mit Waschlösung für jeweils 10 bis 20 Minuten entfernt. Im Anschluß daran wurde ein gegen den Primär-Antikörper gerichteter Sekundär-Antikörper, der mit dem Enzym POD (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist, für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Dazu wurde der Antikörper 1:20.000 in PBS-T verdünnt. Durch sechsmaliges Waschen für jeweils 10 bis 20 min. wurde ungebundener Sekundär-Antikörper entfernt.

Zur Detektion der immunologisch spezifisch markierten Proteine wurden die Membranen

aus der PBS-T-Lösung auf Folien gelegt und tropfenweise mit der nach Herstellerangaben angemischten ECL-Lösung bedeckt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Exposition eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

#### **4.25 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA-Test)**

Um die Konzentration des affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteins zu bestimmen wurde der hochsensitive (bis 5 µg/ml Protein), kolorimetrische BCA-Test angewandt. Hierbei bindet BCA im alkalischen Milieu an Protein-Kupfer-Komplexe und bildet dabei einen violetten Farbkomplex, der photometrisch erfasst werden kann.

##### **Material**

**Puffer, in dem das zu bestimmende Protein gelöst wurde**

**BSA-Standard<sup>17</sup>**

**Gebrauchsfertige BCA-Lösung (Uptima®)<sup>17</sup>**

##### **Durchführung**

Der Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurde eine Standardreihe von 5 bis 250 µg/ml BSA hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurden danach 25 µl Proteinlösung (Proben im Triplikat und Standardreihe) mit 200 µl gebrauchsfertiger BCA-Lösung (Uptima) gemischt. Danach erfolgte die Inkubation für 30 min. bei 60°C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion mittels Plattenphotometer bei 562 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt. Anschließend wurde die Standardkurve erstellt. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden, deren Extinktionswerte im linearen Bereich der Standardkurve lagen.

#### **4.26 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)**

Der ELISA diente zum Nachweis des rekombinanten Proteins und seiner Konzentrationsbestimmung im Zellkultur-Überstand und im affinitätschromatographisch aufgereinigten Eluat.

##### **Material**

**NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten<sup>19</sup>**

**Beschichtungspuffer pH 9,6**

3,11 g Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

6 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

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

**Magermilchlösung 4%**

4g Magermilchpulver<sup>1</sup>  
 ad 100ml PBS  
 kurz vor Gebrauch ansetzen

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

0,5ml Tween20<sup>1</sup>  
 ad 1000ml PBS

**TMB-Puffer**

8,2g Na-Azetat (CH<sub>3</sub>COONa)<sup>1</sup>  
 3,15g Zitronensäure-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>xH<sub>2</sub>O)<sup>1</sup>  
 ad 1000ml Aqua bidest,  
 Lagerung bei 4°C

**TMB-Stammlösung**

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

**TMB Gebrauchslösung**

10ml TMB-Puffer 37°C  
 332µl TMB Stammlösung  
 3,0µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup>  
 kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

**Schwefelsäure 1M**

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

Wasser vorlegen und langsam unter Rühren die Säure zugeben.

**Antikörper:**

*Tabelle 4.5 Im ELISA eingesetzte Antikörper*

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
<b>Flag-ChIL-10 ELISA</b>					
anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1 µg/ml	6
anti-Flag-POD	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1:5.000	6
<b>Flag-ChIL-6 ELISA</b>					
anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1 µg/ml	6
anti-Flag-POD	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1:5.000	6
anti-ChIL-6	ChIL-6	IgG (polyklonal)	Kaninchen	10 µg/ml	[404]
anti-rabbit IgG POD	Kaninchen IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:20.000	18

## Standardverfahren

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

Die Beschichtung der Platten erfolgte stets am Vortag durch Aufbringen von 100µl des in Beschichtungspuffer verdünnten Antikörpers und anschließender Inkubation bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag wurde nicht gebundener Beschichtungs-Antikörper durch Waschen der Platte entfernt und die freien Bindungsstellen durch Aufbringen von 200µl einer 4%igen Magermilchlösung blockiert. Nach einstündiger Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C wurden 100µl der zu testenden Probe aufgetragen. Im Anschluss daran folgte die Inkubation mit 50µl eines geeigneten Sekundär-Antikörpers für maximal 60 Minuten. Die Entwicklung wurde gestartet durch Auftrag von 100µl einer auf 37°C vorgewärmten TMB-Gebrauchslösung und anschließender Inkubation für 5-10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Im Fall einer positiven Reaktion kam es zur Blaufärbung der Delle. Zum Abstoppen der Peroxidasereaktion wurden ohne weiteren Waschschrift 50µl einer 1M Schwefelsäure zugegeben, wodurch sich ein Farbumschlag von blau nach gelb ergab. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung bei  $\lambda=450\text{nm}$  im Plattenphotometer.

Tabelle 4.6 Aufbau des Interleukin-ELISAs

ELISA	Beschichtung	Probe	Primärer Antikörper	Detektions-Antikörper
Flag-ChIL-10 ELISA	Mouse-anti-Flag-M2 (1µg/ml)	HEK-293-(T)-Überstand oder aufgereinigt (log2)	-	Mouse-anti-Flag M2-POD (1:5.000)
anti-ChIL-6 ELISA	Mouse-anti-Flag-M2 (1µg/ml)	HEK-293-(T)-Überstand oder aufgereinigt (log3)	anti-ChIL-6 (10µg/ml)	Goat-anti-rabbit-IgG-POD (1:20.000)

### 4.27 Quantitativer Chicken-Immunglobulin-ELISA

Diese Methode diente der quantitativen Erfassung der von Hühner-Plasmablasten und Plasmazellen sezernierten Antikörper-Mengen in Zellkultur-Überständen Zytokin-stimulierter Hühner-Milz-Leukozyten.

## Material

### NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten<sup>19</sup>

**Beschichtungspuffer pH 9,6** (siehe 4.26)

**PBS-T pH 7,2 (0,05% Tween 20)** (siehe 4.26)

**TBS-T (0,05% Tween 20) pH 7,4**

5,8g Natrium-Chlorid (NaCl) (100mM)<sup>1</sup>  
12,1g Tris (100mM)<sup>1</sup>  
ad 1000ml Aqua dest.

**Caseinlösung 1%ig**

1g Casein<sup>32</sup>

ad 100ml PBS pH 7,4 bzw. TBS pH 7,4

Für Proben-Verdünnung Caseinlösung 1%ig in PBS-T zw. TBS-T:  
Tween 20 erst dazu geben, wenn Casein gelöst ist

**PBS pH 7,4**

**Hühner-Serum als Positiv-Kontrolle und für die Qualitätskontrollen**

**Substratpuffer**

7,1g Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (100mM)<sup>1</sup>  
ad 500ml Aqua dest.

10,5g Zitronensäure-Monohydrat (100mM)<sup>1</sup>  
ad 500ml Aqua dest.

Vor Gebrauch: 60% 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit 40% 100mM Zitronensäure-Monohydrat mischen

**esTMB<sup>33</sup>**

Gebrauchslösung: 2/3 Substratpuffer mit 1/3 esTMB mischen;  
Kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort aufbrauchen

**1M Schwefelsäure** (siehe 4.26)

**Antikörper für Beschichtung und Detektion** (siehe Tabelle 4.7)

## Durchführung

Soweit nicht anders angegeben wurden jeweils 100µl aufgetragen und die Platten zwischen den einzelnen Schritten mit PBS-T gewaschen.

Die Beschichtung in der, in Tabelle 4.7 aufgeführten Konzentration, erfolgte bereits am Vortag, die Inkubation analog zum konventionellen ELISA (4.26). Im Unterschied zum herkömmlichen ELISA musste bei allen nachfolgenden Schritten auf eine konstante Raum- und Proben-Temperatur von 22-24°C geachtet werden und die Blockierung mit 1%iger Caseinlösung ebenfalls bei 22-24°C durchgeführt werden. Die Verdünnungen der Proben, Positivkontrollen und Qualitätskontrollen wurden, mindestens als Duplikate, auf einer separaten Rundlochplatte entsprechend den Angaben in Tabelle 4.7 hergestellt und dann auf die ELISA-Platte aufgetragen. Gemäß den Angaben in Tabelle 4.7 wurden nach einstündiger Inkubation bei 22-24°C 50µl des Detektions-Antikörpers aufgetragen und wiederum eine Stunde inkubiert. Die Entwicklung erfolgte durch Auftrag der esTMB-

Gebrauchslösung für 10 min. und nachfolgendem Abstoppen der Farbreaktion mit 50µl 1M Schwefelsäure. Die Messung erfolgte bei 450nm im Plattenphotometer, die Auswertung mittels „4-point-curve-fit“.

	<b>a-IgM</b>	<b>a-IgA</b>	<b>a-IgG</b>
<b>Beschichtungs-Antikörper</b>	M1 (2µg/ml)	A1 (2µg/ml)	4D12 (2µg/ml)
<b>Blockierung</b>	1%ige Caseinlösung in PBS pH 7,4		
<b>Proben</b>	1:20; 1:100; 1:500	1:100; 1:500; 1:2.500	1:20.000; 1:100.000; 1:500.000
<b>Verdünnungspuffer</b>	TBS-T pH 7,4 +1%Casein	PBS-T pH 7,4 +1% Casein	
<b>Qualitätskontrolle</b>	1:150 / 1:1.00	1:1.000 / 1:10.000	1:500.000 / 1:10.000.000
<b>Positivkontrolle</b>	1:16-log3	1:50-log3	1:20.000-log3
<b>Detektions-Antikörper</b>	M2-POD 1:500	A3-POD 1:3.500	G1-POD 1:5.000

Tabelle 4.7 Aufbau des quantitativen ELISA zur Bestimmung der Ig-Konzentration in Zellkultur-Überständen

#### 4.28 ELISPOT-Assay

Diese Methode ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung Antikörpersezernierender Plasmablasten und Plasmazellen auf Einzelzellniveau. Diese durch eine hohe Spezifität und Sensitivität gekennzeichnete Methode ermöglicht es Aussagen über das Ausmaß des Immunglobulin-Klassenwechsels zu treffen.

#### Material

##### Multiscreen HTS-IP ELISPOT-Platten<sup>14</sup>

##### 35%ige Ethanol-Lösung

35ml Ethanol 99%ig<sup>1</sup>  
ad 100ml Aqua dest.

##### PBS, pH 7,2, steril (siehe 4.2)

##### PeliSPOT-Puffer<sup>34</sup>

##### PBS-T (0,01% Tween20)

100µl Tween20<sup>1</sup>  
ad 1000ml PBS, pH auf 7,2 eingestellt

##### Aqua dest.

##### True Blue-Substrat<sup>35</sup>

##### Antikörper (siehe Tabelle 4.8)

	<b>a-IgM</b>	<b>a-IgA</b>	<b>a-IgG</b>
<b>Beschichtung</b>	goat-anti-chicken light chain (5µg/ml) <sup>37</sup> in sterilem PBS		
<b>Blockierung</b>	PeliSPOT-Puffer <sup>34</sup> (100µl/Delle)		
<b>Zellkonzentration</b>	1 bis 5 x 10 <sup>5</sup> c/ml	1x10 <sup>5</sup> bis maximal 2x10 <sup>6</sup> c/ml	
<b>Verdünnungspuffer</b>	Antikörper-Verdünnungen mit PeliSPOT-Puffer		
<b>Positivkontrolle (Serum)</b>	1:500	1:500	1:10.000
<b>Primärer Antikörper</b>	M1-Biotin 300ng/ml	K3-Biotin 300ng/ml	4D12-Biotin 300ng/ml
<b>Detektions-Antikörper</b>	Streptavidin-POD <sup>38</sup> 1:4.500		

Tabelle 4.8 Aufbau eines ELISPOT-Assay

### Durchführung

Bereits am Vortag wurde eine Nitrozellulose-ELISPOT-Mikrotiterplatte beschichtet. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen zunächst 15µl 35%ige Ethanol-Lösung pro Delle für 1 min. aufgetragen und anschließend 3 Mal mit sterilem PBS gewaschen. Auf die ausgeklopfte Platte wurde die vorbereitete Verdünnung des Beschichtungs-Antikörpers in einer Konzentration von 5µg/ml auf die ausgeklopfte Platte aufgetragen, mit einer Klebefolie versehen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde am folgenden Tag durch 3-maliges Waschen mit sterilem PBS entfernt und die Platte anschließend mit 100µl PeliSPOT-Puffer pro Delle für 2 Stunden bei 40°C blockiert. Die bereits über 6 Tage hinweg Zytokin-stimulierten Milz-Leukozyten wurden über Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert, auf 1x10<sup>5</sup> c/ml eingestellt, und 100µl dieser Zellsuspension pro Delle aufgetragen. Dies entspricht 10.000 Zellen pro Delle. Nach 48h Inkubation bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> wurden die Zellen durch 5-maliges Waschen mit PBS-T von der Platte entfernt und anschließend der biotinylierte Antikörper wie in Tabelle 4.8 aufgeführt in Duplikaten aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte 5 Mal mit PBS-T gewaschen und anschließend als Detektions-Antikörper 50µl Peroxidase-konjugiertes Streptavidin pro Delle aufgetragen und wiederum 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an das 5-malige Waschen der Platte mit PBS-T folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Auf die ausgeklopfte Platte wurden nachfolgend 50µl „True Blue“-Substrat pro Delle für 5-10 min. aufgetragen. Das farblose Substrat wird in der Folge an den Stellen gebundenen Antigens durch das Enzym Peroxidase in ein blaues Substrat konvertiert, wodurch sich an den Stellen Spots ausbilden. Die Farbreaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt sobald die Spots intensiv blau gefärbt waren. Nach Trocknung der Nitrozellulose-Membran erfolgte die Messung und Auswertung mit Hilfe des AID-ELISPOT-Readers.

#### 4.29 IFN $\gamma$ Nachweis (HD11-Assay)

Die indirekte Quantifizierung des IFN $\gamma$  in den Zellkultur-Überständen IL-10-stimulierter Milz-Leukozyten erfolgte mit Hilfe der Hühner-Makrophagen-Zelllinie HD11. Hierbei macht man sich zunutze, dass Makrophagen/Monozyten auf eine IFN- $\gamma$ -Stimulation hin Stickoxid (NO) sezernieren, welches sich im Medium in stabiles Nitrit umwandelt und durch eine Farbreaktion (Griess-Reaktion) photometrisch nachgewiesen werden kann.

#### Material

##### Zu testende Zellkultur-Überstände

##### HD11-Medium (siehe 4.3.1)

##### IFN $\gamma$ -Standard (293-T-Zellkultur-Überstand) 1:100-log<sub>2</sub>

##### RPMI 1640<sup>4</sup>

##### 1 mM Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)<sup>1</sup>

##### Griess-Reagenz

Lösung A mit Lösung B kurz vor Gebrauch zu gleichen Teilen mischen

Lösung A: 1g Sulfanilamid<sup>6</sup>  
ad 100ml Phosphorsäure, 2,5%ig

Lösung B: 0,3 g Naphtylethylendiamin<sup>6</sup>  
ad 100ml Phosphorsäure, 2,5%ig

bei RT lösen; Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt

#### Durchführung

Bereits einen Tag vor Ansatz dieses Tests wurde eine sterile Mikrotiterplatte mit 10 $\mu$ g/ml TCR2-Antikörper in sterilem PBS bei 4°C beschichtet. Nach der Gewinnung der Milz-Leukozyten am folgenden Tag wurden diese in einer Konzentration von 1x10<sup>7</sup> Zellen pro ml in rChIL-10-haltigem Medium bzw. in Standardmedium aufgenommen und auf der mit sterilem PBS gewaschenen Platte ausgesät. In einer Reihe wurde der 1:100 verdünnte IFN $\gamma$ -Standard log<sub>2</sub> titriert. Es folgte eine Inkubation für 24h bei 40°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 $\mu$ l einer HD11-Zellsuspension (1x10<sup>6</sup> Zellen/ml) mit 100 $\mu$ l des zu testenden Zellkultur-Überstands von anti-TCR2- und rChIL-10-stimulierten Milzzellen versetzt und für weitere 24h inkubiert (40°C, 5% CO<sub>2</sub>). Von diesem Zellkultur-Überstand wurden 50 $\mu$ l entnommen, auf eine neue Mikrotiterplatte übertragen und mit 50 $\mu$ l Griess-Reagenz versetzt, wodurch es zu einem Farbumschlag kam. Als Standard wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe einer 250 $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>-Lösung mitgeführt. Die Detektion des Farbumschlags erfolgte im Plattenphotometer bei 520nm.

#### 4.30 IL-6 Nachweis (7TD1-Assay)

Bei diesem auf dem Prinzip eines Proliferationsassays basierenden kolorimetrischen Nachweistest macht man sich die IL-6-Abhängigkeit der murinen Hybridomzelllinie 7TD1

zunutze. Die durch Interleukin-6 induzierbare und konzentrationsabhängige Proliferation kann zur Bestimmung des IL-6-Gehalts genutzt werden.

## Material

### 7TD1-Medium (siehe 4.3.1)

#### XTT-Lösung:

- 1mg XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) Benzolsulfonsäure)<sup>1</sup>
  - 1 ml RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>
- Kurz vor Gebrauch ansetzen.

#### PMS-Lösung (5mM Stammlösung):

- 1,53 mg Phenazin-Methosulfat (PMS)  
(N-methyldibenzopyrazin Methylsulfat-Salz)<sup>1</sup>
  - 1 ml PBS, pH 7,2, steril
- Lagerung lichtgeschützt bei 4° C bis zu 3 Monate möglich.

## Durchführung

Die zu testenden Zellkultur-Überstände wurden zunächst auf einer sterilen Rundlochplatte in IL-6-freiem 7TD1-Medium austitriert. Hiervon wurden 100µl pro Delle einer 96-Flachlochplatte übertragen. Als Negativkontrolle wurden 7TD1-Zellen mit IL-6-freiem Medium versetzt. Als Positivkontrolle diente das durch E.coli prokaryotisch exprimierte rekombinante chicken IL-6, welches in einer Konzentration von 1ng/ml eingesetzt wurde. Die zu testenden Zellkultur-Überstände wurden in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben wurden log<sub>10</sub> Titrationsen durchgeführt.

Die 7TD1-Zellsuspension wurde aus den Zellkulturflaschen entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, dieses mit PBS aufgefüllt und bei 400xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert und wiederum bei 400xg für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wiederholte sich insgesamt 3 bis 4 Mal. Anschließend wurde das Pellet in 7TD1-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und auf eine Zellkonzentration von 5x10<sup>4</sup> Zellen pro ml eingestellt. Auf die bereits vorbereitete 96-Flachlochplatte wurden pro Delle 100µl dieser Zellsuspension aufgetragen.

Nach Abschluss der 96-stündigen Inkubation bei 37°C und 5%CO wurde die XTT-Gebrauchslösung durch Zugabe von 5µl PMS-Lösung je 1ml XTT-Lösung angesetzt und 50µl hiervon auf jede Delle gegeben. In der sich nun anschließenden Inkubationszeit von 4 Stunden unter den gleichen Bedingungen kam es im Fall einer positiven Reaktion zum Farbumschlag des Mediums. Ursache hierfür ist die enzymatische Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen, die eine Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT in das orangerote Formazan bewirken. Um Formazan-Kristalle zu lösen

wurden die Platten zunächst 1 Minute auf einen Schüttler gestellt und im Anschluss daran die Extinktionswerte bei  $\lambda=450\text{nm}$  im Plattenphotometer ermittelt. Die pro Kavität gemessenen Extinktionen sind dabei der Zahl vitaler 7TD1-Zellen proportional und geben somit Aufschluss über die Konzentration des IL-6 in den Proben.

### 4.31 Durchfluss-Zytometrie

Die Messungen wurden an den Fluorescence Activated Cell Scannern *FACScan*® und *FACS Calibur*® der Firma BD durchgeführt und mit *Cell Quest Pro*® und *Flowjo*® ausgewertet.

#### Material

##### Fluo-Puffer

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

##### FACS-Puffer

100mg NaN<sub>3</sub><sup>1</sup>  
 ad 1000ml PBS  
 Lagerung bei Raumtemperatur

##### Propidiumjodid (PI)

200µg Propidiumjodid<sup>2</sup>  
 ad 1ml PBS

##### 7-Amino-Actinomycin-D<sub>17</sub> (7-AAD) 200µg/ml

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

#### Antikörper für die Durchfluss-Zytometrie:

Klonname	Gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
<b>AV20</b>	ChB6	IgG1	Maus	2 µg/ml	[405]
<b>AV79</b>	ChCD40	IgG2a	Maus	2 µg/ml (0,1µg/ml?)	[15]
<b>anti-CD80</b>	CD80	IgG2a	Maus	0,5 µg/ml	<sup>30</sup>
<b>Bu1 a+b</b>	ChB6	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[14]
<b>2G1</b>	Ig light chain	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[406]
<b>CT-3</b>	CD3	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[407]
<b>LD-42</b>	MHC II	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand	<sup>31</sup>

Tabelle 4.9 In der Durchfluss-Zytometrie eingesetzte primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Goat-anti-Maus-IgG-FITC <sup>6</sup>	1:250
Goat-anti-Maus-IgG-PE <sup>20</sup>	1:300
Goat-anti-Maus-IgG1-FITC <sup>20</sup>	1:200
Goat-anti-Maus-IgG2a-FITC <sup>20</sup>	1:100
Goat-anti-Maus-IgG2b-FITC <sup>20</sup>	1:200
Goat-anti-Maus-IgG1-PE <sup>20</sup>	1:300
Goat-anti-Maus-IgG2a-PE <sup>20</sup>	1:300

Tabelle 4.10 In der Durchfluss-Zytometrie eingesetzte Sekundär-Antikörper

### Einfachfärbung

Volumenangaben beziehen sich im Folgenden auf eine Kavität einer 96-Rundlochplatte. Sämtliche Verdünnungen wurden in Fluo-Puffer angesetzt. Inkubationsschritte erfolgten stets in Dunkelheit auf Eis.

### Durchführung

Für die durchflusszytometrische Analyse kamen zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kavität einer 96-Rundlochplatte zum Einsatz. Zunächst wurden die Dellen mit Fluo-Puffer aufgefüllt und anschließend die Platte für 1 Minute bei  $716 \times g$  zentrifugiert. Überstände wurden verworfen und das Pellet in  $50 \mu\text{l}$  primärem Antikörper resuspendiert. Es folgten eine 25-minütige Inkubation auf Eis und anschließend ein weiterer Waschschrift mit  $150 \mu\text{l}$  Fluo-Puffer. Im Anschluss daran wurden die Zellpellets in  $50 \mu\text{l}$  des fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörpers resuspendiert und weitere 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein letzter Waschschrift mit  $150 \mu\text{l}$  Fluo-Puffer. Zur Messung wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von  $400 \mu\text{l}$  Fluo-Puffer aufgenommen und in geeignete Probenröhrchen überführt. Für eine Lebend-Tot-Färbung wurden noch  $10 \mu\text{l}$  Propidiumjodid ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) bzw. 7-AAD ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) je Röhrchen zugefügt.

### Doppelfärbung

Für Doppelfärbungen wurden primäre Antikörper unterschiedlichen Isotyps miteinander kombiniert. Die Färbung erfolgte dann mit isotypspezifischen Sekundär-Antikörpern (z.B. AV20 (IgG1) vs. anti-CD80 (IgG2a)).

### Durchführung

Zunächst wurden die Zellen gleichzeitig mit beiden primären Antikörpern für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Hierzu wurden  $50 \mu\text{l}$  je Antikörperverdünnung aufgetragen. Nach dem

Waschschrift wurden die Zellen mit 50µl einer Mischung aus beiden isotypspezifischen, aber unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern gefärbt. Im Fall einer zusätzlichen Lebend-Tot-Färbung wurden kurz vor der Messung noch 10µl 7-AAD (2µg/ml) zu den gefärbten Zellen gegeben.

#### **4.32 B-Zellseparation mittels MACS®**

Aus der gemischten Zellpopulation der Organpräparationen wurde die reine B-Zellfraktion mit Hilfe der MACS (= Magnetic Cell Sorting) -Separation isoliert.

##### **Material**

###### **Standardmedium (siehe 4.3.1)**

###### **Medium 5% FBS**

25ml FBS<sup>2</sup>  
5ml Penicillin/Streptomycin<sup>2</sup>  
ad 500ml RPMI 1640 Medium<sup>4</sup>

###### **anti-L-Kette**

**anti-Maus-Ig-FITC<sup>6</sup>** (Verdünnung 1:50 in Medium)

**MACS anti-FITC-Microbeads<sup>21</sup>**

**MACS Separation Column LS<sup>21</sup>**

##### **Durchführung**

Zunächst wurden die Milz-Leukozyten wie unter 4.2.2 präpariert und gezählt. Aufgrund der Tatsache, dass an die Säule auch tote Zellen unspezifisch gebunden werden und die lebenden, separierten Zellen weiter kultiviert werden sollen, musste auf eine sehr hohe Viabilität der Zellen von mindestens 90% geachtet werden. Auch die eingesetzte Zellzahl durfte nicht überschritten werden, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. Um die Kapazität der Säule nicht zu überschreiten, wurden maximal  $5 \times 10^8$  Zellen pro Säule eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst für 10 Minuten bei 225xg und 4°C abzentrifugiert, das Zellpellet anschließend in 500µl je  $1 \times 10^7$  Zellen anti-L-Ketten-Antikörper (Zellkultur-Überstand) resuspendiert und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit 5% FBS-Medium und eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 225xg und 4°C und die daran anschließende Resuspension des Pellet in 50µl anti-Maus-Ig-FITC je  $1 \times 10^7$  Zellen. Auch daran schloss sich eine 25-minütige Inkubation auf Eis an. Nach einem weiteren Waschschrift und vollständiger Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 92,5µl 5% FBS-Medium je  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Zu dem Medium wurden 7,5µl „MACS anti-FITC-Microbeads“ je  $1 \times 10^7$  Zellen gegeben und die Zellsuspension weitere 15 Minuten in Dunkelheit bei 6-12°C inkubiert.

Währenddessen wurde die Säule in den Magneten eingespannt und mit 3ml 5% FBS-

Medium befeuchtet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen, anschließend in 1ml Medium je  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und in 2ml Fraktionen auf die Säule aufgetragen. Sowohl von der aufgetragenen Zellsuspension (Vor-Separation), als auch vom aufgefangenen Durchfluss (Negativ-Fraktion) wurden jeweils 25 $\mu$ l für die abschließende durchflusszytometrische Analyse zurückbehalten und auf Eis gestellt. Die Säule wurde dann dreimal mit 4ml Medium gewaschen, aus dem Magneten genommen und weitere 5ml Medium aufgetragen. Mit Hilfe eines Stempels wurde das Eluat gewonnen, die so gewonnenen Zellen gewaschen und in Standardmedium resuspendiert. Auch hiervon wurden 25 $\mu$ l (Positiv-Fraktion) entnommen und auf Eis gestellt.

Die 3 Proben wurden in jeweils 300 $\mu$ l Fluo-Puffer aufgenommen und konnten nun ohne weitere Färbeschritte für die durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Reinheit der Separation verwendet werden. Für den Einsatz der Zellen in weitergehenden Versuchen wurde eine Reinheit von mindestens 93% vorausgesetzt.

### **4.33 *In vitro*-Funktionstests**

#### **4.33.1 Bestimmung der Überlebensrate**

Um den Einfluß der rekombinanten Zytokine auf die Überlebensrate zu bestimmen, wurden primäre Hühner-B-Zellen der Milz oder die im bursalen Stadium fixierte Hühner-B-Zelllinie DT40 für 24 Stunden kultiviert und im Anschluß daran die Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

#### **Material**

**rChCD40L**

**rChIL-10- und rChIL-6-HEK 293-Zellkultur-Überstand oder aufgereinigt**

**Trypanblau-Färbelösung<sup>2</sup>**

**Fluo-Puffer** (siehe 4.31)

**FACS-Puffer** (siehe 4.31)

**Propidiumjodid (PI)** (siehe 4.31)

#### **Durchführung**

Je  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml wurden in je eine Delle einer 24-Lochplatte pipettiert und in Medium allein, oder Medium mit Zusatz von Zytokin bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen aufsuspendiert und 10 $\mu$ l der Zellsuspension mit 10 $\mu$ l Trypanblau-Färbelösung versetzt, um die Anzahl lebender und toter Zellen in einer

modifizierten Zählkammer nach Neubauer zu bestimmen.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Frequenz lebender DT40-Zellen wurden die verbliebenen 990µl der Zellsuspension nach 24 Stunden entnommen und durch Zentrifugation mit PBS bei 225xg für 10 min. bei 4°C gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 300µl Fluo-Puffer resuspendiert, in Polypropylen-FACS-Röhrchen überführt und der Zellsuspension 10µl Propidiumjodid zugesetzt.

#### **4.33.2 Bestimmung der Proliferation**

Die Proliferation unstimulierter sowie stimulierter Zellen wurde durch den Einbau des radioaktiv markierten DNA-Bausteins [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA sich teilender Zellen quantifiziert.

##### **Material**

rChCD40L

rChIL-6

rChIL-10

[<sup>3</sup>H]-Thymidin<sup>25</sup>

##### **Durchführung**

Zunächst wurden 100µl einer entsprechenden Verdünnung des zu untersuchenden Wachstumsfaktors (ChCD40L, ChIL-6 oder ChIL-10) pro Delle einer 96-Flachlochplatte aufgebracht. Verdünnungen wurden stets in Standard-Medium angesetzt. Sofern nicht anders angegeben wurden log<sub>2</sub> Titrationsen in Triplikaten angesetzt. Als Negativkontrolle zum Nachweis der Grundproliferation wurden immer auch unstimulierte Zellen mitgeführt. Im Anschluss daran wurden 100µl einer Zellsuspension der Konzentration 1x10<sup>7</sup> Zellen pro ml aufgetragen. Die Inkubation bursaler Lymphozyten erfolgte für 24 Stunden, die der Milz-Leukozyten dagegen für 48 Stunden bei 41°C und 5%CO<sub>2</sub> im Zellkultur-Brutschrank. Das Pulsen der Zellen erfolgte durch Aufbringen von 20µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro Delle, was einer Aktivität von 0,5µCi/ml bzw. 18,5kBq per Delle entspricht. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation bei 41°C und 5%CO im Brutschrank wurde die Messung der Platten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mittels Harvester auf einen Glasfaserfilter überführt, bei 70°C getrocknet und anschließend in eine Multiscreen-Platte eingespannt und pro Delle 20µl der Szintillationsflüssigkeit („Microscint“) aufgetragen. Zuletzt wurde die Platte mit einer Klebefolie versiegelt und die Radioaktivität des inkorporierten [<sup>3</sup>H]-Thymidins in einem Beta-Counter (Topcount) mit einer Zählzeit von 1 min pro Delle bestimmt. Die Proliferation wurde als Funktion der Radioaktivität in cpm dargestellt.

## 4.34 Transmissions-Elektronenmikroskopie

### Pelletieren und Fixieren der Zellen

#### Material

##### Biocoll Separation Solution (Ficoll)<sup>2</sup>

##### Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky

2g	Paraformaldehyd-Pulver in 25ml Aqua bidest. gelöst
10ml	25%iges Glutaraldehyd <sup>23</sup>
25mg	CaCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>
ad 100ml	0,2 M Cacodylatpuffer

##### 0,2 M Cacodylat-Puffer, pH 7,4

17,12g	Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat <sup>23</sup>
ad 500ml	Aqua dest.
pH 7,4 mit NaOH und HCl eingestellt	
Lagerung bei 4°C	

#### Durchführung

Die durch MACS-Separation isolierte B-Lymphozyten-Population wurde insgesamt 6 Tage mit zytokinhaltigem Medium kultiviert. Hierzu wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 1ml Standardmedium pro Delle einer 24-Lochplatte gegeben. Zum Abnahmezeitpunkt (Tag 0, 3 und 6) wurden die Zellen aufsuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und eine Dichtegradienten-Zentrifugation wie unter 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Interphase wurde abgenommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und zweimal mit PBS gewaschen (1.000xg, 6°C für 5 Minuten). Nach vorsichtiger Abnahme des Überstands, ohne das Pellet von der Gefäßwand zu lösen, wurden 500µl Karnovsky-Fixans aufpipettiert und das Pellet 2 Stunden bei 4°C fixiert. Um eine Verdünnung des Fixans, durch im Cup verbliebenen Überstand zu vermeiden, wurde nach einstündiger Fixierung bei 4°C das Fixans ausgetauscht. Nach Abnahme des Fixans wurden 500µl Cacodylat-Puffer aufpipettiert und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

#### Einbettung in Kunstharz

#### Material

##### Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid-Lösung

2%	OsO <sub>4</sub> Stammlösung
3%	Kaliumferrocyanid <sup>11</sup>
Im Mischverhältnis 1:1	

##### Alkoholreihe

50%	iger Ethanol (unvergällt) <sup>23</sup>
70%	iger Ethanol (unvergällt) <sup>23</sup>
90%	iger Ethanol (unvergällt) <sup>23</sup>
96%	iger Ethanol (unvergällt) <sup>23</sup>
100%	iger Ethanol (unvergällt) <sup>23</sup>

**Propylenoxid<sup>23</sup>****Einbettmedium**Epoxydharz Poly/Bed 812-BDMA Embedding Kit<sup>23</sup>**Durchführung**

Die Zellpellets wurden in den Eppendorf-Cups belassen. Die Aufbereitung der Proben erfolgte unter größter Vorsicht, um ein Lösen des Pellets zu verhindern. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Spülen:	Cacodylat-Puffer	3 mal	über Nacht
Kontrastierung:	Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid		4 Stunden
Spülen:	Cacodylat-Puffer	3 mal	5 Minuten
Dehydrieren:	aufsteigende Alkoholreihe	2-3 mal	15 Minuten
	50%, 70%, 90%, 100%		
	Propylenoxid	2 mal	15 Minuten
Infiltration:	Propylenoxid-Epoxydharz (2:1)		1 Stunde
	Propylenoxid-Epoxydharz (1:1)		über Nacht
	Propylenoxid-Epoxydharz (1:2)		12 Stunden
	Epon (rein)		1 Stunde

Tabelle 4.11 Protokoll zur Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

Das Aushärten des Kunstharzes innerhalb der Cups erfolgte bei 60°C und erforderte 2-3 Wochen.

**Trimmen und Schneiden****Material****Eukitt<sup>27</sup>****Toluidinblau-Lösung****Uranylacetat**

7,7 g Uranylacetat<sup>28</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

**Bleicitrat**

1,33 g Bleinitrat<sup>27</sup>  
1,76 g Natriumcitrat<sup>1</sup>  
30 ml Aqua bidest.  
8 ml 1N NaOH  
ad 50 ml Aqua bidest.

**Durchführung**

Nach dem Entfernen des Cups wurde die Probe mit einer Trimmvorrichtung angeschnitten. Danach wurden mit dem Ultramikrotom Semidünnschnitte (1µm) angefertigt, auf Objekt-

träger aufgezogen und durch Auftropfen von Toluidinblau eingefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Aqua dest. abgespült und die Schnitte anschließend auf der Wärmeplatte getrocknet. Nach dem Eindecken der Schnitte mit Eukitt wurde die Probe auf die, für die Untersuchung interessanten Bereiche, durch erneutes Trimmen reduziert, Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfernetze positioniert. Abschließend erfolgte die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat nach folgendem Protokoll:

Uranylacetat	10 Minuten
Waschen mit Aqua bidest.	
Bleicitrat	1-2 Minuten
Waschen mit Aqua bidest.	

*Tabelle 4.12 Protokoll zur Kontrastierung der Proben für die Elektronenmikroskopie*

Betrachtung und Photographie der Schnitte erfolgte mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop vom Typ Zeiss EM902.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expression der Zytokine ChCD40L, ChIL-6 und ChIL-10

Um sich einen ersten Überblick über die Genexpression der zu untersuchenden Zytokine zu verschaffen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst unter Verwendung der Primer Express 3.0-Software anhand der annotierten Gensequenzen, die für diese Zytokine spezifischen Primer erstellt, um im Anschluss daran die Genexpression nachweisen zu können.

Primer	Primersequenz
<b>ChIL-6 sense</b>	5'GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA <sup>3'</sup>
<b>ChIL-6 antisense</b>	5'GCTTCGACGAGGAGAAATGC <sup>3'</sup>
<b>ChIL-10 sense</b>	5'CGGGAGCTGAGGGTGAAGT <sup>3'</sup>
<b>ChIL-10 antisense</b>	5'CAGCCAAAGGTCCCCTTAAAC <sup>3'</sup>
<b>ChCD40L sense</b>	5'CTTCCAGGACCTCCAATGC <sup>3'</sup>
<b>ChCD40L antisense</b>	5'CTGCTGTTGAGTCCGTCACA <sup>3'</sup>
<b>ChCD40 sense</b>	5'CCTCTGAATGCAACGACACA <sup>3'</sup>
<b>ChCD40 antisense</b>	5'TTCGTCCCTTTCACCTTCAC <sup>3'</sup>
<b>β-Aktin sense</b>	5'TACCACAATGTACCCTGGC <sup>3'</sup>
<b>β-Aktin antisense</b>	5'CTCGTCTTGTTTTATGCGC <sup>3'</sup>

*Tabelle 5.1 Verwendete Primer zur Durchführung einer RT-PCR*

*Aufgelistet sind die unter Zuhilfenahme der Primer Express 3.0 Software erstellten Primerpaare für die zu untersuchenden Zytokine ChCD40L, ChIL-10 und ChIL-6, sowie der Zytokin-Rezeptor ChCD40. Als Positivkontrolle kamen die Primer des Housekeeping-Gens β-Aktin zum Einsatz.*

Für die Genexpressionsanalyse wurden in erster Linie die lymphatischen Organe Milz, Bursa und Caecal-Tonsille ausgewählt, die ganz entscheidend an der B-Zellentwicklung und Differenzierung beim Huhn beteiligt sind. Zum Vergleich wurden neben dem Thymus als Ort der T-Zelldifferenzierung auch die Organe Lunge und Gehirn untersucht.

Aufgrund der heterogenen zellulären Zusammensetzung der lymphatischen Organe, insbesondere der Milz, die sowohl B-Zellareale als auch T-Zellareale aufweist, war es erforderlich die B-Zellfraktion mittels „*magnetic cell sorting*“ (MACS) zu isolieren und die Reinheit der erhaltenen Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Nur so konnten Rückschlüsse auf die Herkunft der exprimierten Zytokine gezogen werden.

In Abbildung 5.1, ist exemplarisch für ein Tier das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. In der Probe vor Separation (A) und nach Separation (B) wurde die B-Zellfrequenz in der Milzzellpräparation durch Färbung mit einem B-Zellspezifischen Antikörper (anti-L-Kette) bestimmt. Für Untersuchungen zu isolierten B-Zellen wurden

nur Proben mit einer Reinheit von >90% verwendet.

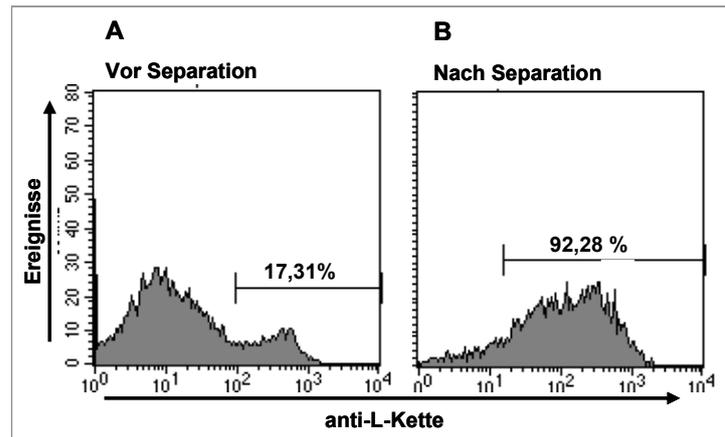


Abbildung 5.1 Reinheit der isolierten B-Zellfraktion

Aus der Milzzellsuspension mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene Leukozyten wurden mit einem gegen die leichte Kette des B-Zellrezeptors gerichteten Antikörper gefärbt, um anschließend mit dem MACS-System die B-Zellfraktion zu isolieren. Der Anteil der B-Zellen wurde durchflusszytometrisch vor (A) und nach (B) der Separation bestimmt und ist hier in Prozent angegeben.

Mit Hilfe der in Tabelle 5.1 aufgeführten Primer wurde dann eine RT-PCR auf der cDNA der oben genannten Organe, sowie der mittels MACS isolierten B-Zellen durchgeführt.

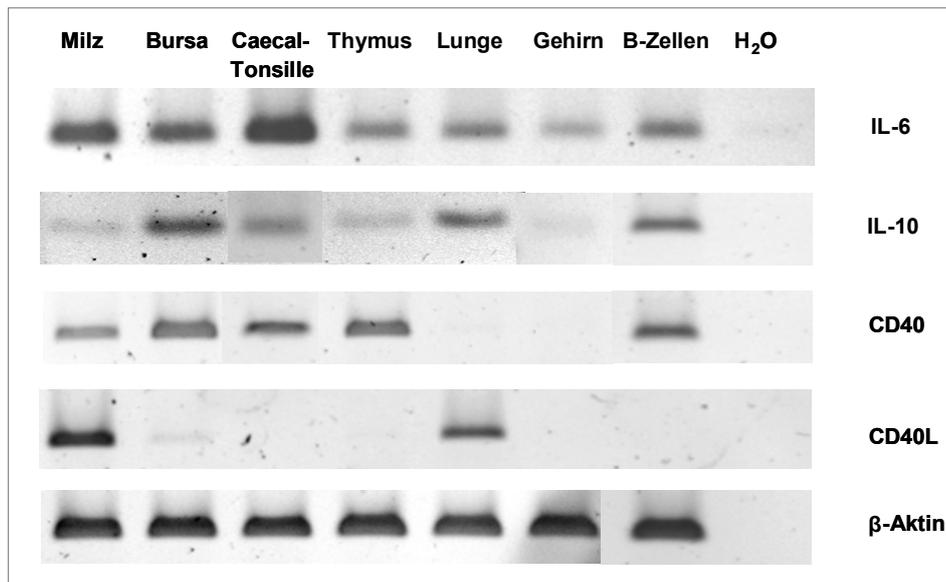


Abbildung 5.2 Genexpressionsanalyse auf lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe

Unter Verwendung der in Tabelle 5.1 aufgeführten Primer wurde eine RT-PCR auf cDNA der aufgeführten Organe und Zellpopulationen durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Ansatz mit nukleasefreiem Wasser anstelle der template cDNA.

Die Zytokine ChIL-6 und ChIL-10 die sowohl an der B-Zellentwicklung als auch an Differenzierungsprozessen im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion beteiligt sind, können in allen lymphatischen Organen nachgewiesen werden. Dass B-Zellen beide Zytokine exprimieren, wird an der starken Bande der MACS-gesorteten B-Zellen der Milz

in Abbildung 5.2 ersichtlich. Die starke Bande auf cDNA der Lunge, sowie die ChIL-6-Bande auf cDNA des Gehirns ist ein erster Hinweis auf den pleiotropen Charakter dieser Zytokine.

Der von B-Zellen exprimierte Rezeptor CD40 wird in den lymphatischen Organen stark exprimiert, wohingegen keine Expression in Lunge und Gehirn nachweisbar ist. Der TNF-Ligand CD40L, der von aktivierten T-Zellen, nicht jedoch von B-Zellen exprimiert wird und für die Kostimulation im Rahmen der B-Zellaktivierung unabdingbar ist, wird besonders stark in der Milz exprimiert, in geringerem Umfang auch in Caecal-Tonsille und Bursa. Daneben lässt sich eine hohe Expression in der Lunge nachweisen. Wie aus der Abbildung ebenfalls ersichtlich ist, war die aufgetragene cDNA-Menge der verschiedenen Organe und Zellpopulationen vergleichbar, was an der Bande für das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin zu erkennen ist.

## 5.2 CD40L

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von CD40L auf B-Zellen des Huhnes untersucht werden. Hierfür mussten zunächst größere Mengen des rekombinanten ChCD40L-Protein generiert werden.

### 5.2.1 Nachweis des rekombinanten ChCD40L

In Zusammenarbeit mit dem „Institute of Animal Health“ in Compton, UK, wurde der rekombinante ChCD40L mit Hilfe einer stabil transfizierten CHO-Zelllinie eukaryotisch exprimiert, die Zellkultur-Überstände gesammelt und mit Hilfe einer anti-mouse-CD8 $\alpha$ -beladenen Chromatographie-Säule gewonnen, wie unter [48] beschrieben. Zum Nachweis der Reinheit des affinitäts-chromatographisch aufgereinigten, rekombinanten Proteins wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt.

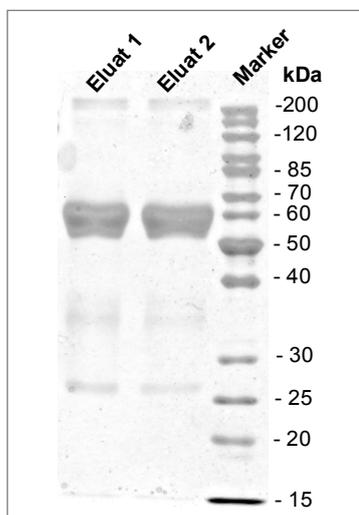


Abbildung 5.3 SDS-Gelelektrophorese des rekombinanten ChCD40L  
Zellkultur-Überstand einer mit ChCD40L-CD8 $\alpha$  stabil transfizierten CHO-Zelllinie wurde mittels anti-CD8 $\alpha$ -Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die Reinheit von zwei Eluaten wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden je 3  $\mu$ g des rekombinanten Proteins über ein 12%iges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt.

Um die Reinheit des Eluats bestimmen zu können, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. In einem 12%igen SDS-Gel sind, wie Abbildung 5.3 zeigt, zwei durch die Affinitäts-chromatographische Aufreinigung der gesammelten Zellkultur-Überstände erhaltene Eluate aufgetrennt worden. In beiden Fällen ist eine starke Bande auf Höhe des anhand der Sequenz errechneten Molekulargewichts von 55kDa zu erkennen. Daneben sind nur sehr schwache Verunreinigungen als schwache Banden auf Höhe von circa 26 und 36 sowie oberhalb der 200kDa-Markerbande zu erkennen. Insgesamt weisen die Eluate somit einen hohen Reinheitsgrad auf.

Um einen spezifischen Nachweis des rekombinanten Proteins zu führen, wurde zusätzlich eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Wie Abbildung 5.4 zeigt, konnte sowohl unter Verwendung des gegen ChCD40L gerichteten, monoklonalen Antikörpers (AV71), als auch mit einem Antikörper gegen das CD8 $\alpha$ -Tag des rekombinanten Proteins für beide Eluate eine distinkte Bande auf Höhe des errechneten Molekulargewichts von 55kDa detektiert werden. Die Färbung mit anti-CD8 $\alpha$  ergab zusätzliche Banden auf Höhe von circa 40kDa und oberhalb der 170kDa-Markerbande, wobei die größere einem Trimer des ChCD40L entsprechen könnte.

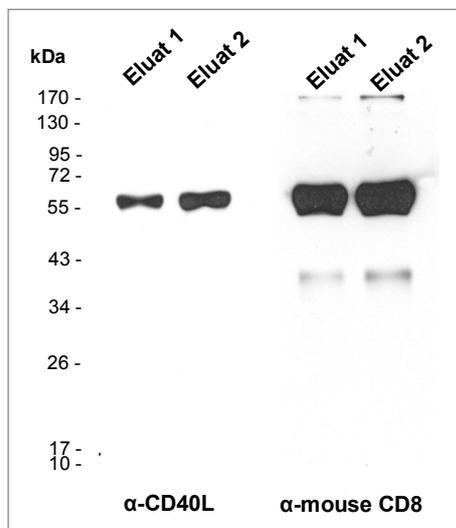


Abbildung 5.4 Ergebnis der Western Blot-Analyse des rekombinanten ChCD40L

Es wurde jeweils 1 $\mu$ g der Eluate aufgetragen. Links dargestellt das Ergebnis der Inkubation mit 1 $\mu$ g/ml anti-ChCD40L-Antikörper (AV71) und goat-anti-mouse IgG-POD 1:20.000 als Detektions-Antikörper, rechts für die Inkubation mit 1 $\mu$ g/ml anti-mouse CD8-Antikörper und goat-anti-rat IgG-POD 1:20.000 als Detektions-Antikörper. Entwickelt wurde mit ECL-Lösung gemäß Herstellerangaben.

## 5.2.2 Biologische Aktivität des rekombinanten ChCD40L

Die biologische Aktivität des gereinigten, rekombinanten ChCD40L mußte nun im Anschluss unter Verwendung verschiedener Funktionsassays untersucht werden.

### 5.2.2.1 Proliferation von B-Zellen

Um den Effekt des ChCD40L auf die Proliferation der B-Zellen untersuchen zu können, mussten die Leukozyten der Milz und Bursa zunächst mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen werden. Anschließend folgte eine 48-stündige Inkubation einer

definierten Zellzahl mit 2 µg/ml ChCD40L. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Detektion der Proliferation mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay wie unter 4.33.2 beschrieben.

Um einen unspezifischen Effekt, hervorgerufen durch Zugabe eines Fremdproteins, auszuschließen, wurde für die nachfolgenden Funktionsassays ein Kontrollprotein in der gleichen Konzentration eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein biologisch inaktives Protein, welches durch Deletion einer Aminosäure im ChCD40L kodierenden Gen generiert wurde.

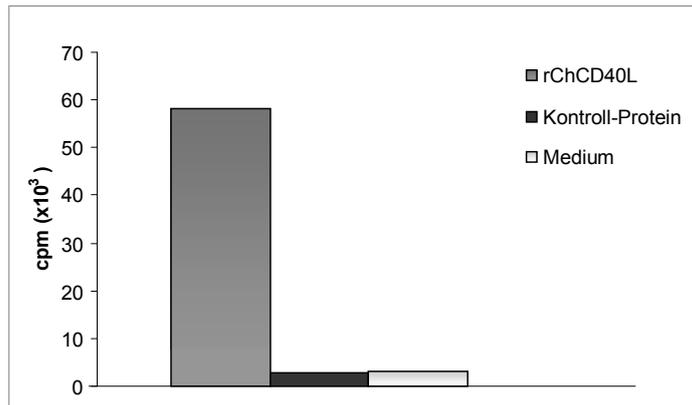


Abbildung 5.5 ChCD40L-induzierte Proliferation

Die aus der Milzellsuspension isolierten Leukozyten wurden für 48h mit 2 µg/ml rChCD40L bzw. dem Kontrollprotein oder ohne Stimulation (Medium) inkubiert. Nach Zugabe des radioaktiven [<sup>3</sup>H]-Thymidin folgten weitere 16h Inkubation und anschließende Messung im Szintillationsmessgerät. Angegeben sind die counts per minute (cpm)x10<sup>3</sup>. Repräsentativ für 4 Experimente zeigt diese Abbildung die Proliferation für ein Tier.

Wie aus Abbildung 5.5 zu ersehen ist, induziert der rekombinante ChCD40L eine um den Faktor 30 höhere, massive Proliferation der Milz-B-Zellen des Huhnes. Das Kontrollprotein zeigt dagegen keinerlei proliferationssteigernde Wirkung. Sowohl die unstimulierten Milz-B-Zellen als auch die mit dem Kontrollprotein stimulierten Zellen weisen nur eine basale Proliferationsrate von durchschnittlich 2500cpm auf.

Dass es sich bei der induzierten Proliferation um eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung des rChCD40L handelt, wurde anhand weiterer Proliferationsassays untersucht. Die Präparation der Leukozyten von Milz und Bursa und anschließende Inkubation erfolgte wie oben beschrieben, allerdings mit dem Unterschied, dass die Zellen nun mit unterschiedlichen Konzentrationen des rChCD40L stimuliert wurden.

Wie Abbildung 5.6 zeigt, ist die durch den rekombinanten ChCD40L induzierte Proliferation der Leukozyten ein dosisabhängiger Prozess. Auch in der Bursa konnte noch nach 48-stündiger Inkubationszeit eine massive Proliferation nachgewiesen werden. Die maximale Proliferationsrate wird mit der höchsten Konzentration von 2 µg/ml des rekombinanten Proteins erreicht. Das Kontrollprotein hingegen bewirkte unabhängig von der eingesetzten Konzentration keinerlei Proliferationssteigerung.

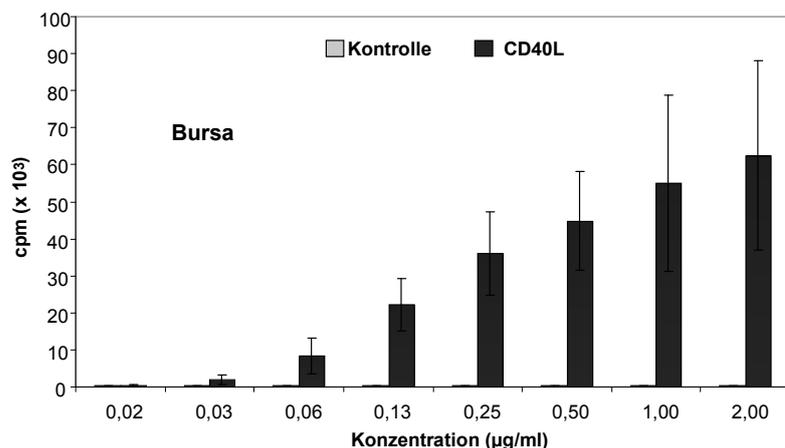
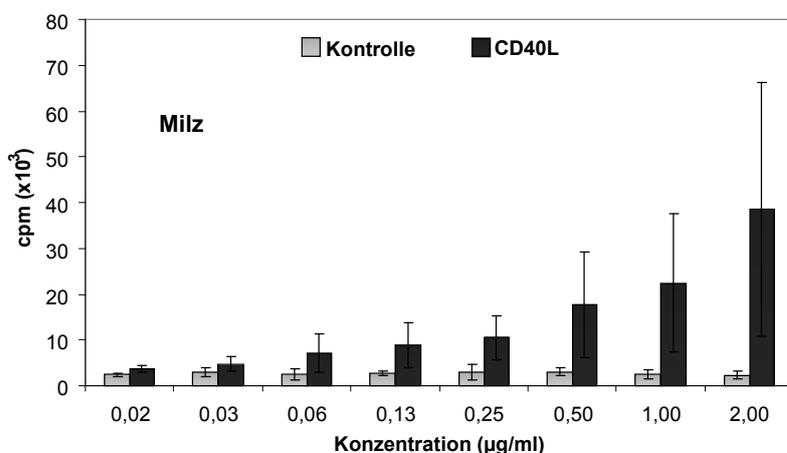


Abbildung 5.6 Dosisabhängigkeit der Proliferation ChCD40L-stimulierter Leukozyten

Die aus Milz und Bursa isolierten Leukozyten wurden für 48h mit den im Diagramm angegebenen Konzentrationen des rChCD40L bzw. Kontrollprotein stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Zugabe des  $[^3\text{H}]$ -Thymidin, der sich eine 16-stündige Inkubation und abschließende Messung im Szintillationsmessgerät anschloss.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Tieren.



### 5.2.2.2 Proliferation von DT40-Zellen

Neben dem Einfluss des rChCD40L auf primäre B-Zellen des Huhnes wurde auch der Einfluss auf die aviäre Leukosevirus (ALV)-transformierte Hühner-B-Zelllinie DT40 untersucht. Um herauszufinden, wie diese, im bursalen Stadium arretierte B-Zelllinie, die viele Merkmale von primären bursalen B-Zellen aufweist, auf den rChCD40L reagiert, wurde die Proliferation von DT40-Zellen nach Stimulation mit ChCD40L untersucht.

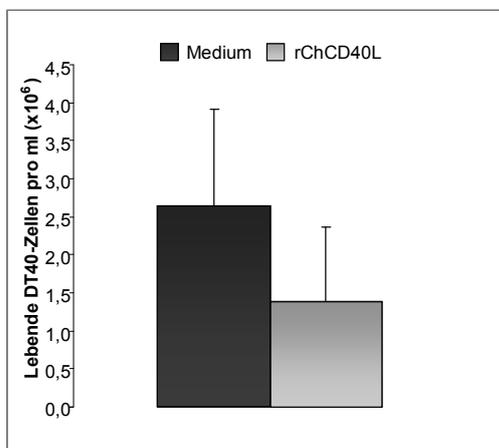


Abbildung 5.7 Reduzierte Proliferation lebender DT40-Zellen in rChCD40L-stimulierten Kulturen

DT40-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  c/ml mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rChCD40L in Kultur genommen. Als Kontrolle dienten in Medium kultivierte DT40-Zellen.

Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen nach 24h Kultur, bestimmt in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung.

Die Abbildung zeigt jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Versuchen.

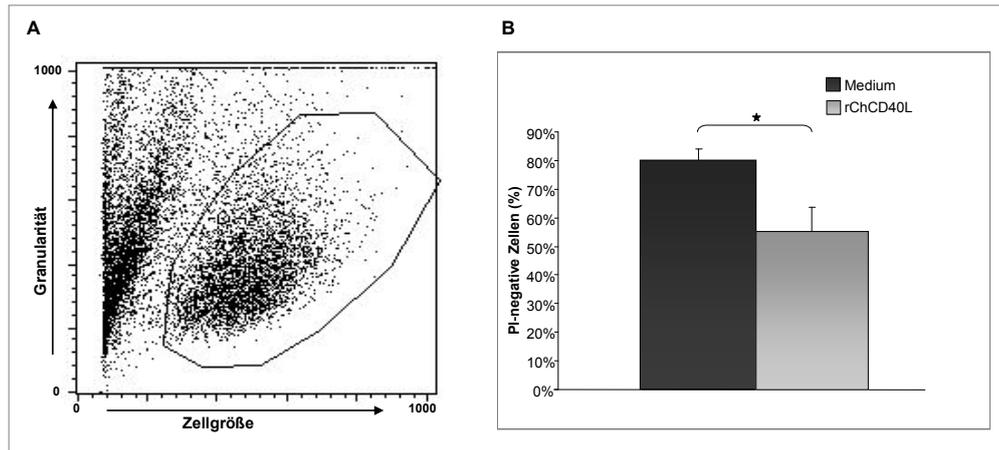


Abbildung 5.8 Durchflusszytometrisch erfasste Zahl lebender DT40-Zellen

Nach 24-stündiger Kultur der DT40-Zellen ( $1 \times 10^6$  c/ml) mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rChCD40L, wurde der Prozentsatz lebender Zellen mittels Propidium-Jodid-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten in Medium kultivierte DT40-Zellen.

A) Exemplarische Darstellung des Gating-Verfahrens zur Quantifizierung lebender PI-negativer Zellen als Dot Blot

B) Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des Prozentsatzes lebend gegateter DT40-Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen.

\*:  $P < 0,05$ ; T-Test

Die niedrigere Anzahl lebender DT40-Zellen nach 24-stündiger Kultur zeigt, dass die Zugabe von rChCD40L zu einer reduzierten Proliferation führt. Während in Medium kultivierte DT40-Zellen stark proliferieren und nach 24 Stunden Kultur eine 2 bis 4-fach höhere Zellzahl (von  $1 \times 10^6$  auf bis zu  $4 \times 10^6$  c/ml), als zu Beginn des Versuches aufweisen, kommt es, wie Abbildung 5.7 zeigt, unter dem Einfluss des rChCD40L zu einem wesentlich geringeren Anstieg der Zellzahl von  $1 \times 10^6$  auf  $1,5 \times 10^6$  bis maximal  $2,5 \times 10^6$  c/ml. In der Durchflusszytometrischen Analyse (Abbildung 5.8 A) konnte zudem gezeigt werden, dass es nach 24-stündiger Kultur mit rChCD40L zu einer Zunahme der Frequenz toter, PI-positiver Zellen kam. Während Kulturen von DT40-Zellen in Medium noch 80% lebende Zellen aufweisen, kommt es im Vergleich dazu in den mit rChCD40L behandelten Kulturen zu einer signifikanten Reduktion auf 55% lebende Zellen (Abbildung 5.8 B).

Im Gegensatz zu primären bursalen B-Zellen des Huhnes induziert CD40L keine Proliferation in DT40-Zellen, sondern inhibiert das Zellwachstum.

### 5.2.2.3 Aktivierung von B-Zellen

Aufgrund des positiven Effekts des rChCD40L auf die Proliferation der B-Zellen des Huhnes sollte nun auch der Einfluss auf die B-Zellaktivierung näher beleuchtet werden. Hierzu wurde die Leukozytenfraktion aus der Milzzellsuspension isoliert und mit

rChCD40L in einer Konzentration von  $0,5\mu\text{g/ml}$  für insgesamt 120 Stunden stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die stimulierten Zellen entnommen und einer Doppelfärbung mit einem gegen den B-Zellmarker Bu1 gerichteten Antikörper (AV20) und einem CD80-spezifischen Antikörper unterzogen, um die Expression von CD80 auf B-Zellen zu bestimmen.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, wie in Abbildung 5.9 zu erkennen ist, einen deutlichen Anstieg der CD80-positiven B-Zellfraktion unter dem Einfluss des rChCD40L. Wie Abbildung 5.9 B zeigt, sind die frisch isolierten Lymphozyten der Milz CD80-negativ. Bereits nach 48 Stunden Inkubationszeit in rChCD40L enthaltendem Medium ist neben der CD80-negativen B-Lymphozytenfraktion auch eine CD80-positive B-Zellfraktion nachweisbar. Nach 120-stündiger Kultur hat sich das Verhältnis immer weiter zugunsten der CD80-positiven B-Zellfraktion hin verschoben.

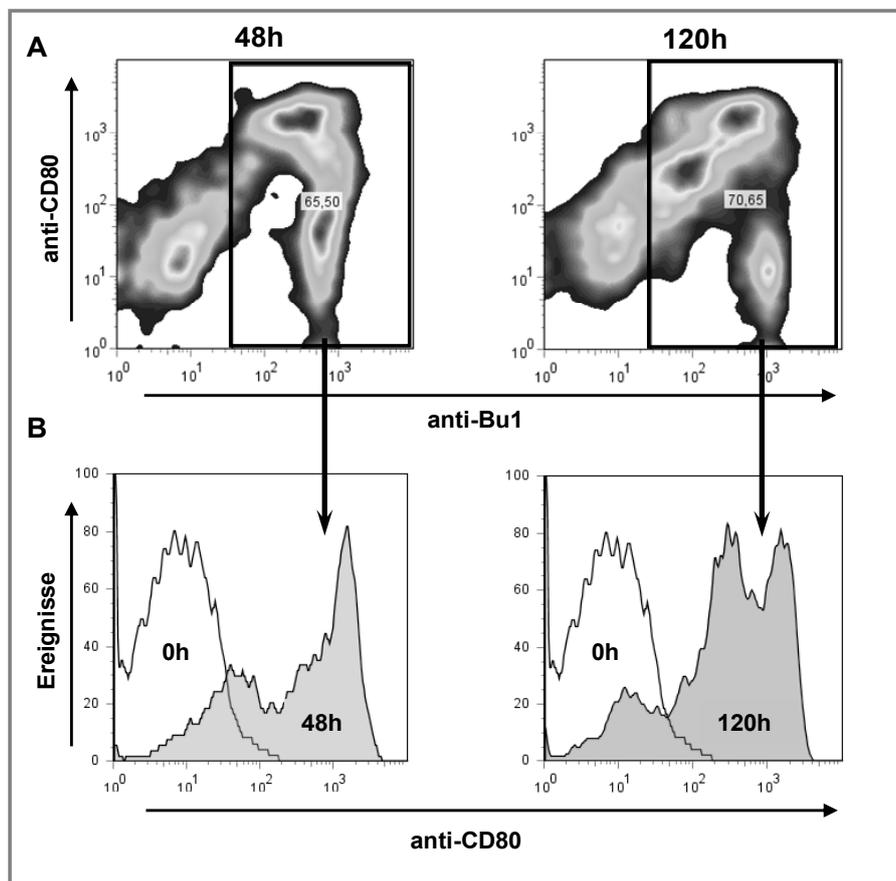


Abbildung 5.9 Frequenz CD80-positiver B-Zellen nach Stimulation mit rChCD40L

Leukozyten der Milz wurden isoliert und für insgesamt 120h mit rChCD40L in einer Konzentration von  $0,5\mu\text{g/ml}$  stimuliert. (A) Zu den Zeitpunkten 48h und 120h wurden Zellen entnommen und einer Doppelfärbung unterzogen. Unter Verwendung eines gegen den B-Zelloberflächenmarker Bu1 gerichteten Antikörpers und einen gegen CD80 gerichteten Antikörper konnte die Frequenz der CD80-positiven B-Zellen im Durchfluss-Zytometer bestimmt werden.

Abbildung B zeigt die umrahmte Population der Bu1-positiven B-Zellen der Abbildung A (grau) zu verschiedenen Zeitpunkten (48h und 120h) nach Stimulation bzw. direkt nach Präparation (0h).

Nach 48 Stunden CD40L-Stimulation der Milz-Leukozyten ist neben der negativen bis schwach positiven B-Zellfraktion auch eine stark positive B-Zellfraktion zu erkennen. Nach 120 Stunden beschreibt die Histogramm-Kurve der CD80-positiven B-Zellfraktion (Abbildung 5.9 B, grau) einen biphasischen Verlauf, aufgrund zweier CD80-positiven B-Zellfraktionen neben der negativen Fraktion. Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Subpopulation der B-Lymphozyten eine Aktivierung erfährt, wurde anhand der Zellgröße eine weitere Untergliederung der Population lebender Lymphozyten in kleine Lymphozyten und Lymphozyten vom blastoiden Phänotyp vorgenommen.

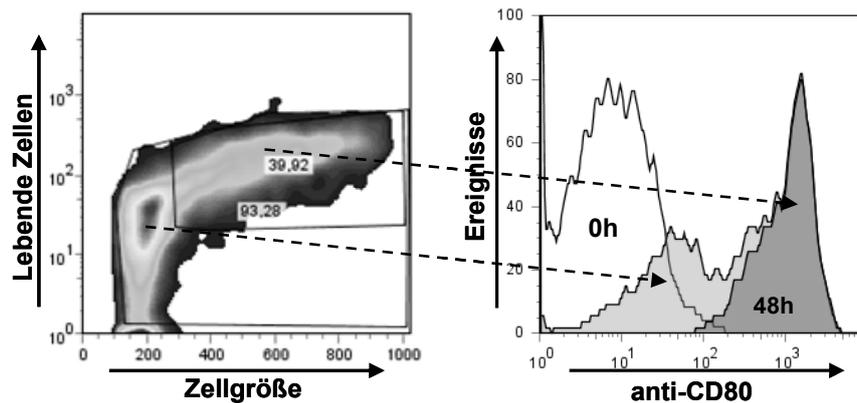


Abbildung 5.10 CD80-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der B-Lymphozyten

Links sind in einem Dotplot die lebenden Lymphozyten in Abhängigkeit zu ihrer Zellgröße dargestellt. Die Separation in kleine Lymphozyten und Lymphozyten vom blastoiden Phänotyp wird nochmals durch den kleinen umrahmten Bereich verdeutlicht.

Rechts ist nochmals das bereits aus Abbildung 5.9 bekannte Ergebnis der Färbung mit dem anti-CD80 Antikörper als Histogramm dargestellt, um den Anteil der einzelnen Subpopulationen lebender B-Lymphozyten aufzuzeigen. Zum Vergleich ist wiederum das Ergebnis der Färbung unstimulierter Milz-Leukozyten dargestellt.

Naive B-Lymphozyten, die aus einer Zellteilung hervorgehen, sind an ihrer erhöhten Zellgröße zu erkennen. Erst nach Durchlauf der Differenzierungsschritte nimmt ihre Zellgröße immer weiter ab und stellt somit auch einen Hinweis auf ihren Reifegrad dar. Wie in Abbildung 5.10 zu erkennen, weist die unter dem Einfluss des rChCD40L stark proliferierende B-Zellpopulation nach 48-stündiger Kultur bereits eine deutliche Separation in kleine B-Lymphozyten, die nicht proliferiert haben, und große, neu entstandene Lymphoblasten (links, kleiner umrahmter Bereich) auf. Auf die CD80-positive B-Zellpopulation bezogen, ist der jeweilige Anteil dieser verschiedenen B-Zellpopulationen in Abbildung 5.10, rechts nochmals dargestellt. Diese Graphik lässt erkennen, dass insbesondere die großen, jungen Lymphoblasten, die unter dem Einfluss des rChCD40L entstanden sind, eine Aktivierung erfahren und stark CD80-positiv werden, wohingegen die kleinen Lymphozyten, die vermutlich bereits zu Versuchsbeginn vorhanden waren und nicht proliferiert haben, kaum CD80 exprimieren.

### 5.2.2.4 Differenzierung von B-Lymphozyten

Aufbauend auf Arbeiten zur Phänotypisierung von CD40L-stimulierten Hühner-B-Zellen, mit Untersuchung der Parameter wie Zellgröße und Expression von Oberflächenmarkern [15], wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Parameter näher beleuchtet, um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob unter dem Einfluss des rChCD40L eine terminale Differenzierung in Plasmazellen induziert wird. Zunächst wurden die differenzierungsbedingten morphologischen Veränderungen verfolgt, die im Zusammenhang mit der durch CD40L hervorgerufenen Stimulation auftreten.

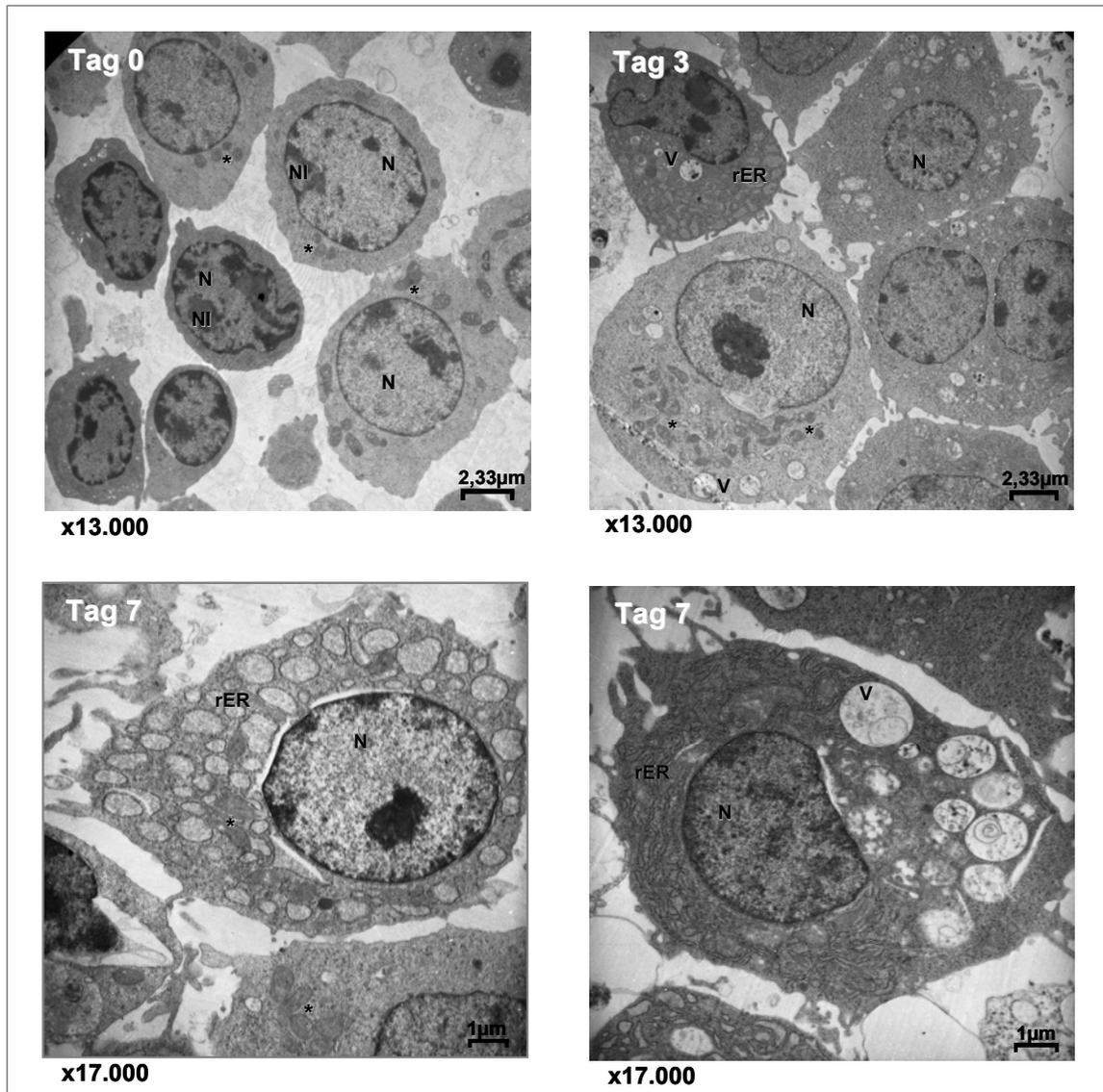
#### 5.2.2.4.1 Differenzierung auf Ebene der Morphologie

Um die morphologischen Veränderungen der stimulierten B-Zellen darzustellen, wurden mittels „*magnetic cell sorting*“ (MACS) aus der Milzzellsuspension isolierte B-Lymphozyten für insgesamt 7 Tage mit rChCD40L stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann Zellen abgenommen und für die elektronenmikroskopische Analyse präpariert.

In Abbildung 5.11 sind die, unter dem Einfluss des rChCD40L auftretenden Veränderungen der morphologischen Feinstruktur der B-Lymphozyten des Huhnes exemplarisch dargestellt. Direkt nach der Präparation ergibt sich ein heterogenes Bild der Population der B-Lymphozyten. So finden sich neben den eher dunklen, kleinen, ruhenden B-Zellen auch hellere, aktive B-Lymphozyten mit deutlich breiterem Zytoplasmasaum. Die aufgrund ihres schmalen Zytoplasmasaums auch als nacktkernige Lymphozyten bezeichneten ruhenden B-Zellen besitzen einen großen, rundlichen und heterochromatischen Kern, oftmals mit Anschnitten mehrerer Nukleoli. Das Chromatin ist in Chromozentren angeordnet und im Zytoplasma sind keinerlei Zellorganellen zu erkennen. In den helleren, aktiven Lymphozyten dagegen zeigt sich bereits eine Marginalisierung des Chromatins im euchromatischen Kern. Der im Vergleich deutlich breitere Zytoplasmasaum enthält eine Vielzahl an Mitochondrien, innerhalb derer deutlich die Cristae zu erkennen sind.

Bereits nach 3-tägiger Kultur finden sich fast ausschließlich Zellen vom aktivierten Zelltyp. Die Zellen besitzen neben dem euchromatischen Zellkern zumeist einen sehr breiten Zytoplasmasaum mit einer großen Anzahl an Mitochondrien. Das helle Grundplasma ist reich an Ribosomen und in einzelnen Zellen sind Anschnitte des granulären endoplasmatischen Retikulums (rER) zu erkennen. Vereinzelt sind auch vakuoläre Strukturen im Zytoplasma zu finden. An den Umrisslinien der rundlichen bis ovalen Lymphozyten differenzieren sich zunehmend Pseudopodien in wechselnder Anzahl.

Die Ultrastruktur der Lymphozytenpräparate vom Tag 7 weist einen zumeist exzentrisch gelegenen euchromatischen oder auch dunkelgefleckten Kern auf, mit Anordnung des Chromatins in Form von marginal gelegenen Chromatinschollen. Der stark verbreiterte Zytoplasmasaum ist ausgefüllt mit ausgedehnten Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums und vakuolären Strukturen. Die Anzahl und Länge der Pseudopodien an den Umrisslinien scheint im Vergleich zu Tag 3 zugenommen zu haben.



*Abbildung 5.11 Morphologische Veränderungen der mit rChCD40L stimulierten B-Lymphozyten*  
Mittels MACS aus der Milzzellsuspension isolierte B-Zellen wurden zunächst für 3 bis 7 Tage mit rChCD40L stimuliert und dann fixiert oder sofort nach Isolation (Tag 0) fixiert. Anschließend wurden die Proben wie unter 4.34 beschrieben elektronenmikroskopisch analysiert. Kerne (N), Nukleoli (NI), Mitochondrien (\*), rauen endoplasmatisches Retikulum (rER) sowie vakuoläre Strukturen (V) sind gekennzeichnet. Perinukleäre Spalten sind präparationsbedingte Artefakte.

Die Veränderungen der Ultrastruktur, die unter Einwirkung des rChCD40L auftreten, zeigen, dass nach Stimulation mit CD40L fast ausschließlich aktivierte B-Zellen vorzufinden sind und damit eine Differenzierung zum Plasmablasten sehr wahrscheinlich ist.

### 5.2.2.4.2 Differenzierung auf Transkriptionsebene

Die CD40-Ligation setzt innerhalb der B-Zelle eine Signalkaskade in Gang, die in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultiert. Diese sind in der Lage in den Zellkern zu translozieren und direkt auf die Transkription bestimmter Gene einzuwirken. Aus dem Maussystem ist bekannt, dass sich verschiedene Entwicklungsstadien der B-Zellen auch durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren voneinander unterscheiden lassen. Während Bcl6 und Pax5 ganz entscheidend am Erhalt der B-Zellidentität beteiligt sind, ist Blimp1 der wichtigste Induktor und Regulator der terminalen Differenzierung zur Plasmazelle. So kommt es über Bcl6 und Pax5 zu einer verstärkten Expression von B-Zellspezifischen Genen, wohingegen Blimp1 diese Gene reprimiert und stattdessen Plasmazell-spezifische Gene hochreguliert.

Name		Expression	Funktion
<b>Pax5</b>	paired box protein 5	B-Zellen (Säuger)	Transkriptions-Aktivator von B-Zellspezifischen Genen und Transkriptions-Repressor von Plasmazellspezifischen Genen
<b>Bcl6</b>	B cell lymphoma 6	B-Zellen (Säuger) v.a. GC-B-Zellen	Transkriptions-Repressor von Plasmazellspezifischen Genen
<b>Blimp1</b>	B-lymphocyte-induced maturation protein 1	Plasmazellen (Säuger)	Transkriptions-Repressor von B-Zellspezifischen Genen
<b>AID</b>	activation-induced cytidine deaminase	B-Zellen v.a. GC-B-Zellen	Somatische Hypermutation, Ig-Klassenwechsel und Ig-Genkonversion
<b>Bu1</b>	chicken B6	B-Zellen (Huhn)	Oberflächenmarker spezifisch für B-Zellen des Huhnes
<b>CD79b</b>	Ig $\beta$	B-Zellen	Teil des CD79a/b Heterodimers: die nichtkovalent assoziierte Signaleinheit des B-Zellrezeptors
<b><math>\mu</math>S</b>	secretory form of IgM heavy chain	Plasmazellen (Säuger)	Sezernierte Form der schweren Kette des IgM

Tabelle 5.2 Übersicht auf Transkriptionsebene untersuchter Gene

Um zu untersuchen, ob die Stimulation mit CD40L auch in B-Zellen des Huhnes zur Veränderung differenzierungsspezifischer Transkriptionsfaktoren führt, wurden zunächst mit der Primer Express 3.0 Software spezifische q-PCR-Primer generiert und die quantitative RT-PCR auf Milz-cDNA des Huhnes etabliert. Die Auswahl der analysierten Gene, sowie die dazu generierten spezifischen Primer sind in den Tabelle 5.2 Tabelle 5.3 aufgeführt.

Die mittels MACS aus der Milzzellsuspension isolierte B-Zellpopulation mußte nach Separation (B) eine Reinheit von mehr als 90% aufweisen, um sichere Aussagen über die Gen-Expression der B-Zellpopulation treffen zu können. Isolierte B-Zellen wurden für

insgesamt 7 Tage *in vitro* mit rChCD40L stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Nach RNA-Qualitätskontrolle und erfolgreichem Umschreiben in cDNA wurde die Expression mit Hilfe der quantitativen RT-PCR bestimmt. Wie der Tabelle 5.2 zu entnehmen ist, wurden neben den drei Transkriptionsfaktoren Bcl6, Pax5 und Blimp1 die B-Zellspezifischen Gene AID, Bu1 und CD79b und das Plasmazell-spezifische Gen  $\mu$ S untersucht.

Primer	Primersequenz
<b>Bcl6 s</b>	5'GAAGACCCCAAGGGAAGAGTTT <sup>3</sup>
<b>Bcl6 as</b>	5'CTGAGACATCTCTGCCTCGATAAG <sup>3</sup>
<b>Pax5 s</b>	5'CCAGCAGCAGTTGGAAGTGTT <sup>3</sup>
<b>Pax5 as</b>	5'CTCTGGTTTGATGGGCTCTGTT <sup>3</sup>
<b>Blimp1s</b>	5'GTGGTATTGCCGAGACTTTGC <sup>3</sup>
<b>Blimp1as</b>	5'GGGTTTGTGTGAGTTTCATCATT <sup>3</sup>
<b>AID s</b>	5'CGTCTGAAACCCAGCAAGAGT <sup>3</sup>
<b>AID as</b>	5'TGTCCATGTCAGCTGGGTTCT <sup>3</sup>
<b>Bu1 s</b>	5'GATCGCCTGCCCTCCAAT <sup>3</sup>
<b>Bu1 as</b>	5'TGGCTTTCCACGTCAGCTATC <sup>3</sup>
<b><math>\mu</math>S s</b>	5'GGAGAACCCCGAAAATGAGT <sup>3</sup>
<b><math>\mu</math>S as</b>	5'GCCAACACCAAGGAGACATT <sup>3</sup>
<b>CD79b s</b>	5'GCGTCCCCATGCTCCTCTTCCTA <sup>3</sup>
<b>CD79b as</b>	5'GCAGCACCCCTCACTCCTCTCCT <sup>3</sup>
<b>18SrRNA s</b>	5'CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA <sup>3</sup>
<b>18SrRNA as</b>	5'GGCGCTCGTCGGCATGTATTA <sup>3</sup>

Tabelle 5.3 Liste erstellter sequenz-spezifischer Primer für die quantitative RT-PCR

Die Generierung der Primer für die in Tabelle 5.2 aufgeführten Gene erfolgte mit Hilfe der Primer Express 3.0 Software. Es sind jeweils die sense (s)- und antisense (as)-Primer unter Angabe der jeweiligen Primersequenz aufgeführt.

Als Housekeeping-Gen wurde für jede Probe die Expression der 18S rRNA bestimmt.

Die Auswertung beinhaltete zunächst die Normalisierung mit Berechnung des  $\Delta$ CT, der für die jeweiligen Gene erhaltenen Expressionswerte (CT) unter Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens 18S rRNA. Nachfolgend wurde, unter Bezugnahme auf den Expressionswert der unstimulierten B-Zellen (0h-Wert), die Berechnung des  $\Delta\Delta$ CT und letztendlich die Berechnung der Expressionslevel ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) der untersuchten Gene vorgenommen.

Abbildung 5.12 A veranschaulicht den Verlauf der Expression der drei untersuchten Transkriptionsfaktoren. Während die Expression des Transkriptions-Repressors Bcl6 nahezu gleich bleibt, kommt es im zeitlichen Verlauf zu einem deutlichen Abfall der Expression von Pax5, dem wichtigsten Regulator der B-Zellidentität. Zeitgleich steigt die Expression des Plasmazell-spezifischen Transkriptions-Repressors Blimp1 um das 14-fache im Vergleich zum 0-Stundenwert an und scheint bei 120 Stunden ein Plateau erreicht zu haben.

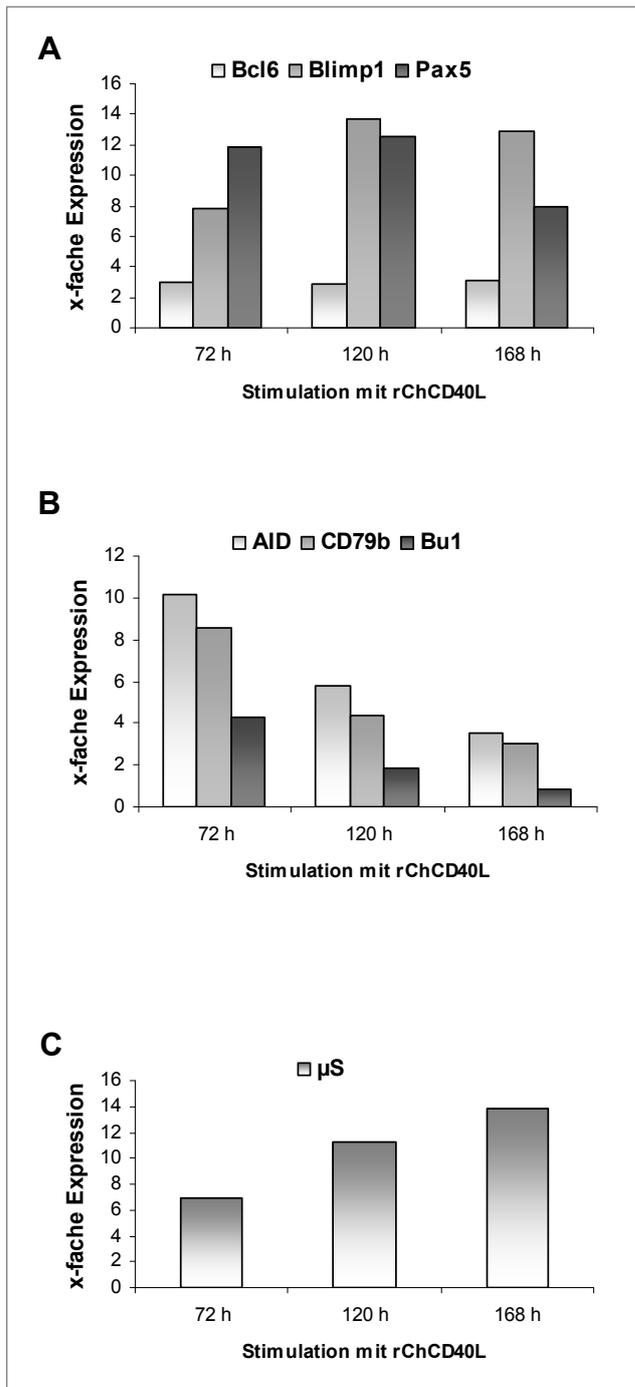


Abbildung 5.12 Genexpressionsanalyse rChCD40L stimulierter B-Zellen

Mittels MACS isolierte B-Zellen der Milz wurden mit 0,5 $\mu$ g/ml rChCD40L stimuliert. Nach 0, 72, 120 und 168 Stunden wurden Zellen für die RNA-Isolation entnommen, in cDNA umgeschrieben und eine q-RT-PCR mit den in Tabelle 5.3 aufgeführten sequenzspezifischen Primern durchgeführt.

Dargestellt sind (A) die Expression der Transkriptionsfaktoren Bcl6, Pax5 und Blimp1 und (B) die Expression der Gene AID, CD79b und Bu1, sowie (C) die Expression des Gens  $\mu$ S zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives aus insgesamt 3 durchgeführten Experimenten.

Die in Abbildung 5.12 B dargestellten B-Zellspezifischen Gene AID, CD79b und Bu1, deren Expression direkt oder indirekt durch die drei Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, zeigen einen deutlichen Abfall mit Dauer der CD40-Stimulation. Insbesondere der Oberflächenmarker Bu1 zeigt einen massiven Abfall von der 4-fachen Expression nach 72 Stunden auf eine 1-fache Expression nach 168 Stunden. Im Fall der Gene CD79b und AID kommt es in den ersten 72 Stunden zu einem Anstieg um den Faktor 10 im Vergleich zum 0-Stundenwert, dann mit Dauer der Kultur jedoch zu einem Abfall auf das 4-fache der 0-Stunden-Expression. Hingegen erfährt die Expression von dem Plasmazell-spezifischen

Gen  $\mu$ S (C), welches erst mit Einsetzen der terminalen Differenzierung hoch exprimiert wird, einen deutlichen Anstieg mit Dauer der Kultur auf die 14-fache Expression nach 168 Stunden gegenüber dem Wert zur Stunde 0.

Aus diesen Daten lässt sich erkennen, dass auch im Huhn unter Einwirkung des rChCD40L auf Transkriptionsebene das terminale Differenzierungsprogramm der B-Zellen gestartet wird.

### 5.3 Interleukin 10

Neben dem CD40L spielen beim Säuger noch weitere Zytokine eine entscheidende Rolle in der B-Zelldifferenzierung. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von IL-10 auf die B-Zellen beim Huhn untersucht. Ein Expressionskonstrukt für ChIL-10 wurde freundlicherweise von Dr. Pete Kaiser („Institute of Animal Health“, Compton, UK) zur Verfügung gestellt.

#### 5.3.1 Eukaryotische Expression des rChIL-10 in HEK 293-Zellen

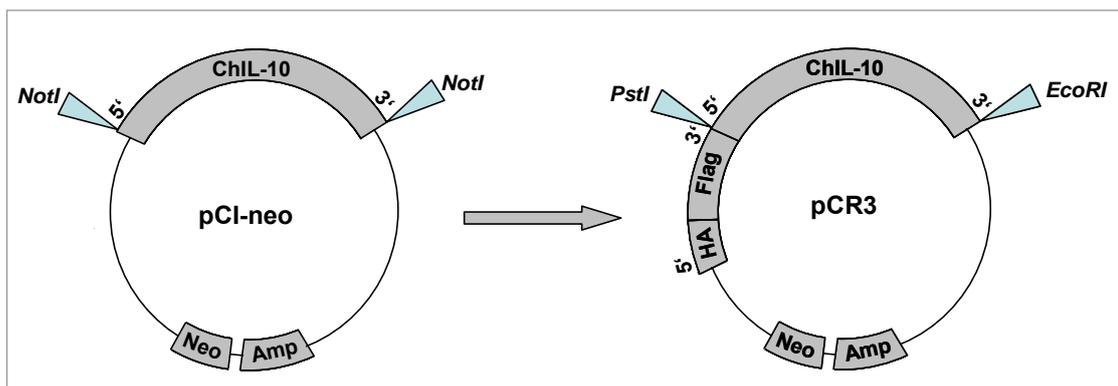


Abbildung 5.13 Schematische Darstellung der Vektoren pCI-neo und pCR3

Mit Hilfe sequenzspezifischer Klonierungs-Primer wurden an die Sequenz des ChIL-10 im Expressionsvektor pCI-neo die Enzymschnittstellen für *PstI* und *EcoRI* angefügt und im Anschluss daran in den mit eben diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pCR3 ligiert. Dieser Vektor besitzt neben einem HA-Signalpeptid ein 8 Aminosäuren langes Flag-tag, welches zusammen mit der ChIL-10-Sequenz exprimiert wird.

Um das rekombinant gewonnene ChIL-10 später leichter nachweisen und aufreinigen zu können, wurde eine Umklonierung des Interleukins in einen Vektor mit Flag-Sequenz aus pCI-neo vorgenommen. Hierzu wurde die Sequenz des ChIL-10 zunächst mittels PCR amplifiziert, wobei mit Hilfe spezifischer Klonierungs-Primer (siehe 4.7.1) die Enzymschnittstellen für die Restriktions-Endonukleasen *PstI* und *EcoRI* an das Insert angefügt wurden. Nach dem Verdau mit eben diesen Restriktions-Endonukleasen wurde das erhaltene Fragment stromabwärts des Hämagglutinin-Signalpeptids und der Flag-Sequenz in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen, modifizierten Expressionsvektor pCR3-

Flag (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Pascal Schneider, Lausanne, Schweiz) kloniert (Abbildung 5.13). Mit dem erhaltenen Konstrukt wurden HEK 293-Zellen stabil transfiziert und der Klon mit der höchsten Produktionsrate unter Selektionsdruck *in vitro* weiter kultiviert.

### 5.3.2 Herstellung und Aufreinigung des rekombinanten ChIL-10

Zur Herstellung von rChIL-10 wurden Zellkultur-Überstände der stabil transfizierten Zelllinie affinitäts-chromatographisch über eine anti-Flag-M2-Säule aufgereinigt. Das erhaltene Eluat wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit hin untersucht.

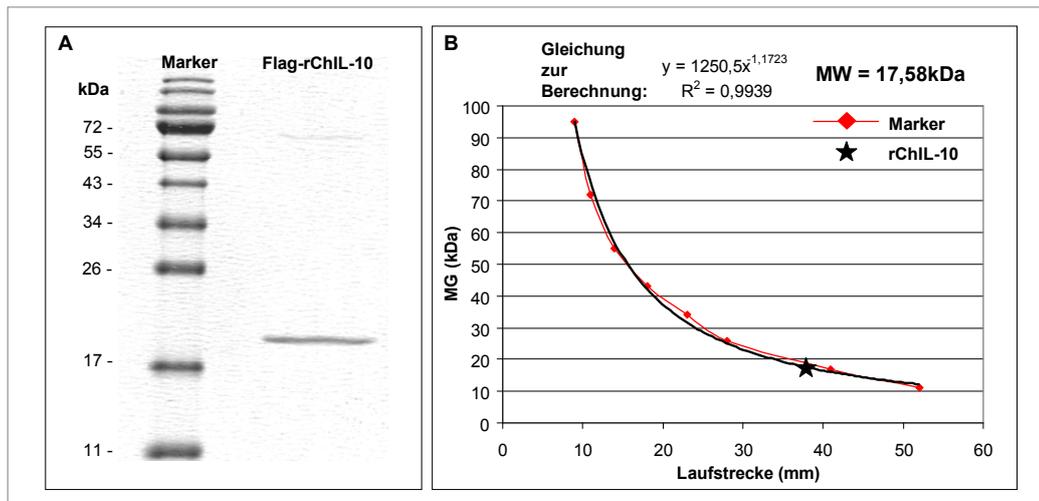


Abbildung 5.14 Nachweis des rChIL-10 im SDS-Gel und Bestimmung des Molekulargewichts

Über eine anti-Flag-M2-Säule wurden die gesammelten Zellkulturüberstände der mit rChIL-10 transfizierten HEK 293-Zellen aufgereinigt und anschließend fraktioniert eluiert.

A) 1:5 Verdünnung der gepoolten Eluate mittels 15%igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt.

B) Sowohl die Laufstrecken der Fragmente definierten Molekulargewichts des mitgeführten Markers, als auch die Laufstrecke des rChIL-10 wurden im SDS-Gel (A) ausgemessen. Die erhaltenen Werte für den Marker wurden dann mit dem Molekulargewicht ins Verhältnis gesetzt und ergaben die Kurve des Markers. Anhand der oben aufgeführten Gleichung konnte dann das genaue Molekulargewicht des Flag-markierten rChIL-10 bestimmt werden.

Abbildung 5.14 A zeigt, dass das Flag-markierte, rekombinante Protein von sehr hoher Reinheit ist. Die distinkte Bande für rChIL-10 im 15%igen SDS-Gel (Abbildung 5.14 A) liegt bei einem Molekulargewicht von etwas mehr als 17kDa und entspricht somit dem anhand der Sequenz errechneten Molekulargewicht. Daneben ist nur eine schwache Bande bei 72kDa zu erkennen, die vermutlich von Albuminresten im gewonnenen Eluat herrührt.

Anhand der Laufstrecken des Markers und des rChIL-10 im SDS-Gel (A) konnte das genaue Molekulargewicht des Flag-markierten rChIL-10 mit Hilfe der Gleichung in (B) bestimmt werden. Das bestimmte Molekulargewicht (17,6kDa) entspricht dem anhand der

Sequenz berechneten (17kDa).

Parallel wurde das rekombinante Protein im Western Blot mit Hilfe eines gegen Flag-M2 gerichteten Antikörpers in den einzelnen Fraktionen des Eluats nachgewiesen. Wie der Abbildung 5.15 zu entnehmen ist, lagen die Banden auch im Western Blot auf Höhe des bestimmten Molekulargewichts von 17,6kDa. Es wurden hierfür 8 der insgesamt 13 Fraktionen einer Elution aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass die Elution nicht scharf begrenzt ist und alle Fraktionen rChIL-10 enthalten, wobei die höchsten Proteinkonzentrationen in den Fraktionen 4 und 5 nachweisbar waren.

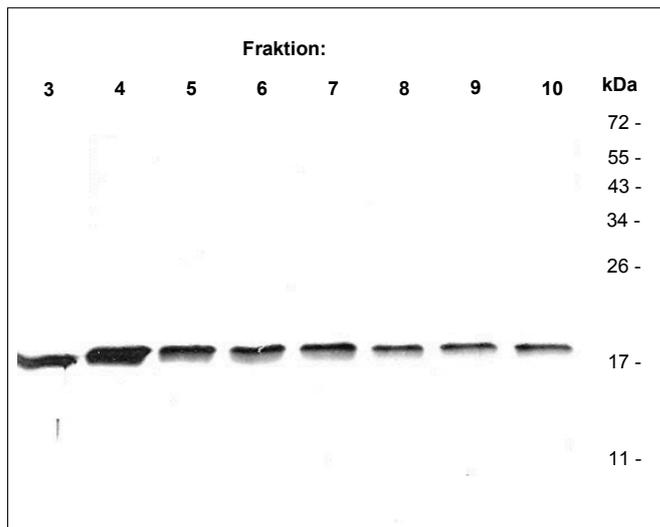


Abbildung 5.15 Nachweis von Flag-markiertem rChIL-10 im Western Blot  
Western Blot von 20 $\mu$ l der Fraktionen 3 bis 10 einer Elution.

Der Nachweis des Flag-markierten rChIL-10 erfolgte mittels anti-Flag-M2-Antikörper in einer Konzentration von 2 $\mu$ g/ml. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidase-konjugierten IgG-Antikörpers (1:20.000).

### 5.3.3 Biologische Aktivität des rChIL-10

Nach Bestimmung der Qualität und Quantität des eukaryotisch gewonnenen und affinitätschromatographisch gereinigten rekombinanten ChIL-10 wurde im Anschluss die biologische Aktivität geprüft. In einem initialen Funktionsassay wurde zunächst der biologische Effekt des ChIL10-haltigen Zellkultur-Überstands getestet.

Als Grundlage des ersten Funktionsassays diente die Tatsache, dass IL-10 die Produktion von IFN $\gamma$  durch Th1-Zellen inhibieren kann. Um dies für das rekombinante Protein zu prüfen, wurden über die Dichtegradienten-Zentrifugation isolierte Milz-Leukozyten mit einem gegen den T-Zellrezeptor gerichteten Antikörper (TCR2) zur IFN $\gamma$ -Produktion stimuliert. Zeitgleich wurden verschiedene Konzentrationen des ChIL-10-haltigen Zellkultur-Überstands zu den Kulturen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und mittels HD11-Assay (siehe 4.29) auf den Gehalt an IFN $\gamma$  getestet.

Die Makrophagen-Zelllinie HD11 besitzt die Fähigkeit auf IFN $\gamma$ -Stimulation hin Stickstoff-Monoxid (NO) zu bilden und dieses ans Medium abzugeben. Die gebildete NO-Menge

steht dabei in direktem Verhältnis zur  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration. Innerhalb des Mediums erfolgt dann eine Umwandlung des NO in Nitrat und über die Nitrat-Reduktase in Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), welches in Verbindung mit dem zugesetzten Griess-Reagenz einen Farbumschlag bewirkt, der photometrisch erfasst werden kann.

Wie aus der Abbildung 5.16 zu entnehmen ist, enthielten Überstände von Milzzellen, die sowohl mit TCR2 als auch mit ChIL-10 stimuliert wurden, signifikant weniger  $\text{IFN}\gamma$ . Somit besitzt auch das rChIL-10-Protein, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration, die Fähigkeit die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der T-Zellen zu inhibieren und ist somit biologisch aktiv.

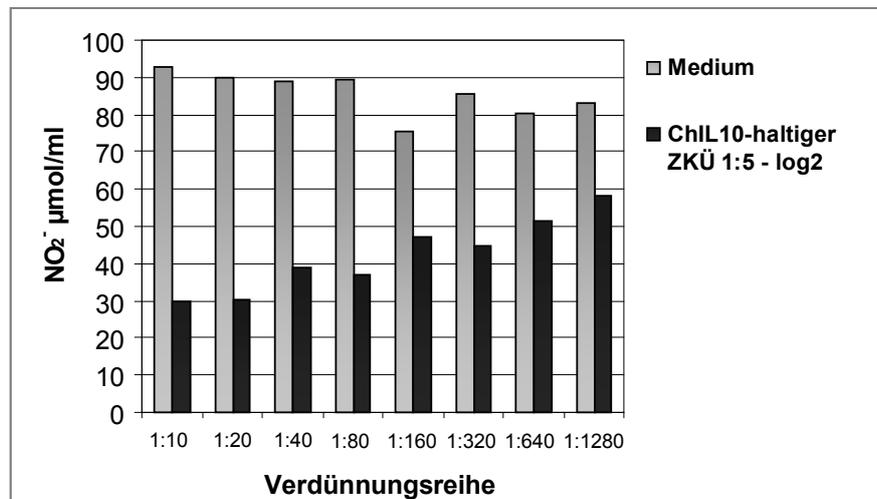


Abbildung 5.16 Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von T-Zellen durch rChIL-10

Zu einer mit TCR2 ( $10\mu\text{g/ml}$ ) stimulierten Milzellsuspension wurde der rChIL-10-haltige HEK 293-Zellkultur-Überstand in der angegebenen Endverdünnung gegeben und für 24h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellkultur-Überstände auf HD11-Zellen gegeben und diese für weitere 24h inkubiert. Die erhaltenen Überstände wurden mit Griess-Reagenz versetzt und anschließend die optische Dichte des entstandenen Farbkomplexes im Photometer bei 520nm bestimmt.

Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt 3 Experimenten.

### 5.3.4 Einfluss des rChIL-10 auf B-Lymphozyten

Die beim Säuger beschriebenen Effekte des IL-10 auf B-Zellen umfassen die gesamte B-Zellentwicklung, von der Proliferation, über die Aktivierung bis hin zur Differenzierung. Um die biologische Aktivität des affinitäts-chromatographisch aufgereinigten rChIL-10 direkt mit den Effekten des rChCD40L vergleichen zu können, wurde als Funktionsassay der Proliferations-Assay mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin gewählt.

Die Präparation der primären Milz-Leukozyten erfolgte wie bereits für den rChCD40L unter 5.2.2.1 beschrieben. Im Anschluss an die 48-stündige Kultur mit verschiedenen Konzentrationen des rChIL-10 allein oder in Kombination mit rChCD40L, wurde für weitere 16 Stunden [ $^3\text{H}$ ]-Tymidin zugegeben, bevor die Proliferationsrate mittels

Szintillations-Messgerät bestimmt wurde. Als Kontrolle dienten nur mit Medium kultivierte Milz-Leukozyten.

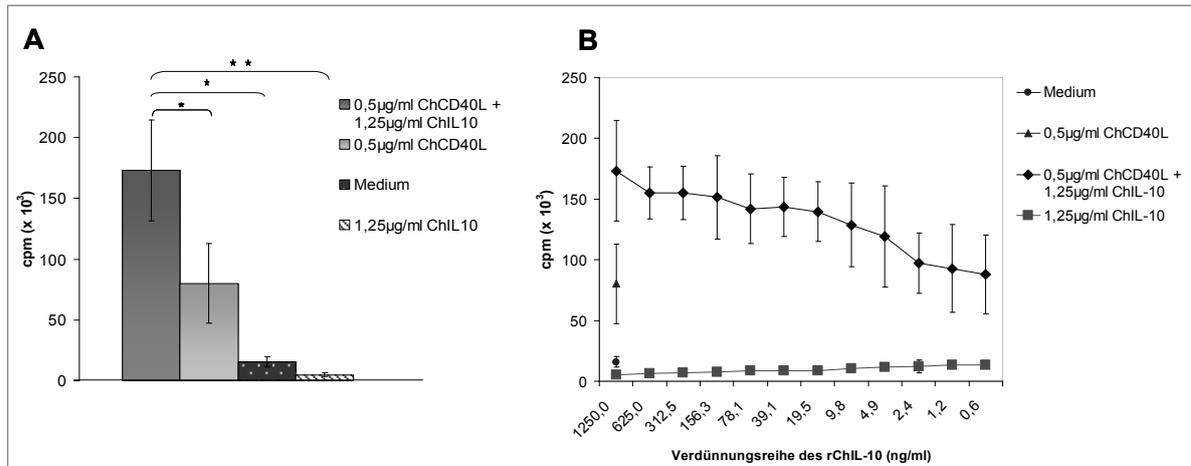


Abbildung 5.17 rChIL-10-induzierte Proliferationssteigerung in Milz-Leukozyten

Milz-Leukozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an rChIL-10 allein oder in Kombination mit rChCD40L für 48h in Kultur genommen und anschließend für 16h mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin versetzt und mittels eines Szintillations-Messgerätes ausgewertet. Als Kontrolle dienten nur in Medium kultivierte Milz-Leukozyten (Medium).

In Bild A ist die jeweils für die höchste Zytokin-Konzentration erhaltene Proliferationsrate direkt ins Verhältnis zueinander gesetzt. Bild B zeigt die Dosisabhängigkeit der Proliferation der durch rChCD40L und rChIL-10-induzierten Proliferation der Milz-Leukozyten.

Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Tieren. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; T-Test)

Dass die Stimulation von Milz-Leukozyten mit rChCD40L eine massive Proliferationssteigerung bewirkt, konnte bereits in Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6 gezeigt werden. Vergleicht man jedoch die Proliferationsraten mit denen, die durch Kombination des rChCD40L mit rChIL-10 erreicht werden, so ist deutlich ein synergistischer Effekt dieser beiden Zytokine zu erkennen, wie Abbildung 5.17 A zu entnehmen ist. Während rChIL-10 allein nur eine geringe Proliferation von maximal 1.500cpm bewirkt, die noch unter der Proliferationsrate der Kontrolle mit circa 10.000cpm liegt, bewirkt die Kombination der Zytokine rChCD40L (0,5µg/ml) und rChIL-10 (1,25µg/ml) eine hochsignifikante, massive Proliferationssteigerung um den Faktor 15 verglichen mit der Proliferation unstimulierter Milz-Leukozyten. Gegenüber der Proliferationsrate durch rChCD40L allein bewirkt die Kombination eine Verdoppelung. Die Dosisabhängigkeit dieses Effektes lässt sich in Abbildung 5.17 B erkennen. Während rChIL-10 allein einen eher inhibitorischen Effekt auf die Lymphozyten ausübt, der sich austitrieren lässt, hat die Kombination der beiden Zytokine einen positiven, synergistischen Effekt auf die Proliferation der Zellen. Auch dieser Effekt wird mit zunehmender Verdünnung des rChIL-10 bei gleichbleibender Konzentration des rChCD40L über die

Titrationssreihe hinweg immer schwächer, bis letztendlich die allein durch rChCD40L hervorgerufene Proliferationsrate von durchschnittlich 80.000cpm erreicht wird.

## 5.4 Interleukin 6

Da für den Säuger ein positiver Effekt auf die terminale Differenzierung CD40-stimulierter B-Lymphozyten, sowohl für IL-6 allein als auch für die Kombination mit IL-10, beschrieben wurde, wurde im Folgenden die Wirkung dieses Zytokins auf die B-Zellen des Huhnes untersucht.

### 5.4.1 Eukaryotische Expression des rChIL-6 in HEK 293-T-Zellen

Nach einem Verdau des prokaryotischen pQE9-Vektorkonstrukts mit den Restriktions-Endonukleasen *Bam*HI und *Apa*I wurde das erhaltene Fragment stromabwärts des Hämagglutinin-Signalpeptids und der Flag-Sequenz in einen modifizierten pCR3-Vektor kloniert (Abbildung 5.18). Mit dem erhaltenen Konstrukt wurden HEK 293-T-Zellen transient transfiziert und nach 48 Stunden die Überstände abgenommen.

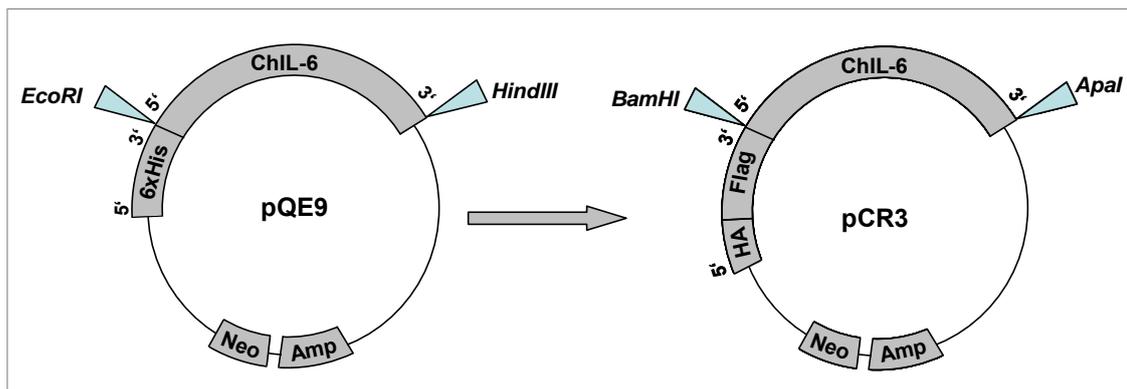


Abbildung 5.18 Umklonierung der ChIL-6-Sequenz in einen Flag-markierten Vektor

Die Sequenz des ChIL-6 wurde aus dem prokaryotischen Expressionsvektor pQE9 in den Flag-markierten, eukaryotischen Expressionsvektor pCR3 umkloniert. Hierzu wurde mit Hilfe der Restriktions-Endonukleasen *Bam*HI und *Apa*I die ChIL-6-Sequenz aus dem pQE9-Vektor herausgeschnitten und im Anschluss in den unter Verwendung derselben Restriktions-Endonukleasen geschnittenen Vektor pCR3 ligiert. Dieser Vektor besitzt neben einem HA-Signalpeptid ein 8 Aminosäuren langes, N-terminales Flag-tag, welches zusammen mit der ChIL-6-Sequenz exprimiert wird.

### 5.4.2 Herstellung und Aufreinigung des rekombinanten ChIL-6

Die rChIL-6-haltigen Zellkultur-Überstände der transienten Transfektion wurden nachfolgend wie unter 4.21 beschrieben affinitäts-chromatographisch über eine anti-Flag-M2-Säule aufgereinigt und das erhaltene Eluat mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit hin untersucht. Der Reinheitsgrad des affinitäts-chromatographisch gereinigten Zellkultur-Überstands, in der Abbildung 5.19 A dargestellt, ist analog zu dem des rChIL-10 sehr hoch. Auch hier war neben einer distinkten Bande auf Höhe des errechneten Molekulargewichts von 26kDa nur eine sehr schwache Bande bei 72kDa zu erkennen, die

vermutlich von Albuminresten herrührt, die durch die Elution nicht vollständig beseitigt werden konnten.

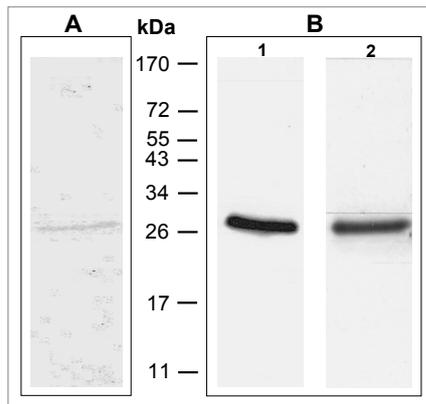


Abbildung 5.19 Nachweis des affinitätschromatographisch gereinigten rChIL-6

Unter A ist das Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese im 15%igen SDS-Gel nach Auftrag von 6,2µg Eluat und anschließender Coomassie-Färbung dargestellt.

Bild B zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse. Bild B1 zeigt den Nachweis von 6,2µg Eluat mit anti-Flag-M2-Antikörper (2µg/ml) und goat-anti-mouse IgG-POD (1:20.000), wohingegen Bild B2 den Nachweis von 1,55µg Eluat mit dem gegen ChIL-6 gerichteten Antikörper (10µg/ml) und goat-anti-rabbit IgG-POD (1:20.000) wiedergibt.

Parallel dazu wurde das rekombinante Protein des gewonnenen Eluats in zwei Ansätzen im Western Blot analysiert. Einmal unter Verwendung des gegen Flag-M2 gerichteten Antikörpers, und im zweiten Ansatz unter Verwendung eines spezifischen gegen ChIL-6 gerichteten Antiserums (Abbildung 5.19 B). Beide Antikörper detektierten eine eindeutige Bande in Höhe von 26kDa.

#### 5.4.3 Biologische Aktivität des rChIL-6

Nach der Gewinnung und Aufreinigung wurde die biologische Aktivität des erhaltenen rChIL-6 bestimmt. In einem initialen Funktionsassay wurde zunächst die Aktivität eines prokaryotisch E.coli-exprimierten rChIL-6 mit dem eukaryotisch exprimierten rChIL-6 des HEK 293-T-Zellkultur-Überstands und dem des affinitäts-chromatographisch aufgereinigten rChIL-6 im 7TD1-Assay verglichen. Die Zellen der murinen Hybridom-Zelllinie 7TD1 zeigen streng IL-6-abhängiges Wachstum und sterben ohne Zusatz von IL-6 zum Zellkultur-Medium. Die Zahl der lebenden Zellen kann nach Zugabe von XTT kolorimetrisch quantifiziert werden.

Ein proliferationssteigernder Effekt konnte für alle drei rekombinanten ChIL-6-Proteine im 7TD1-Assay nachgewiesen werden, wie Abbildung 5.20 A zu entnehmen ist. Die Proteine induzierten absolut vergleichbare Proliferationsraten und erst eine 1:1.000 bzw. 1:10.000-fache Verdünnung der eingesetzten Ausgangskonzentration zeigte einen Einbruch der Wachstumsrate. Neben dem Nachweis der Funktionsfähigkeit wird auch die Dosisabhängigkeit dieses Effektes in (A) ersichtlich. Der Nachweis der Spezifität gelang mit einem spezifischen, gegen ChIL-6 gerichteten Antikörper mit dessen Hilfe der wachstumsfördernde Effekt inhibiert werden konnte (siehe Abbildung 5.20 B). Bereits ab der zweiten Verdünnungsstufe des rChIL-6 ist der in konstanter Konzentration von

20µg/ml zugesetzte Antikörper in der Lage die Wirkung von rChIL-6 zu blockieren. Die beobachtete Proliferation ist somit tatsächlich auf das rChIL-6 zurückzuführen und wird nicht durch etwas anderes bedingt.

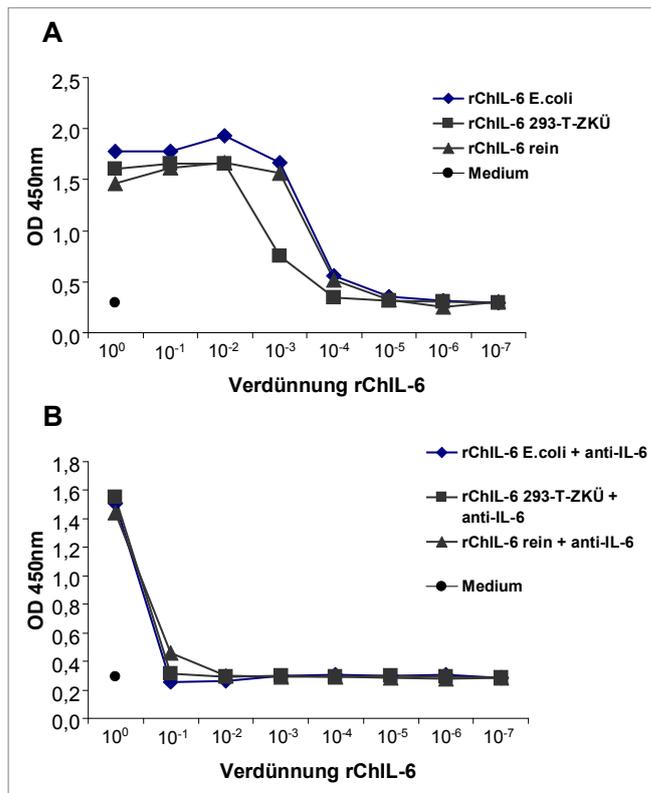


Abbildung 5.20 Nachweis der biologischen Aktivität von rChIL-6 im 7TD1-Assay

7TD1-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an rekombinanten ChIL-6-Proteinen versetzt und für 96h inkubiert.

A) Als Ausgangskonzentrationen für die log<sub>10</sub>-Titrationen wurden 50ng/ml E.coli-exprimiertes, aufgereinigtes rChIL-6, 1:20 verdünnter rChIL-6-haltiger 293-T-Zellkultur-Überstand und 2µg/ml eukaryotisch exprimiertes, aufgereinigtes rChIL-6 eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zahl lebender Zellen wie unter 4.30 beschrieben mit XTT bestimmt.

B) Zusätzlich zu rChIL-6 wurde den Kulturen ein neutralisierender Antikörper gegen ChIL-6 in einer Konzentration von 20µg/ml zugesetzt. Als Kontrolle wurden 7TD1-Zellen in IL-6-freiem Medium kultiviert.

Dargestellt ist ein repräsentatives von 2 Experimenten.

#### 5.4.4 Einfluss des rChIL-6 auf B-Lymphozyten

Um die Wirkung von rChIL-6 auf B-Zellen des Huhnes zu prüfen, wurde zunächst auch für dieses Zytokin ein Proliferations-Assay mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gewählt. Hierzu wurden primäre Milz-Leukozyten isoliert und für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des rChIL-6 allein oder in Kombination mit rChCD40L und rChIL-10 kultiviert, für weitere 16 Stunden mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin versehen, bevor anschließend die Proliferationsrate mittels Szintillations-Messgerät bestimmt wurde. Als Kontrolle dienten Milz-Leukozyten, die nur in Medium kultiviert wurden.

Wie Abbildung 5.21 A zeigt, bewirkt das rChIL-6 aus keiner der Präparationen allein eingesetzt eine Proliferations-Steigerung der B-Lymphozyten. Alle drei rChIL-6-Proteine bewirken vielmehr einen Abfall der Proliferationsrate auf 4.000 bis 6.000cpm verglichen mit rund 10.000cpm der in Medium kultivierten Milz-Leukozyten. Während sich die inhibitorische Wirkung im Fall des rChIL-6 aus E.coli und des 293-T-Zellkultur-Überstandes über 8 Verdünnungsstufen austitrieren lässt, bewirkt das aufgereinigte rChIL-6 die stärkste Inhibition mit 2.000cpm über 8 Verdünnungsstufen hinweg. Aus den Daten

wird ersichtlich, dass alle drei Präparationen denselben Effekt hervorrufen und dieser nicht auf eine Verunreinigung des rekombinanten Proteins zurückzuführen ist.

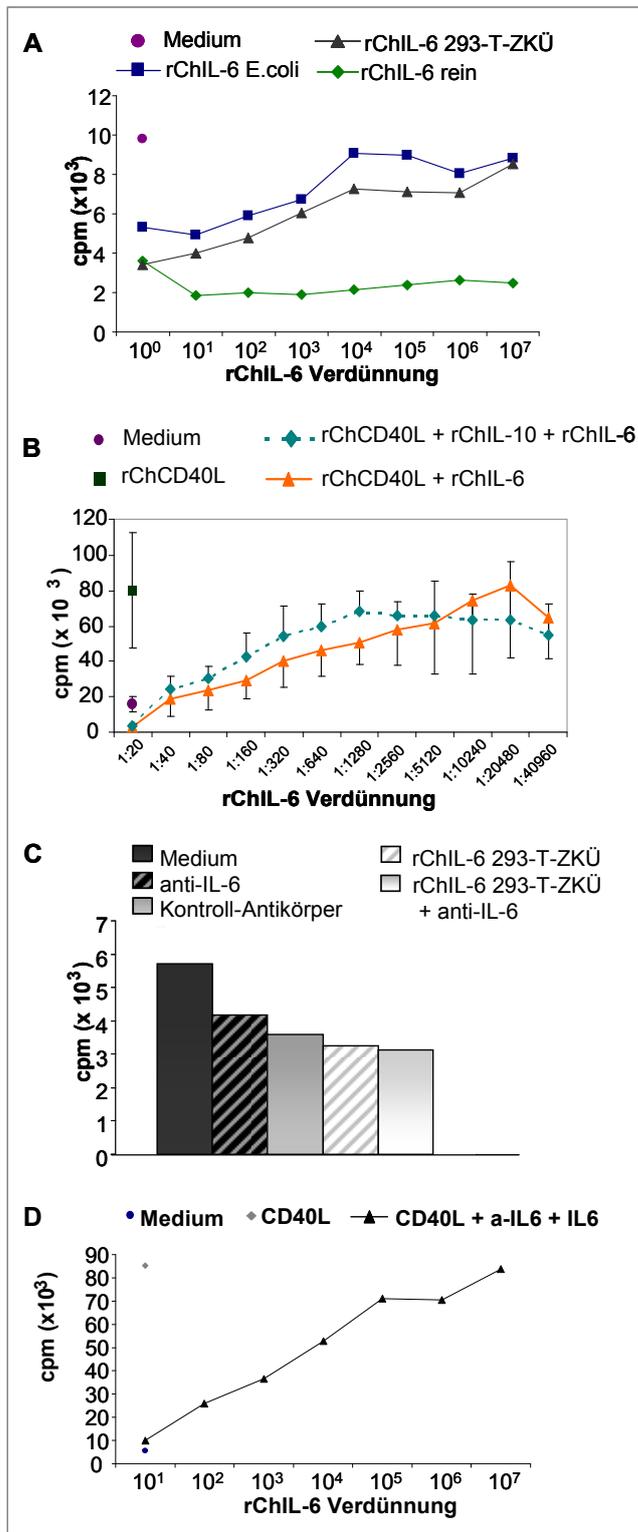


Abbildung 5.21 Effekt des rChIL-6 auf die Proliferationshöhe

Milz-Leukozyten wurden präpariert und nach Zugabe des rekombinanten Proteins für 48h inkubiert. Nach Zugabe des [<sup>3</sup>H]-Thymidins folgten weitere 16h Inkubation und die Bestimmung der Proliferationsrate mittels Szintillations-Messgerät.

Die Ausgangskonzentrationen betragen für das E.coli-exprimierte Protein 50ng/ml und für das eukaryotisch exprimierte und aufgereinigte Protein 2µg/ml, für den Zellkultur-Überstand wurde eine 1:20-Verdünnung eingesetzt.

In Bild A sind die Proliferationsraten der 3 verschiedenen log<sub>10</sub>-titrierten rChIL-6-Proteine im direkten Vergleich dargestellt.

Bild B zeigt den Effekt des log<sub>10</sub>-titrierten 293-Zellkultur-Überstands auf die Proliferation in Kombination mit rChCD40L (0,5µg/ml) sowie in einer Kombination mit rChCD40L und rChIL-10 (1,25µg/ml). Als Kontrolle dienten unstimulierte Milz-Leukozyten.

Bild C gibt den Effekt des anti-ChIL-6-Antikörpers sowie eines Kontroll-Antikörpers auf die Proliferation von Milz-Leukozyten wider. Neben den im Medium kultivierten Milz-Leukozyten (Medium) sind auch Proliferationsraten mit rChIL-6 (1:20 verdünnter 293-T-Zellkultur-Überstand) allein oder in Kombination mit anti-ChIL-6 (20µg/ml) behandelter Zellen dargestellt.

Bild D zeigt den inhibitorischen Effekt des log<sub>10</sub>-titrierten 293-Zellkultur-Überstands auf ChCD40L-stimulierte Leukozyten im Vergleich zu allein ChCD40L-stimulierten bzw. in Medium kultivierten Leukozyten.

A, C und D stellen ein repräsentatives Experiment für insgesamt 3 Experimente dar. B zeigt jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Tieren.

Dass es sich hierbei nicht nur um eine ausbleibende Wachstumsförderung, sondern um eine aktive Inhibition der Proliferation handelt, ist in Abbildung 5.21 B dargestellt. Unter Einwirkung des rChCD40L konnte, wie in den Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6 bereits

gezeigt, eine massive Proliferation der B-Zellen induziert werden, die in Kombination mit rChIL-10 noch weiter gesteigert werden konnte. Eine Kombination von rChCD40L in konstanter Konzentration von 0,5µg/ml und verschiedenen Konzentrationen von rChIL-6 zeigte im Vergleich zu rChCD40L allein eine stark inhibitorische Wirkung, mit einer Reduktion der Proliferationsraten um den Faktor 30, die sich jedoch austitrieren lässt. Gegenüber den nur in Medium kultivierten Milz-Leukozyten sind die Proliferationswerte bei Zugabe von rChIL-6 um den Faktor 5,5 reduziert. Selbst durch gleichzeitige Zugabe von rChIL-10 und rChCD40L konnte keine Aufhebung des inhibitorischen Effekts von rChIL-6 bewirkt werden.

Zum Nachweis der Spezifität des beobachteten inhibitorischen Effekts von rChIL-6 wurde nun in weiterführenden Experimenten versucht, mit Hilfe des polyklonalen rabbit-anti-chicken IL-6-Antikörpers diesen Effekt aufzuheben.

Die Zugabe des polyklonalen, neutralisierenden Antikörpers zu den rChIL-6-stimulierten Milz-Leukozyten konnte die massive Inhibition der durch rChCD40L induzierten Proliferation nicht aufheben, wie aus der Abbildung 5.21 C abzulesen ist. Interessanterweise wurde auch durch alleinige Zugabe des anti-IL-6-Antikörpers eine Inhibition um 1.500cpm induziert. Um abzuklären, ob dieser Effekt spezifisch für den ChIL-6-Antikörper ist, oder daher rührt, dass der Antikörper in einer anderen Spezies generiert wurde, kam ein weiterer durch Immunisierung eines Kaninchens generierter Kontroll-Antikörper zum Einsatz. Wie der Abbildung 5.21 C zu entnehmen ist, entfaltet auch dieser Antikörper eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation der B-Lymphozyten. Während in Medium kultivierte Milz-Leukozyten eine durchschnittliche Proliferation von 5.800cpm aufweisen, kommt es sowohl unter Einwirken des rChIL-6 allein, als auch des polyklonalen anti-IL-6-Antikörpers und des Kontroll-Antikörpers zu einer Reduktion um 1.500 bis 2.500cpm. Somit konnte gezeigt werden, dass in dieser Spezies generierte Antikörper selbst einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Milz-Leukozyten des Huhnes entfalten und damit nicht geeignet sind die inhibitorische Wirkung des ChIL-6 zu neutralisieren.

### **5.5 Nachweis der terminalen Differenzierung von B-Zellen**

Um den Einfluss von CD40L, IL-10 und IL-6 auf die terminale Differenzierung von B-Zellen zu untersuchen, wurde mangels Plasmazell-spezifischer Marker beim Huhn die Produktion und Sekretion der Antikörper IgM, IgA und IgG (beim Huhn auch als IgY bezeichnet) als indirekter Nachweis herangezogen.

Die Erfassung der sezernierten Antikörpermenge in Zellkultur-Überständen von 6 Tage stimulierten Milz-Leukozyten erfolgte für alle drei Immunglobulin-Klassen mit Hilfe eines quantitativen Sandwich-ELISA.

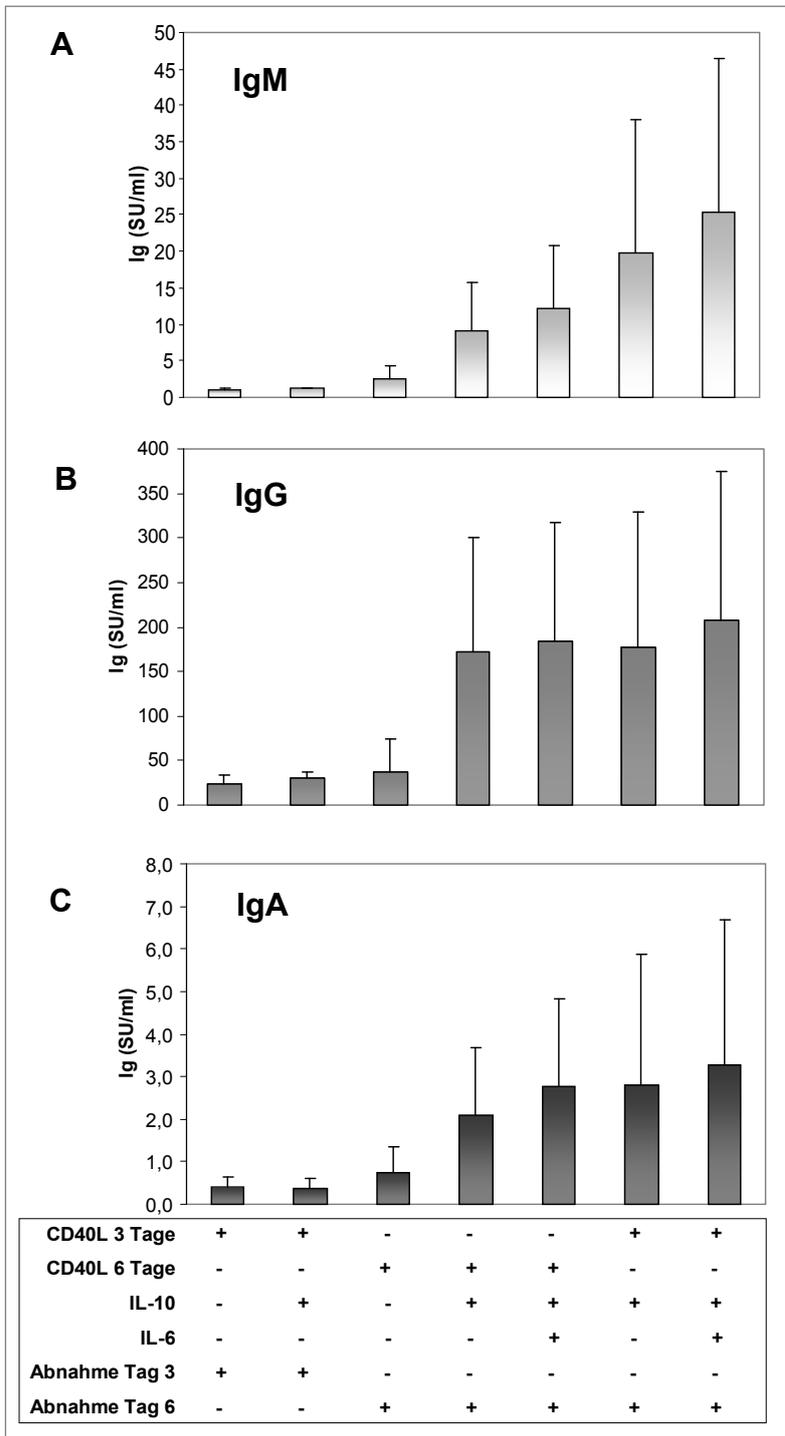


Abbildung 5.22 Quantitative Erfassung der sezernierten Antikörper-Menge im ELISA

Milz-Leukozyten wurden präpariert und in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  c/ml in 24-Lochplatten mit den drei Zytokinen ChCD40L (0,5µg/ml), ChIL-10 (0,1µg/ml), ChIL-6 (0,1µg/ml) für insgesamt 6 Tage stimuliert.

An Tag 3 wurden Zellkultur-Überstände abgenommen und die Zellen 1:2 geteilt. Ein Teil der Zellen erhielt neues Medium derselben Zytokin-Zusammensetzung, ein anderer Teil erhielt dieselbe Kombination ohne ChCD40L für weitere 3 Tage. Nach Gewinnung aller Zellkultur-Überstände wurde die Menge der sezernierten Immunglobuline IgM, IgG und IgA mittels quantitativem ELISA erfasst.

Dargestellt sind die detektierten Immunglobulin-Mengen in Standardeinheiten (SU) pro ml.

Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 verschiedenen Tieren.

Wie der Abbildung 5.22 zu entnehmen ist, kommt es innerhalb der ersten drei Tage der Kultur unter dem Einfluss des rChCD40L nur zu einer geringen Antikörper-Sekretion, die auch durch Zugabe von rChIL-10 keine nennenswerte Steigerung erfährt. Auch die alleinige Stimulation mit rChCD40L über 6 Tage erbringt nur einen geringen Anstieg, der jedoch für die Isotypen IgM von 1 auf 2 SU/ml und für IgA von 0,4 auf 0,8 SU/ml eine

Verdoppelung, verglichen mit der Antikörper-Menge am Tag 3 der Kultur, bedeutet. Die sezernierte Menge IgG bleibt hingegen nahezu konstant bei circa 30 SU/ml. Für alle drei Isotypen ergibt sich eine deutliche Steigerung nach 6-tägiger Kultur mit rChCD40L und rChIL-10 um den Faktor 5 für IgA (C), Faktor 7,5 für IgG (B) und Faktor 9 für IgM (A). Nur eine geringe Steigerung der Sekretion aller drei Isotypen bewirkt die Zugabe von rChIL-6 zu den über 6 Tage mit rChCD40L/rChIL-10-stimulierten Lymphozyten. Während die IgM-Sekretion durch die Wegnahme des rChCD40L nach 3-tägiger Kultur, bei fortgesetzter rChIL-10-Zugabe, verglichen mit der 6-tägigen alleinigen rChCD40L-Stimulation, um den Faktor 10 zunimmt, kommt es zu einem Anstieg um den Faktor 5 für die IgG- (B) und Faktor 3,5 für die IgA-Sekretion (C). Vergleicht man hingegen die über 6 Tage rChCD40L/rChIL-10 stimulierten Lymphozyten mit denen der über 3 Tage rChCD40L, aber 6 Tage rChIL-10 stimulierten Lymphozyten, so lässt sich nur noch für die IgM-Sekretion ein Anstieg um den Faktor 2 erkennen, wohingegen die IgG- und IgA-Sekretion konstant bleibt. Auch in diesem Fall bewirkt die zusätzliche Stimulation mit rChIL-6 keine bis geringe Steigerung der Sekretion aller Isotypen.

Zur Quantifizierung des Klassenwechsels nach Stimulation mit den Zytokinen ChCD40L, ChIL-10 und ChIL-6 wurde die Anzahl der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen mit Hilfe der ELISPOT-Technik erfasst (Abbildung 5.23 und Abbildung 5.24).

Die für 6 Tage unter dem Einfluss der Zytokine rChCD40L, rChIL-10 und rChIL-6 vorkultivierten Milz-Leukozyten wurden auf beschichteten ELISPOT-Platten 48 Stunden inkubiert, nachfolgend die sezernierten Immunglobuline mittels Isotyp-spezifischer biotinylierter Antikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:4.500) detektiert und durch die Entwicklung mit dem Substrat „*TrueBlue*“ als Antikörper-Spots sichtbar gemacht. Neben einem Anstieg der Spotzahlen aller Isotypen unter der Zytokin-Stimulation kam es auch zu einer auffallenden Größenzunahme der einzelnen IgG- und IgA-positiven Spots, wie Abbildung 5.23 B und C zu entnehmen ist.

Vergleicht man die Anzahl gezählter Spots, so ist in Abbildung 5.24 für jeden untersuchten Isotyp ein Anstieg Antikörper-sezernierender Zellen zwischen dem unstimulierten Kontrolltier und den drei gemittelten, allein mit ChCD40L-stimulierten Tieren zu erkennen. Sowohl aus Abbildung 5.23 wie auch aus Abbildung 5.24 A geht hervor, dass die mit 50 Spots nach alleiniger ChCD40L-Stimulation ohnehin schon hohe Anzahl IgM-positiver Spots unter Einwirkung der Zytokine rChIL-10 und rChIL-6 noch weiter, um den Faktor 3 auf über 150 Spots ansteigt. Eine weitere Steigerung auf über 200 Spots wird durch Zugabe von ChIL-6 erreicht. Diese Beobachtung ist auch für IgG und IgA zu

machen, wenngleich die Spotzahl insgesamt kleiner ist.

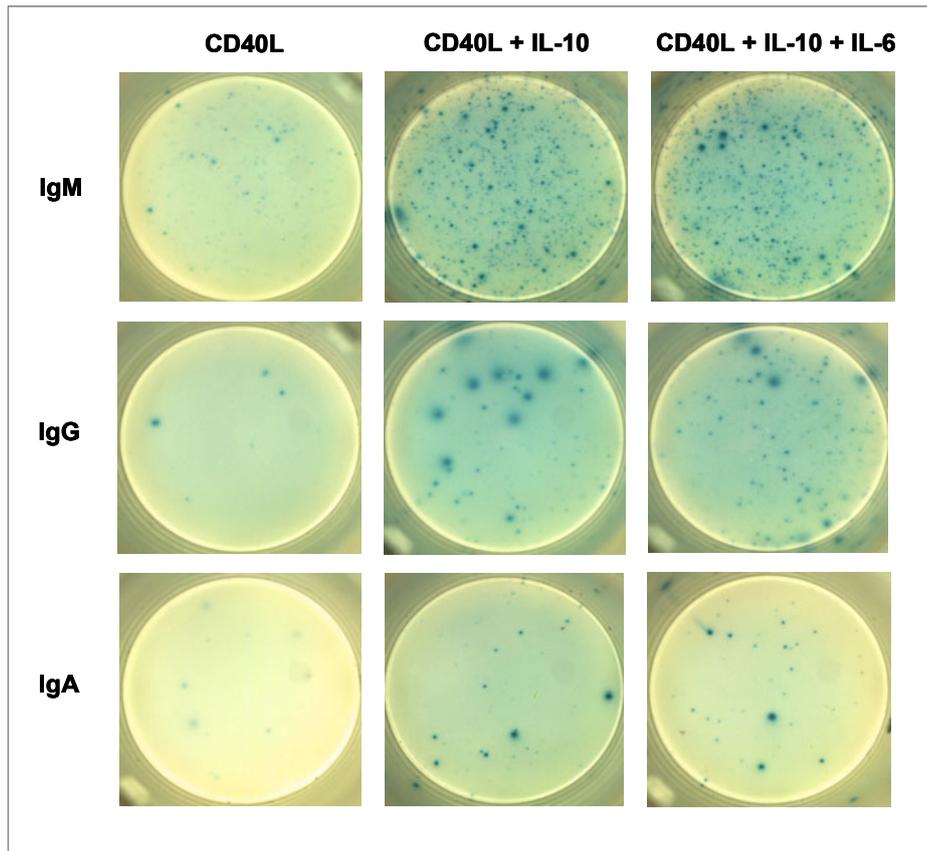


Abbildung 5.23 Bildtafel zur Veranschaulichung der ELISPOT-Technik zur Erfassung der Anzahl Antikörper-sezernierender Plasmazellen

Milz-Leukozyten wurden für 6 Tage mit rChCD40L allein oder in Kombination mit rChIL-10 und rChIL-6 stimuliert. Am Tag 6 wurden die lebenden B-Zellen über Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und auf einer Antikörper-beschichteten (anti-Leichte Kette 5µg/ml) ELISPOT-Platte mit  $1 \times 10^5$  c/ml ausgesät und für weitere 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen entfernt, die Anzahl der erhaltenen Spots mit Isotyp-spezifischen, biotinylierten Antikörpern (300ng/ml) und Streptavidin-POD (1:4.500) detektiert und nach Entwicklung mit „True-Blue“-Substrat (50µl/Delle) sichtbar gemacht.

Exemplarisch sind einzelne Dellen einer ELISPOT-Platte zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Spotzahlen und Spotformen aufgrund der verschiedenen Stimulationen dargestellt.

Die Bilder B und C der Abbildung 5.24 geben das Ausmaß des Immunglobulin-Klassenwechsels wider, der im Rahmen einer CD40L-Stimulation induziert wird. Während das unstimulierte Kontrolltier nahezu keine IgG-sezernierenden Zellen besitzt, kommt es hier insbesondere durch die Kombination von ChCD40L mit ChIL-10 zu einem Anstieg von 12 Spots nach alleiniger ChCD40L-Stimulation auf über 40 Spots mit zusätzlicher ChIL-10-Stimulation was einer Steigerung um den Faktor 3 entspricht, wohingegen unter Zugabe von ChIL-6 keine weitere Veränderung zu verzeichnen ist. Ähnlich verhält es sich für IgA. Auch hier liessen sich für das unstimulierte Tier nur wenige IgA-positive Spots nachweisen, wohingegen es unter dem Einfluss des ChCD40L zu einem geringen Anstieg um den Faktor 4 auf 12 Spots kam. Bei zusätzlicher ChIL-10-Stimulation konnte die

Anzahl der Spots um den Faktor 5 auf durchschnittlich 15 Spots, bei zusätzlicher ChIL-6-Stimulation um den Faktor 7 auf durchschnittlich 20 Spots gesteigert werden. Wie jedoch anhand der Standardabweichungen zu erkennen ist, gab es große Schwankungen zwischen den einzelnen, gleichartig stimulierten Tieren, so dass sich für die verschiedenen Stimulationen keine großen Unterschiede herausarbeiten ließen.

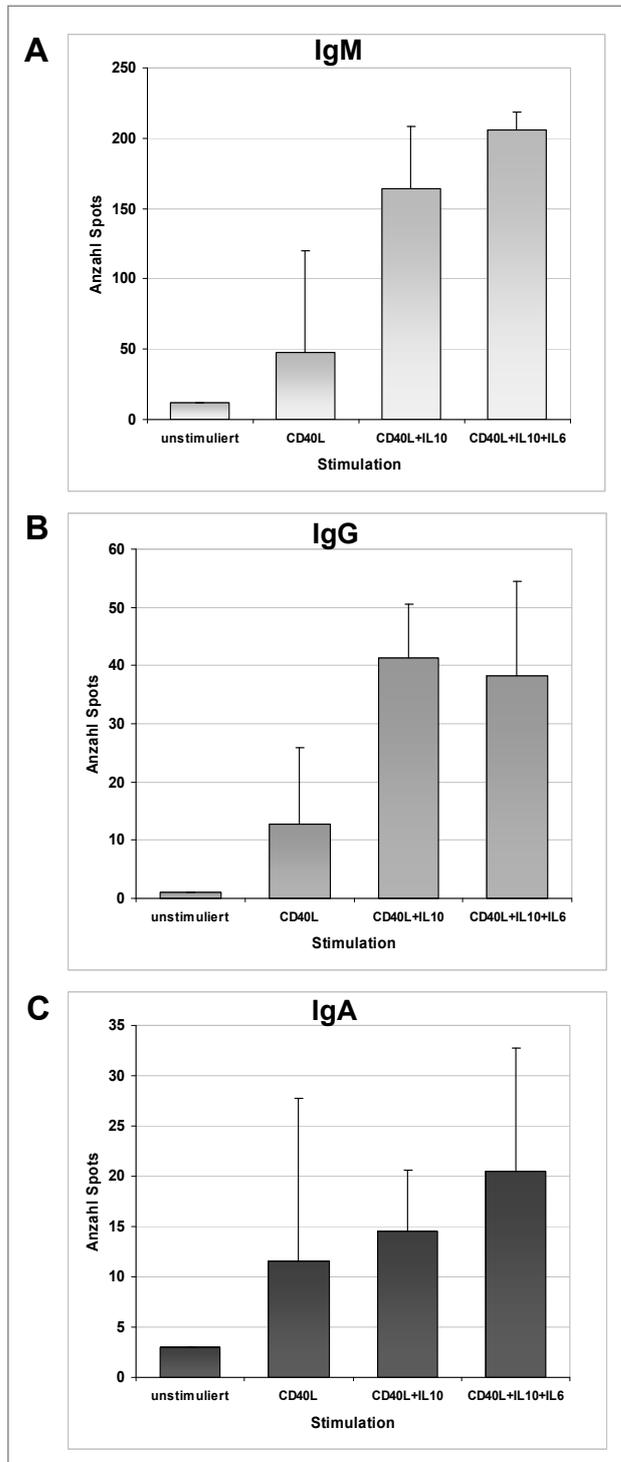


Abbildung 5.24 Bestimmung der Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen im ELISPOT

Wie bereits unter Abbildung 5.23 beschrieben wurden ELISPOT-Assays durchgeführt und die Spotzahl anschließend im AID ELISPOT-Reader erfasst und für 3 Tiere statistisch ausgewertet. Die Anzahl der Spots entspricht der Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen.

Für die Stimulation mit ChCD40L allein oder in Kombination mit ChIL-10, ChIL-6 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für 3 Tiere in Bild A bis C dargestellt. Vergleichend ist jeweils die Anzahl gezählter Spots des entsprechenden Isotyps für unstimulierte Milz-Leukozyten eines weiteren Tieres dargestellt.

Um den Einfluss des ChCD40L auf die terminale Differenzierung noch genauer zu untersuchen, wurden in einem Parallelansatz zu dem in Abbildung 5.24 beschriebenen

Versuch Leukozyten nur in den ersten 3 Tagen einer 6-tägigen Kultur mit ChCD40L stimuliert, bei gleichzeitig fortgesetzter Zugabe der anderen Zytokine bis zur Zellabnahme am Tag 6 mit nachfolgender ELISPOT-Analyse. Exemplarisch für eines der 3 Tiere sind hierzu die Ergebnisse in Abbildung 5.25 dargestellt.

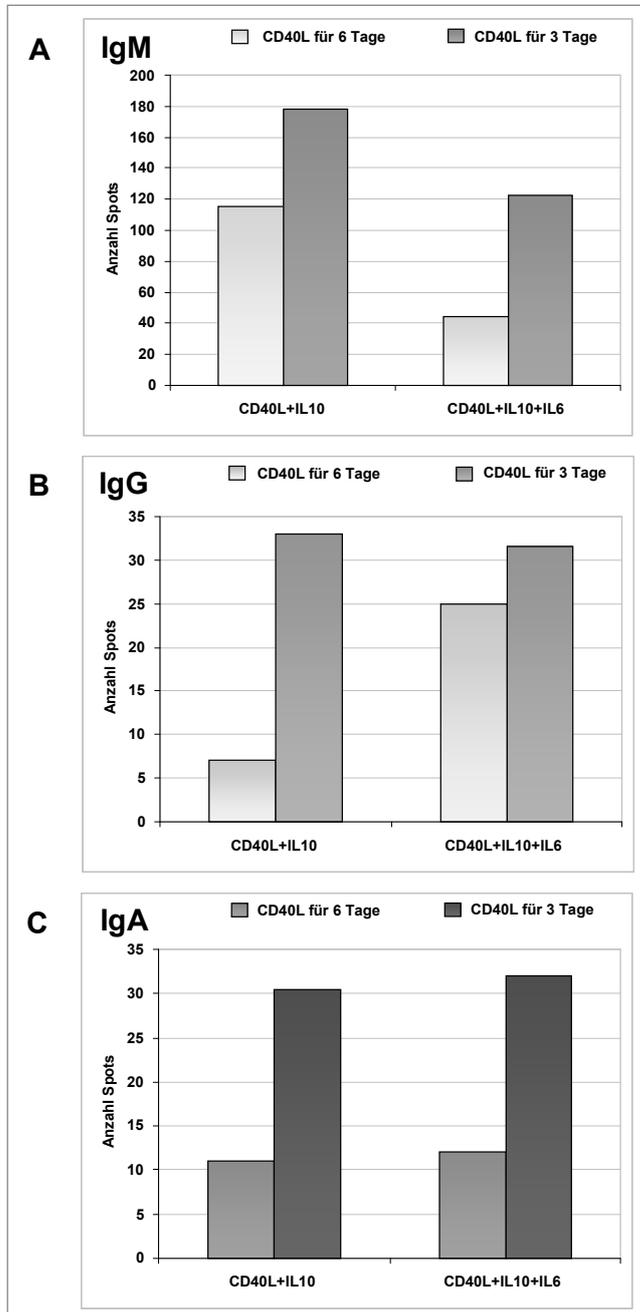


Abbildung 5.25 Einfluss der Stimulationsdauer mit rChCD40L auf die Anzahl Antikörper-sezernierender Zellen

In einem Parallelansatz zu den 6 Tage ChCD40L-stimulierten Lymphozyten (Abbildung 5.24) wurde eine nur 3-tägige Stimulation mit ChCD40L durchgeführt, bei gleichzeitig aufrecht erhaltener Zufuhr der Zytokine ChIL-10 und ChIL-6.

In den Bildern A bis C sind die Ergebnisse der ELISPOT-Analyse zu den jeweiligen Isotypen für die Stimulation ChCD40L + ChIL-10 sowie die Kombination mit ChIL-6 dargestellt.

Repräsentativ für 3 Experimente sind die Ergebnisse für ein Tier dargestellt.

Die Wegnahme des rChCD40L ab Tag 3 der Kultur bewirkt einen weiteren Anstieg der Spotzahl im Vergleich zu den 6 Tage ChCD40L-stimulierten Zellen. Für IgM (Abbildung 5.25 A) kommt es analog zu den 6-tägig ChCD40L-stimulierten Zellen unter Zugabe von ChIL-10 zu einem höheren Anstieg auf bis zu 180 Spots, als unter der Kombination mit ChIL-10 und ChIL-6 mit 120 Spots.

Während die 6-tägige Stimulation mit ChCD40L und ChIL-10 im Vergleich zum unstimulierten Tier nur einen geringen Anstieg der IgG-sezernierenden Zellen auf 6 Spots bewirkte (Bild B), der erst durch Zugabe von ChIL-6 um das 5-fache auf 25 Spots anstieg, bewirkte die Wegnahme des ChCD40L ab Tag 3 in beiden Stimulationen einen nahezu gleichen massiven Anstieg auf über 30 Spots.

Analog dazu ist auch der Verlauf der Spotzahl für IgA nahezu gleich (Bild C). Sowohl für die Kombination des ChCD40L mit ChIL-10 wie auch für diese Kombination unter Zugabe von ChIL-6 konnten bei 6-tägiger Stimulation nur 10 Spots nachgewiesen werden. Bei nur 3-tägiger Stimulation konnte sowohl für die Kombination mit ChIL-10 als auch bei Zugabe des ChIL-6 eine Steigerung der Spotzahl um das 3-fache auf 30 Spots erzielt werden.

## 6 Diskussion

Die Erforschung des B-Zellsystems beim Säuger gründet zu einem großen Teil auf Erkenntnissen, die durch Untersuchungen an Hühnern und Hühnerembryonen gewonnen wurden. Bis zu einem bestimmten Grad sind diese im Huhn gewonnenen entwicklungsbiologischen Erkenntnisse auch auf die B-Zellentwicklung von Mensch und Maus übertragbar. So konnte mit Hilfe von Hühnern erstmals die Dichotomie des Immunsystems nachgewiesen werden [17, 408] und die Ontogenese lymphatischer Organe durch Untersuchungen an Hühnerembryonen verfolgt werden [409]. Da jedoch die B-Zellreifung im Unterschied zu Mensch und Maus zu einem großen Teil in der Bursa Fabricii, einem der Klasse der Vögel eigenen, Darm-assoziierten Gewebe stattfindet [410], ergeben sich große Unterschiede, sowohl struktureller wie auch funktioneller Natur, weshalb das Huhn als Tiermodell für Vorgänge bei Mensch und Maus nur eingeschränkt nutzbar ist. Nachdem jedoch für eine Vielzahl unserer domestizierten Haussäugetiere, wie beispielsweise Rind [411] und Schwein [412], eine B-Zellentwicklung in Darm-assoziierten Geweben nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, dass das Huhn das am besten charakterisierte Modell der sogenannten GALT („*gut associated lymphoid tissue*“)-Spezies ist. Das Wissen zu den Abläufen innerhalb des B-Zellreifungsorgans der Vögel, der Bursa Fabricii, und in der sich anschließenden postbursalen Phase ist jedoch noch immer sehr lückenhaft. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur B-Zellbiologie des Huhnes wurden zu einem großen Teil durch Untersuchungen an Chimären aus Hühnern und Wachteln [413, 414] sowie anhand der im bursalen Stadium arretierten Hühner-B-Zelllinie DT40 gewonnen [289, 415]. Der Schwerpunkt der Forschung lag hierbei auf entwicklungsbiologischen Vorgängen sowie auf den molekularen Mechanismen zur Generierung der hohen Diversität und Antigen-Spezifität der B-Zellrezeptoren. Über die Signale, die diese Prozesse induzieren und in eine bestimmte Richtung leiten, ist jedoch bislang wenig bekannt.

Mit Hilfe von EST-Datenbanken [416] und dem im Jahre 2004 veröffentlichten Hühnergenom [417] konnten, auf molekularbiologischen Verfahren basierend, in den vergangenen Jahren viele Gene identifiziert werden, die dem Säuger homologe Sequenzen aufweisen. Hierzu zählen auch eine Reihe an Zytokin-Genen. Beim Säuger kommt neben Zell-Zell-Interaktionen zwischen membranständigen Rezeptoren und Liganden auch löslichen Faktoren wie Zytokinen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems und insbesondere in der B-Zellentwicklung zu. Da über deren Funktionen

im Huhn jedoch sehr wenig bekannt ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Zytokine hinsichtlich ihrer Funktionen im Huhn näher untersucht. Nachdem in Vorarbeiten mit der ersten Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems bereits ein Grundstein für die Kultur primärer B-Lymphozyten des Huhnes über einen längeren Zeitraum gelegt war, wurden nun die Funktionen der Zytokine ChCD40L, ChIL10 und ChIL-6 im Zusammenhang mit der B-Zellentwicklung beim Huhn *in vitro* untersucht.

### 6.1 Expression von CD40 und CD40L

Um die Funktionen von Zytokinen untersuchen zu können, ist es auch erforderlich sich einen Überblick darüber zu verschaffen in welchen Organen und Zellpopulationen das Zytokin und sein Rezeptor exprimiert werden. Dass den Rezeptor für CD40L, CD40, auch B-Zellen des Huhnes, analog zum Säuger, auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, konnten bereits Tregaskes et al. [48] und Kothlow et al. [15] zeigen. Hierbei gelang es, die Expression des CD40-Rezeptors für verschiedenste B-Zellpopulationen aller untersuchten lymphatischen Organe nachzuweisen. Dieses Expressionsmuster konnte nun für die Organe Milz, Bursa, Caecal-Tonsille und Thymus sowie für aus der Milz isolierte B-Zellen im Rahmen dieser Arbeit auf mRNA-Ebene mit Hilfe sequenzspezifischer Primer für ChCD40 nochmals bestätigt werden. Somit decken sich die bisher im Huhn gewonnenen Erkenntnisse zur CD40-Expression auf B-Zellen aller Entwicklungsstadien, ungeachtet des Organs aus welchem sie isoliert wurden, mit den Ergebnissen aus dem Tiermodell Maus [418], aber auch mit denen der GALT-Spezies Schwein [412] und Rind [411]. Die in den lymphatischen Organen nachgewiesene CD40-Expression rührt nicht ausschließlich von B-Zellen, da auch für T-Zellen und Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten und Makrophagen eine Expression nachgewiesen werden konnte [15]. Dabei kommt dem Rezeptor im Säuger eine kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen zu, die in der Förderung des Wachstums und der Differenzierung [82] mit Generierung von Gedächtnis-T-Zellen resultiert [419].

Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40L auf der Oberfläche von aktivierten T-Helferzellen stellt das zweite Aktivierungssignal der B-Zelle dar. Erst über die Interaktion des CD40 der B-Zelle mit dem CD40L wird die B-Zelle zur kompetenten Antigen-präsentierenden Zelle. Für den Säuger wurden aktivierte CD4+T-Zellen als die Hauptquelle der CD40L-Expression identifiziert [101]. Daneben sind auch zytotoxische CD8+T-Zellen, wenn auch in geringerem Umfang, zur CD40L-Expression befähigt [102]. Auch für *in vitro* stimulierte, aktivierte T-Helferzellen des Huhnes konnte dies durch Tregaskes et al. [48] mit Hilfe monoklonaler, gegen CD40L gerichteter Antikörper

nachgewiesen werden.

Aktivierte T-Zellen sind vorwiegend in lymphatischen Organen anzutreffen, wo es zu einer Interaktion mit B-Zellen über die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD40L kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke CD40L-Expression auch auf mRNA-Ebene für die Organe Milz und Bursa nachgewiesen werden. Ursache der nur sehr schwachen Expression auf cDNA der Bursa könnte die Überzahl an B-Zellen gegenüber den T-Zellen in diesem Organ sein. Auch im Thymus, dem Organ der T-Zelldifferenzierung, war keinerlei CD40L-Expression nachweisbar. Dies ist jedoch konform mit den Beobachtungen bei T-Zellen des Säugers, wonach die CD40L-Expression nur transient und direkt nach Aktivierung der durch Antigen-Kontakt aktivierten T-Zelle erfolgt und innerhalb weniger Stunden herunterreguliert wird [101], im Thymus dagegen fast ausschließlich naive T-Zellen sind.

Wie für den CD40-Rezeptor gilt jedoch auch für seinen Liganden, dass die Expression nicht auf lymphatische Organe mit Beteiligung an der B-Zellentwicklung beschränkt ist, sondern verschiedenste hämatopoietische wie auch nicht-hämatopoietische Zellen zur Expression befähigt sind. Dies konnte auch im Zusammenhang mit der von uns durchgeführten Genexpressionsanalyse beobachtet werden. Die starke Expression des Liganden auf cDNA der Lunge kann damit begründet werden, dass die Lunge einen Ort des ständigen Antigen-Kontakts darstellt und damit auch Antigen-stimulierte T-Zellen enthält. Desweiteren sind neben Lymphozyten auch andere Zellen dazu in der Lage CD40L auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, wie beispielsweise für die Endothelzellen und Fibroblasten der Lunge des Säugers gezeigt werden konnte [420, 421]. Die Expression des Rezeptor-Ligandenpaares CD40-CD40L im Huhn ist damit dem Expressionsmuster des Säugers vergleichbar.

## **6.2 Expression der Interleukine IL-6 und IL-10**

Obwohl die Interleukine IL-6 und IL-10 vielfältige Funktionen besitzen und im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen eine völlig gegensätzliche Wirkung entfalten, gibt es dennoch funktionelle Überschneidungen, was sich auch in einem zum Teil ähnlichen Expressionsmuster widerspiegelt. Diese Beobachtungen konnten in der von uns durchgeführten Genexpressions-Analyse mittels konventioneller RT-PCR bestätigt werden. Übereinstimmend mit Untersuchungen von Rothwell et al. zur ChIL-10-Expression auf Geweben und Zellpopulationen des Huhnes [362] war die stärkste Expression auf cDNA der Bursa, Caecal-Tonsille und Lunge nachweisbar. Auf Thymus und Milz wurde ChIL-10 hingegen nur sehr schwach exprimiert. Die zusätzlich auf cDNA

isolierter B-Lymphozyten der Milz durchgeführte Analyse erbrachte eine zum Lungengewebe vergleichbare Expression. Dieses Ergebnis ist konform mit Beobachtungen beim Säuger, wonach IL-10mRNA konstitutiv in proliferierenden B-Zellen exprimiert wird [367]. Damit besteht ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen von Rothwell et al., die zeigten, dass im Huhn weder auf Milzgewebe noch auf Mitogen-stimulierten Milzzellen oder bursalen Zellen eine IL10-Expression induziert werden konnte. Dies ist insofern erstaunlich, da für Bursagewebe die höchste Expression ermittelt wurde. Als mögliche Ursache kann für diese Diskrepanz eine Expression durch Stromazellen der Bursa oder eine durch die Mitogen-Stimulation bedingte Beendigung der IL-10-Expression vermutet werden.

Die Quellen der IL-6-Expression sind so vielfältig wie seine Funktionen. Als Hauptquellen des pluripotenten Zytokins IL-6 wurden beim Säuger neben T-Zellen, Monozyten und Makrophagen auch B-Zellen identifiziert. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen unserer Gen-Expressionsanalyse auf verschiedenen Geweben des Huhnes wider. Die sehr starke Expression auf cDNA der lymphatischen Organe Caecal-Tonsille, Milz und Bursa als wichtige Organe der B-Zellentwicklung sowie die Expression auf isolierten B-Lymphozyten der Milz deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Säuger, wonach IL-6 ganz entscheidend an der Differenzierung der B-Zellen beteiligt ist und ab dem Stadium der aktivierten B-Zelle verstärkt exprimiert wird [422]. Die im Vergleich schwache Expression auf den Organen Thymus, Lunge und Gehirn entspricht dem für den Säuger postulierten pluripotenten Charakter dieses Zytokins, wonach ein Expressionsnachweis in verschiedensten Zellen des Körpers möglich ist [423].

### 6.3 Biologische Funktionen

Mit der Generierung größerer Mengen des Zytokins ChCD40L eröffnete sich die Möglichkeit dessen Effekt auf die einzelnen Stadien der B-Zellentwicklung zu untersuchen. Nachdem Reinheit und Molekulargewicht des rekombinanten Proteins bestimmt waren und auch ein spezifischer Nachweis mit Hilfe monoklonaler Antikörper gelang, war die Grundlage dafür geschaffen, die biologischen Funktionen *in vitro* zu studieren.

Aufgrund der Tatsache, dass beim Säuger neben CD40L noch weiteren Zytokinen, wie IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, eine entscheidende Rolle in der B-Zelldifferenzierung zukommt, wurde mit ChIL-6 und ChIL-10 der Einfluss zwei weiterer Zytokine auf die B-Zellentwicklung im Huhn im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Nach erfolgreicher Umklonierung des ChIL-10 und ChIL-6 in einen mittels Flag-Motiv markierten Vektor gelang es, auch diese Zytokine in größerer Menge eukaryotisch zu exprimieren und affinitäts-chromatographisch in hoher Reinheit aufzureinigen. Um die biologische Aktivität des eukaryotisch exprimierten ChIL-10 zu überprüfen, wurde ein Funktions-Assay etabliert, der die durch IL-10 hervorgerufene Inhibition der IFN $\gamma$ -Produktion aktivierter Th1-Zellen nachweist. Mit Hilfe der Hühner-Makrophagen-Zelllinie HD11 gelang es uns diesen Effekt auch für ChIL-10 nachzuweisen. Analog zu dem beim Säuger beschriebenen Effekt entfaltete auch ChIL-10-haltiger Zellkultur-Überstand eine inhibitorische Wirkung auf die IFN $\gamma$ -Produktion von mittels T-Zellrezeptor-Quervernetzung aktivierten Milz-T-Zellen.

Für Untersuchungen mit ChIL-6 stand, neben prokaryotisch exprimierten Proben, auch eukaryotisch exprimiertes ChIL-6 in Form eines Zellkultur-Überstandes und als affinitäts-chromatographisch aufgereinigtes Eluat zur Verfügung. Die biologische Aktivität konnte durch die wachstumsfördernde Wirkung auf die murine Hybridom-Zelllinie 7TD1 für alle drei Präparationen im 7TD1-Assay nachgewiesen werden. Ein Effekt der durch einen gegen ChIL-6 gerichteten Antikörper neutralisierbar war.

Mit dem Nachweis der biologischen Aktivität für alle drei Zytokine war damit die Grundlage dafür geschaffen, aufbauend auf den im Rahmen der Dissertation von Iris Morgenroth bereits gewonnenen Erkenntnissen zur Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems beim Huhn [424], den Einfluss des ChCD40L um die Parameter morphologische Veränderungen und Veränderungen auf Transkriptomebene zu ergänzen und den Einfluss von ChIL-6 und ChIL-10 auf die B-Zellen des Huhnes zu studieren.

### 6.3.1 Proliferation

Ein proliferationsfördernder Effekt auf B-Zellen konnte im Mausmodell mit Zugabe von löslichem rekombinanten CD40L, CD40L-exprimierenden transformierten Säugerzellen oder auch durch aktivierte T-Zellen *in vitro* erzeugt werden [425], der durch Zugabe von neutralisierenden anti-CD40L-Antikörpern aufgehoben werden kann [143]. Um herauszufinden, ob dieser, für den Säuger beschriebene Effekt auf die B-Zellen des Huhnes übertragbar ist, wurden Proliferationsassays mit Leukozyten von Milz und Bursa durchgeführt. Hierbei bestätigte sich, dass die CD40L-Stimulation konzentrationsabhängig ein exponentielles Wachstum in Zellen von Milz und Bursa induziert, was bereits Tregaskes et al. [48] anhand durchflusszytometrischer Analysen von Milz-B-Zellen zeigen konnte. Dass der Effekt auf das rekombinante Protein zurückzuführen ist und nicht auf der

unspezifischen Reaktion durch Zugabe eines Fremdproteins beruht, konnte durch die ausbleibende Proliferation bei mit dem Kontroll-Protein stimulierten Zellen bewiesen werden. Da für T-Zellen kein wachstumsfördernder Effekt dieses Ausmaßes beschrieben ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich übereinstimmend zu den Ergebnissen von Kothlow et al. zu isolierten B-Zellen des Huhnes [15] auch hier um einen CD40L-medierten Effekt auf B-Lymphozyten handelt.

Neben der Stärke hat auch die Dauer der CD40L-Stimulation sowie der Differenzierungsgrad der B-Zellen großen Einfluss auf die Entwicklung der B-Zellen. Während für den Säuger ein exponentielles Wachstum naiver B-Zellen nach länger andauernder CD40L-Stimulation beschrieben ist, was in der Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörper-sezernierenden Plasmablasten resultiert, kommt es bei Gedächtnis-B-Zellen bereits nach kurzzeitiger Stimulation zur Differenzierung in Antikörper-sezernierenden Plasmazellen ohne gesteigerte Proliferation [310, 353]. Aufgrund der in unseren Versuchen ausbleibenden B-Zellrezeptor-Stimulation durch fehlenden Antigen-Kontakt muss davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Proliferation zu einem hohen Prozentsatz auf naive B-Zellen zurückzuführen ist.

Aufgrund des aufwändigen Präparationsverfahrens und der kurzen Lebensdauer primärer B-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die im bursalen Stadium der B-Zellentwicklung arretierte Hühner-B-Zelllinie DT40 für weiterführende Analysen eignen würde. Analog zu den Versuchen mit primären B-Zellen wurde diese, durch das aviäre Leukosevirus (ALV) transformierte, Zelllinie mit rekombinantem ChCD40L stimuliert. In den Experimenten zeigte sich jedoch, dass diese Zellen unter CD40L-Stimulation eine reduzierte Proliferation und eine verstärkte Apoptoserate aufweisen. Ähnliche Effekte konnten auch bei transformierten Säugierzellen, einschließlich B-Zell-Lymphomen nach CD40L-Stimulation, beobachtet werden [181, 293]. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte auf die CD40L-Stimulation stellt diese Zelllinie somit ein ungeeignetes System für weiterführende Untersuchungen dar.

Der für CD40L-stimulierte B-Zellen des Säugers beschriebene Effekt einer gesteigerten Responsivität gegenüber anderen Zytokinen, mit daraus resultierenden additiven oder synergistischen Effekten auf die B-Zellproliferation und Differenzierung, war Anlass, dies in Hinblick auf die B-Zellentwicklung des Huhnes zu untersuchen [184, 352]. Hierbei erfolgte eine Fokussierung auf die rekombinanten Zytokine ChIL-10 und ChIL-6. Der Einfluss von IL-10 auf die B-Zellen des Säugers schließt die gesamte B-Zellentwicklung ein, von der Differenzierung der B-Zellvorläufer bis hin zur ausdifferenzierten Plasmazelle

[346, 347]. Neben einer gesteigerten Proliferation entfaltet IL-10 auch einen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen [349, 350]. Analog zu den Untersuchungen zum ChCD40L wurden Proliferationsassays mit Milz-Leukozyten des Huhnes zur Abklärung der Funktion des rekombinanten ChIL-10 durchgeführt. Dabei kam es unter Einwirkung der beiden Zytokine ChCD40L und ChIL-10 zu einer massiven Proliferation, die einer Verdoppelung der durch alleinige ChCD40L-Behandlung erreichten Proliferationsraten entsprach. Übereinstimmend mit den für den Säuger postulierten Effekten [348] kann somit auch für das rekombinante ChIL-10 eine konzentrationsabhängige, proliferationssteigernde Wirkung auf Milz-Leukozyten des Huhnes bestätigt werden. Dass es sich hierbei nicht um einen additiven, sondern um einen synergistischen Effekt handelt, wurde durch die alleinige Behandlung mit ChIL-10 ersichtlich, unter deren Einfluss es eher zu einem inhibitorischen Effekt verglichen mit der Kontrolle kommt. Da gemischte Zellpopulationen untersucht wurden und für Säuger und Huhn eine IL-10-Expression durch verschiedenste Zellen (siehe 2.5.3) beschrieben wurde, bedarf es zur weiteren Abklärung des beschriebenen Effekts des Nachweises, dass dieser allein auf die B-Lymphozyten der Milz-Leukozyten zurückzuführen ist, was durch Wiederholung der Experimente mit isolierten B-Lymphozyten möglich wäre.

Bei Untersuchungen zu Effekten des rekombinanten ChIL-6 auf die Proliferation der Milz-Leukozyten des Huhnes konnte für keine der drei ChIL-6-Präparationen allein eine proliferationsfördernde Wirkung nachgewiesen werden, noch erbrachte eine Kombination des ChIL-6 mit ChCD40L eine Steigerung der Proliferationsrate. In beiden Fällen kam es nicht nur zu einer ausbleibenden Wachstumsförderung, sondern zu einer aktiven Inhibition der Proliferation. Selbst der für die Kombination von ChCD40L und ChIL-10 beschriebene synergistische Effekt wurde durch den inhibitorischen Effekt des zugesetzten ChIL-6 komplett aufgehoben. Ein ausbleibendes Wachstum unter dem Einfluss des IL-6 wurde bereits für primäre B-Zellen des Menschen beschrieben. IL-6 übt hier zwar einen starken stimulatorischen Effekt auf das Wachstum von humanen Myelom-Zellen und murinen Plasmazytomzellen aus [393], besitzt jedoch keinerlei wachstumsfördernde Wirkung auf primäre B-Zellen unabhängig ihres Differenzierungsstadiums [387].

Eine Zugabe des im 7TD1-Assay neutralisierenden anti-ChIL-6-Antikörpers bewirkte überraschenderweise keine Aufhebung des starken inhibitorischen Effektes des ChIL-6. Interessanterweise wurde auch durch die alleinige Zugabe des anti-ChIL-6-Antikörpers, ebenso wie durch einen Kontroll-Antikörper, die Proliferation inhibiert. Damit muss davon ausgegangen werden, dass im Kaninchen generierte IgG-Antikörper ungeeignet sind, um in

diesem Assay-System die Spezifität der ChIL-6-Wirkung zu untersuchen. Dass der beobachtete inhibitorische Effekt von ChIL-6 spezifisch ist, ist sehr wahrscheinlich, da alle drei Präparationen gleichartige Effekte hervorriefen. Zur endgültigen Klärung der ChIL-6-Wirkung fehlt jedoch bislang ein geeignetes Assay-System.

Auch der Einfluss eines ChIL-4-Konstrukts auf die B-Zellen des Huhnes sollte untersucht werden. IL-4 ist im Säuger als ein essentielles Zytokin beschrieben, dessen Einfluss sich auf die gesamte Differenzierung der B-Zelle erstreckt. Insbesondere die Proliferation betreffend wurde für den Säuger eine massive Steigerung der Proliferationsraten auf das Doppelte *in vitro* kultivierter B-Zellen im Vergleich zu allein mit CD40L stimulierten Zellen beschrieben. Aufgrund eines ausbleibenden Effekts in Proliferationsassays mit B-Zellen des Huhnes trotz bereits durch Rothwell et al. publizierter proliferationssteigernder Wirkung [426] und aufgrund fehlender Möglichkeiten die biologische Aktivität des ChIL-4-Konstrukts zu überprüfen, konnten bislang keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden. Hier bedarf es zukünftig einer weiteren Abklärung und Analyse der Sequenz des eingesetzten ChIL-4-Konstrukts und der verwendeten Expressionssysteme.

### 6.3.2 Aktivierung von B-Zellen

Neben der initialen Erkennung und Bindung des Antigens über den für das Antigen spezifischen B-Zellrezeptor und der anschließenden Präsentation des internalisierten und prozessierten Antigens in Form von Peptid-MHC Klasse II-Komplexen, ist nach Kontaktaufnahme zu einer aktivierten T-Zelle die Interaktion zwischen CD40 und CD40L für eine vollständige Aktivierung von B-Zellen unbedingt erforderlich.

In Folge dieser Aktivierung kommt es über verschiedene Signaltransduktionswege zur Expression von Zelloberflächen-Molekülen, wie beispielsweise MHC Klasse II-Molekülen zur Antigen-Präsentation, und kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86 [155], aber auch zur Hochregulation der Zytokin-Expression. Die für den Säuger beschriebene Hochregulation der MHC Klasse II-Moleküle konnte bereits durch Kothlow et al. [15] für CD40L-stimulierte B-Zellen des Huhnes durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da eine gesteigerte MHC II-Expression die Antigen-Präsentation der B-Zellen verstärkt, wird davon ausgegangen, dass durch die daraus resultierende gesteigerte T-Zellhilfe analog zum Säuger auch das adaptive Immunsystem des Huhnes in der Lage ist, sich selbst durch das CD40-CD40L-System zu verstärken und die Formation germinaler Zentren zu fördern. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen ChCD80 gelang es die Expression des kostimulatorischen CD80-Moleküls auf der Oberfläche CD40L-stimulierter Milz-Leukozyten des Huhnes

durchflusszytometrisch nachzuweisen. Anhand der durchgeführten Doppelfärbung auf CD80 und B-Zellspezifischen Oberflächen-Molekülen kann eine Expression durch andere Zellen ausgeschlossen werden. Während sich die frisch präparierten Milz-Lymphozyten als CD80-negativ erwiesen, konnte bereits nach 48-stündiger Kultur unter Einwirkung des ChCD40L eine massive Zunahme der CD80-Expression auf der Zelloberfläche von B-Zellen verzeichnet werden. Damit konnten Beobachtungen zur CD80-Expression auf Säuger-Zellen bestätigt werden. Auch hier wurde gezeigt, dass nicht-aktivierte B-Zellen spontan keines der akzessorischen Oberflächen-Moleküle CD80 und CD86, die zusammen ein Heterodimer zur Interaktion mit CD28 oder CTLA-4 der T-Zelle bilden, exprimieren. Erst die Kokultur mit aktivierten T-Zellen oder die Zugabe von löslichem CD40L führte zur Expression [298]. So bindet CD86 mit 5 bis 10-fach höherer Affinität an CD28 als CD80. CD80 hingegen bindet sehr stark an CTLA-4, welches eine negative Regulation der T-Zellfunktionen bewirkt [304]. Aufgrund dessen, dass über die Ligation bidirektional Signale ausgesandt werden, kommt es über die CD28-CD86-Interaktion zur verstärkten B-Zellproliferation und Initiation von Differenzierungsprozessen. CD80 hingegen wird im Säuger mit einer hemmenden Wirkung auf die Proliferation und verstärkten Apoptose in Verbindung gebracht [309]. Ob dies auch auf die B-Zellen des Huhnes zutrifft muss in weiterführenden Experimenten mit zahlenmäßiger Erfassung der lebenden Zellen noch untersucht werden.

Wie anhand der durchflusszytometrisch ermittelten Zunahme der Zellgröße zu erkennen war, handelt es sich bei der stark CD80-exprimierenden B-Zellpopulation vorwiegend um Lymphoblasten. Mit Dauer der Kultur zeigte sich, dass es zu einer Aufspaltung kommt, in eine weiterhin stark CD80-exprimierende Population und in eine mit bereits abfallender CD80-Expression. Auch diese Beobachtungen sind konform mit dem Nachweis einer hohen CD80-Expression auf aktivierten B-Zellen, späten Zentrozyten und Gedächtniszellen beim Säuger. Da CD80 ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors Bcl6 darstellt, der die B-Zellidentität vor allem während der GC-Reaktion aufrecht erhält [258], liegt die Vermutung nahe, dass die Durchflusszytometrisch nachgewiesene B-Zellpopulation mit abnehmender CD80-Expression bereits terminal differenzierende B-Zellen darstellt, deren CD80-Expression durch das gestartete Plasmazell-Programm herunterreguliert wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit, dass CD80 auch auf B-Zellen des Huhnes einen Aktivierungs-Marker darstellt, der mit Hilfe des gegen ChCD80 gerichteten Antikörpers nachzuweisen ist. Ob die Funktion der Aktivierung über Ligation des CD80 analog zu der

beim Säuger ist, muss in weiterführenden Experimenten noch geprüft werden.

Die im Zusammenhang mit der Aktivierung von B-Zellen auftretenden phänotypischen Veränderungen beschränken sich nicht auf das veränderte Expressionsmuster von Oberflächen-Molekülen der B-Zellen.

Mit dem Eintritt in den Zellzyklus kommt es auch zu morphologischen Veränderungen, die bereits wenige Stunden nach CD40L-Stimulation von B-Lymphozyten des Huhnes auftraten und elektronenmikroskopisch analysiert werden konnten. Das augenfälligste Merkmal einer Aktivierung war dabei die Zunahme der Zellgröße stimulierter B-Zellen. Von den, zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen, CD40L-stimulierten Kulturen MACS-aufgereinigter B-Lymphozyten der Hühner-Milz angefertigten Ultradünnschnitte zeigten, dass es bereits in den 3-tägigen Kulturen zu einer deutlichen Zunahme der Zellgröße kommt. Während sich am Tag der Präparation noch ein heterogenes Bild ergibt, mit der großen Population kleiner, ruhender Lymphozyten neben der Population der etwas größeren, aktiven Lymphozyten mit hellem, breitem Zytoplasmasaum, kommt es mit Dauer der Kultur zu einer Verschiebung hin zur Population vom aktivierten Zelltyp. Diese Beobachtungen bestätigen die bereits durch Kothlow et al. [15] anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen beim Huhn beschriebenen Veränderungen hin zu einem blastoiden Zelltyp. Ein Effekt der bereits sehr früh, vor Entdeckung des CD40-CD40L-Systems, auch an mit T-Zellüberständen behandelten murinen B-Zellen beobachtet werden konnte [427].

Kennzeichen einer B-Zellaktivierung beschränken sich jedoch nicht auf die Zunahme der Zellgröße, sondern beinhalten auch intrazytoplasmatische Veränderungen. Schon nach 3-tägiger Kultur finden sich fast ausschließlich aktivierte Lymphozyten, die gekennzeichnet sind durch einen breiten Zytoplasmasaum, zahlreiche Mitochondrien, ribosomenreiches Zytoplasma und einen euchromatischen Zellkern. Die im Zusammenhang mit der vergleichenden Analyse der Leukozyten-Feinstruktur durch Heinrich Enbergs beschriebenen morphologischen Charakteristika an primären B-Lymphozyten beim Hausgeflügel [428] sind denen im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde vergleichbar. Auch für den Säuger wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. So wurden auch die GC-Zellen des Säugers, die eine aktivierte B-Zellpopulation darstellen, als Zellen von mittlerer bis großer Größe, mit charakteristischem Zellkern und organellenreichem Zytoplasma beschrieben [194].

Anhand dieser Daten konnte somit gezeigt werden, dass ChCD40L die B-Lymphozyten des Huhnes morphologisch in Richtung Plasmazelle treibt.

### 6.3.3 Terminale Differenzierung

Am Ende des Differenzierungs- und Selektionsprozesses der B-Zellen steht die terminale Differenzierung zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle. Während für humane und murine B-Zellen Zelloberflächen-Moleküle, wie beispielsweise CD27 (Gedächtnis-B-Zellen) oder CD138 (Plasmazellen), identifiziert werden konnten, die eine eindeutige Zuordnung der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen zu bestimmten Differenzierungsstadien ermöglicht, ist es bislang nicht gelungen diese oder andere Marker für die B-Zellen des Huhnes zu identifizieren. Somit kann die terminale Differenzierung im Huhn bislang nur indirekt über Bestimmung der Genexpression differenzierungsspezifischer Gene, über morphologische Veränderungen der stimulierten Zellen sowie über den Nachweis der Antikörper-Sekretion erfolgen.

Zur Initiierung der Plasmazell-Differenzierung ist neben dem Antigen-Kontakt auch T-Zellhilfe in Form einer CD40L-medierten Stimulation der B-Zelle erforderlich. Über die CD40-Ligation wird innerhalb der B-Zelle eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultiert. Diese sind in der Folge dazu in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und direkt auf die Transkription bestimmter Gene einzuwirken. Anhand der Expressionsstärke bestimmter Gene kann so auf das Entwicklungsstadium der B-Zelle rückgeschlossen werden. Im Maussystem hat sich herauskristallisiert, dass den drei Transkriptionsfaktoren Bcl6, Pax5 und Blimp1 die größte Bedeutung in der Regulation der B-Zell-Differenzierung zukommt [429]. Um abzuklären, ob die Stimulation der B-Zellen des Huhnes mit löslichem ChCD40L über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen ebenso zur Veränderung der differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktoren und der durch sie beeinflussten Gene führt, wurden Genexpressions-Analysen mittels quantitativer RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern auf cDNA MACS-isolierter B-Lymphozyten der Hühner-Milz durchgeführt.

Während die Expression des Transkriptions-Repressors Bcl6 über den gesamten Zeitraum nahezu gleich blieb, kam es im zeitlichen Verlauf zu einem deutlichen Abfall der Expression von Pax5, dem wichtigsten Regulator der B-Zellidentität. Zeitgleich kam es zu einem Anstieg der Expression des Plasmazell-spezifischen Transkriptions-Repressors Blimp1 sowie zu einem Abfall der B-Zellspezifischen Gene CD79b, AID und Bu1, bei gleichzeitigem Anstieg des Plasmazell-spezifischen Gens  $\mu$ S.

Diese Beobachtungen stimmen mit denen des Säugersystems überein. So ist Pax5 als essentiell für die Festlegung der Zelle auf die B-Zelllinie und den Erhalt der B-Zellzugehörigkeit im Säuger beschrieben und somit vorwiegend in frühen B-Zellstadien

bis hin zur GC-Zelle hoch exprimiert, wird jedoch in terminal differenzierten Plasmazellen reprimiert [228, 229]. Sein Einfluss erstreckt sich auf eine Vielzahl an Genen, zu denen einerseits B-Zellspezifische Gene wie CD79b als ein Teil der Signaleinheit des B-Zellrezeptors, AID als ein Enzym von herausragender Bedeutung im Zusammenhang mit den Prozessen der Affinitätsreifung, Immunglobulin-Klassenwechsel und der bei den GALT-Spezies nachgewiesenen Genkonversion [240], aber auch andere Transkriptionsfaktoren wie Blimp1 zählen [241]. Da es mit der terminalen Differenzierung zum Verlust des oberflächlichen B-Zellrezeptors kommt, und der Prozess der Diversifizierung abgeschlossen ist, erklärt sich so der in unseren Untersuchungen zu beobachtende zeitgleiche Abfall der Genexpression der beiden über Pax5 regulierten Gene CD79b und AID, was dafür spricht, dass die Regulation dieser Gene beim Huhn analog zu der beim Säuger erfolgt.

Auch für den, bisher ausschließlich auf B-Zellen des Huhnes nachgewiesenen Oberflächen-Marker Bu1 konnte eine Abnahme der mRNA-Menge mit Dauer der Kultur beobachtet werden. Über welchen Transkriptionsfaktor dieses Gen reguliert wird, ist bislang noch unerforscht. Es ist jedoch bereits auf Proteinebene bekannt, dass Plasmazellen kein Bu1 exprimieren [430] und es nach CD40L-Stimulation zu einer Entwicklung von der naiven Bu1 hoch exprimierenden B-Zelle, über das Stadium des aktivierten Lymphoblasten mit intermediärer Bu1-Expression, zu einem B-Zellstadium mit Verlust der Bu1-Expression kommt [15]. Die auf Transkriptionsebene gewonnenen Daten konnten somit die auf Proteinebene gewonnenen Daten zur Bu1-Expression bestätigen, und deuten darauf hin, dass CD40L die Differenzierung zu Plasmazellen induziert.

Die Bcl6-Expression der *in vitro* kultivierten naiven B-Zellen des Huhnes, in der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse, wies nur eine geringe und über die Dauer der Kultur unveränderte Expressionsstärke auf. Als mögliche Ursache kommt hierfür in Frage, dass eine CD40L-Stimulation naiver B-Zellen zwar *in vivo* zur Entstehung germinaler Zentren führt, *in vitro* jedoch nur Adhäsion zwischen den B-Zellen, anhaltende Zellproliferation und schließlich Differenzierung ohne vorangegangener Affinitätsreifung bewirkt [140, 141]. Bcl6 gilt im Säugersystem als ein B-Zellspezifischer Transkriptionsfaktor, dem große Bedeutung in der Formation, dem Erhalt und der Regulation der germinalen Zentrumsreaktion zukommt. Er begünstigt somit innerhalb des GC die Prozesse der Affinitätsreifung und des Immunglobulin-Klassenwechsels und fördert auf diese Weise die Entstehung von B-Zellen mit hochaffinem B-Zellrezeptor [247]. Bcl6 zeigt beim Säuger die höchste Expression in maturen B-Zellen des GC,

wohingegen in naiven prä-GC-B-Zellen, aktivierten GC-B-Zellen, Gedächtnis-Zellen oder Plasmazellen keine oder nur eine geringe Bcl6-Expression nachweisbar ist [245, 246]. Die in unseren *in vitro*-Experimenten mit naiven B-Zellen gleichbleibende Bcl6-Expression spricht somit für eine dem Säuger-System vergleichbare Regulation.

Der als Hauptregulator der Plasmazell-Differenzierung bezeichnete Transkriptionsfaktor Blimp1 wird während der frühen B-Zellstadien und während der Reifungsprozesse im GC durch die beiden B-Zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Bcl6 und Pax5 reprimiert. Die höchste Expression konnte in Plasmablasten und Plasmazellen des Säugers nachgewiesen werden [270, 271]. Neben der terminalen Differenzierung als seine wichtigste Funktion, ist Blimp1 aber auch ganz entscheidend an der Ig-Sekretion beteiligt. Eine Vielzahl an Genen, wird über direkte Repression oder indirekt über Repression der B-Zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Bcl6 und Pax5 reguliert [242]. Plasmazell-spezifische Gene, wie die sekretorische Form der schweren Kette des IgM,  $\mu$ S, werden Blimp1-mediiert hochreguliert [276]. Die beim Huhn beobachtete Hochregulation der  $\mu$ S-Expression entspricht somit den Beobachtungen beim Säuger.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse zur Genexpression im Huhn unter dem Einfluss des ChCD40L auf ein dem Säuger vergleichbares Differenzierungsprogramm hindeuten. Welchen Einfluss die beiden Zytokine ChIL-6 und ChIL-10 im Zusammenspiel mit ChCD40L dabei ausüben könnten, muss in weiterführenden Experimenten noch geklärt werden.

Zusätzlich zur Analyse der im Rahmen einer terminalen Differenzierung auftretenden Veränderungen auf Transkriptionsebene konnten morphologische Veränderungen, die für eine terminale Differenzierung sprechen, anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen beobachtet werden. So konnte, im Vergleich zu den bereits beschriebenen Veränderungen, die im Verlauf der B-Zellaktivierung nach 3-tägiger ChCD40L-Stimulation isolierter B-Lymphozyten auftreten, bei fortgesetzter Kultur eine Steigerung des Differenzierungsgrades verzeichnet werden. Die Lymphozyten wiesen zumeist einen exzentrisch gelegenen, euchromatischen, zum Teil dunkelgefleckten, aktiven Zellkern und einen mit Schläuchen und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums angefüllten, verbreiterten Zytoplasmasaum auf. Desweiteren bildeten sie Pseudopodien unterschiedlicher Anzahl und Länge aus und in einigen Zellen waren vermehrt vakuoläre Strukturen zu erkennen, deren Inhalt sich von dem der erweiterten Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums deutlich unterschied. Verglichen mit Aufnahmen und Beschreibungen zur Feinstruktur von B-Lymphozyten des Huhnes, die in den 70er Jahren

des vergangenen Jahrhunderts durch Heinrich Enbergs durchgeführt wurden [428], lässt sich eine große Ähnlichkeit erkennen. Auch hier konnten als Lysosomen oder „*gall bodies*“ bezeichnete, vakuoläre Strukturen verschiedenen Inhalts im Zytoplasma der B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Aufgrund des gehäufteten Auftretens in den Proben unserer Zellen muss aber davon ausgegangen werden, dass es sich um eine präparationsbedingte Veränderung der Zellen handelt. Als eine mögliche Ursache hierfür wird die Aufnahme des Ficoll-Paque, einer für die Isolation der Leukozyten-Fraktion über Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzten, zuckerhaltigen Lösung während der Präparation der Zellen, vermutet.

Bislang konnten auch keine Zellen mit dem für humane Plasmazellen beschriebenen exzentrisch gelegenen Zellkern mit radspeichenähnlich angeordnetem Heterochromatin und ausgedehntem Golgi-Apparat in unseren Präparationen aufgefunden werden, was vermuten lässt, dass in unseren Kulturen keine Plasmazellen, sondern vorgeschaltete B-Zellstadien vorlagen. Bisher durchgeführte elektronenmikroskopische Analysen beinhalteten ausschließlich ChCD40L-stimulierte B-Zellen des Huhnes. In weiterführenden Experimenten müsste nun abgeklärt werden, ob die für die terminale Differenzierung beim Säuger essentiellen Zytokine IL-6 und IL-10 auch im Huhn morphologische Veränderungen bedingen, die denen reifer Plasmazellen entsprechen.

Da die Hauptaufgabe der B-Zellen die Produktion spezifischer Antikörper ist, und sowohl die morphologischen Veränderungen, als auch die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse für eine Differenzierung in Richtung Plasmazelle sprachen, wurde auch die Bildung von Antikörpern durch Stimulation mit rChCD40L allein oder in Kombination mit den Zytokinen ChIL-6 und ChIL-10 *in vitro* untersucht. Methodisch standen hierfür quantitative ELISAs und die ELISPOT-Technik zur Verfügung. Mittels quantitativem ELISA konnte die Konzentration der sezernierten Immunglobulin-Isotypen erfasst werden. Um jedoch Rückschlüsse ziehen zu können, ob gesteigerte Ig-Mengen auf eine erhöhte Zellzahl oder auf eine gesteigerte Ig-Produktion der einzelnen Zellen zurückzuführen sind, wurden ELISPOT-Assays durchgeführt.

Innerhalb der ersten 3 Tage der alleinigen ChCD40L-Stimulation von Milz-Leukozyten des Huhnes kam es nur zu einer geringen Antikörper-Produktion, was sich auch im ELISPOT durch eine geringe Spotzahl widerspiegelte. Über insgesamt 6 Tage hinweg stimulierte Zellen zeigten ebenfalls nur einen geringen Anstieg der Antikörperproduktion, die jedoch verglichen mit Milzzellen eines frisch präparierten Huhnes eine 10-fach gesteigerte IgG-Menge und 5-fach gesteigerte IgM- und IgA-Menge aufwiesen. Diese

Ergebnisse entsprechen nicht ganz den für Mensch und Maus gewonnenen Daten, da hier nur ein geringer oder gar kein Anstieg der unspezifischen Antikörper-Produktion durch alleinige CD40L-Stimulation zu beobachten war [184, 431].

Für den Säuger konnte gezeigt werden, dass IL-10 in B-Zellen auf verschiedenste Prozesse, wie Immunglobulin-Klassenwechsel, die terminale Differenzierung zu Plasmazellen und deren Ig-Produktion und -Sekretion, einen positiven Einfluss ausübt [347]. Mittels ELISPOT-Assays war es möglich nachzuweisen, dass IL-10 *in vitro* nahezu alle CD40-aktivierten B-Zellen zur Ig-Sekretion stimuliert [352]. Bei Hühner-B-Zellen, die mit beiden Zytokinen stimuliert wurden, war nach 3-tägiger Kultur noch kein nennenswerter Unterschied zu den allein mit ChCD40L stimulierten Zellen zu erkennen, nach 6-tägiger Stimulation mit ChCD40L und ChIL-10 kam es jedoch zu einem 5-fachen Anstieg der Sekretion aller drei Ig-Isotypen, was sich parallel auch in einem deutlichen Anstieg der Spotzahl widerspiegelte. Eine Kombination aller drei Zytokine erbrachte hingegen nur noch eine geringe Steigerung der ohnehin schon hohen Antikörper-Mengen und Spotzahlen für ChCD40L und ChIL-10.

Obwohl die Anzahl der IgM-positiven Spots massiv unter der Stimulation der Milz-Leukozyten mit ChCD40L und ChIL-10 anstiegen, im Vergleich zu dem zahlenmäßig nur geringen Anstieg der IgG- und IgA-positiven Spots, konnte dennoch nur ein vergleichsweise geringer Anstieg der sezernierten IgM-Menge verzeichnet werden. Der gleichzeitig beobachtete massive Anstieg der sezernierten IgG-Mengen bei relativ geringer Spotzahl, und auch die im ELISPOT-Assay beobachtete Zunahme der Spotgröße, deuten darauf hin, dass es unter Einwirkung der beiden Zytokine ChCD40L und ChIL-10 tatsächlich zu einem Klassenwechsel und zur Differenzierung der naiven B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen kommt. Durch Zugabe von ChIL-6 war weder ein Anstieg der Spotzahlen, noch der ohnehin schon hohen sezernierten Antikörper-Mengen oder ein Klassenwechsel hin zu einem bestimmten Isotyp zu beobachten. Dies widerspricht zum Teil den für den Säuger beschriebenen Beobachtungen zur IL-6-Wirkung.

IL-6 gilt im Säugersystem als ein für die terminale Differenzierung zur Plasmazelle essentielles Zytokin, das gemeinsam mit IL-10 in CD40-aktivierten B-Zellen eine schnelle Differenzierung zu Plasmazellen induziert und diese am Leben erhält [352, 361]. Neben Differenzierung und Überleben hat IL-6 aber auch einen entscheidenden Einfluss auf die Steigerung der Immunglobulin-Sekretion, sowohl *in vitro* generierter, als auch aus dem Knochenmark isolierter Plasmazellen [391, 392]. Während für IL-10 im Säugersystem eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass es einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu

IgG, im Menschen insbesondere zu IgG1 und IgG3 begünstigt [356] und im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen wie TGF $\beta$  auch einen Isotypwechsel zu IgA bewirken kann [357], ist für IL-6 nur allgemein eine Steigerung der Ig-Sekretion, nicht jedoch der bevorzugte Klassenwechsel zu einem bestimmten Isotyp hin beschrieben worden [432]. Über die Ursachen des im Huhn ausbleibenden Anstiegs der Ig-Sekretion nach ChIL-6-Zugabe kann bislang nur spekuliert werden. So könnte hier ein anderer Regulationsmechanismus zugrunde liegen oder Unterschiede in der gegenseitigen Beeinflussung der drei Zytokine. Um dies weiter abzuklären bedarf es weiterführender Experimente, auch mit anderen Zytokin-Kombinationen.

So wichtig die CD40-Stimulation für die Aktivierung der B-Zelle, die Formation germinaler Zentren und die Initiierung der terminalen Differenzierung ist, so wichtig ist auch die Beendigung dieses Signals um die terminale Differenzierung abzuschließen. Es finden sich zahlreiche Hinweise in der Literatur, dass eine andauernde CD40-Stimulation die B-Zellen in einem Stadium kurz vor der terminalen Differenzierung arretiert, ein Prozess der *in vivo* für die GC-Reaktion äusserst wichtig ist, um die Affinitätsreifung weiter voranzutreiben [179]. Auch die Zugabe von weiteren Zytokinen, wie IL-4, IL-6 und IL-10, kann bei fortgesetzter CD40-Stimulation den Arrest der Zelle nicht aufheben [185]. Erst die Unterbrechung des CD40-Signals bei fortgesetzter Stimulation mit Interleukinen, wie beispielsweise IL-10 und IL-2, führt zur terminalen Differenzierung [194]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen im Säugersystem konnte gezeigt werden, dass durch die Wegnahme des ChCD40L am Tag 3 der Kultur bei fortgesetzter ChIL-10-Zugabe die Anzahl Antikörper-sezernierender Milz-Leukozyten gegenüber den 6 Tage CD40-stimulierten Zellen massiv ansteigt. Insbesondere für IgG- und IgA-sezernierende Zellen lässt sich ein deutlicher Anstieg erkennen, der durch zusätzliche Gabe von ChIL-6 nicht weiter gesteigert werden konnte und im Fall des IgM sogar zu einer Reduktion der Antikörper-sezernierenden Zellen führte. Für die im ELISA bestimmten Antikörper-Mengen ließen sich gegenüber den 6 Tage ChCD40L-stimulierten B-Zellen hingegen nur geringe Unterschiede feststellen.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Beendigung der ChCD40L-Stimulation am Tag 3 vermehrt Klassenwechsel hin zu IgG und IgA induziert, die Antikörper-Sekretion allerdings dadurch nicht beeinflusst wird. Ob es bei länger andauernder Kultur letztendlich doch auch zu einem Anstieg der sezernierten Antikörper-Mengen kommt, müsste in weiteren Experimenten abgeklärt werden.

#### 6.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten ließen erkennen, dass für B-Zellen des Huhnes eine große Übereinstimmung zur Regulation der B-Zellentwicklung und Differenzierung, wie sie durch Zytokine für den Säuger beschrieben ist, besteht. Dennoch sind viele Fragen unbeantwortet geblieben, die weiter abgeklärt werden sollten. Erste Untersuchungen zur terminalen Differenzierung deuten darauf hin, dass auch *in vitro* kultivierte B-Zellen des Huhnes in die Differenzierung in Richtung Plasmazelle getrieben werden können. In Übereinstimmung zum Säugersystem reichte hierbei die alleinige ChCD40L-Stimulation der B-Lymphozyten nicht aus, um eine terminale Differenzierung zu erreichen. Interessant wäre es nun zu klären, welche weiteren, beim Huhn identifizierten Zytokine, wie beispielsweise IL-13, IL-17 und TGF $\beta$ , den Prozess begünstigen, und durch welche Zytokine ein Klassenwechsel zu IgA gefördert werden könnte. In diesem Zusammenhang wäre es auch wichtig, die Funktion des ChIL-4 zu klären, da IL-4 im Säuger eine entscheidende Bedeutung in Proliferation und Klassenwechsel zukommt.

Auch die untersuchten Vorgänge auf Transkriptionsebene lassen erkennen, dass es unter dem Einfluss des ChCD40L zur Aktivierung eines Differenzierungs-Programmes kommt. Durch welche Zytokine diese Prozesse weiter begünstigt werden und letztendlich die abschließende Differenzierung ermöglichen, muss in weiteren Untersuchungen erörtert werden.

Da wir nun in der Lage sind, B-Lymphozyten des Huhnes in Langzeitkulturen in eine Differenzierung in Richtung Plasmazelle zu treiben, eröffnen sich weitere Möglichkeiten für detaillierte Untersuchungen der Wirt-Pathogen-Interaktion wirtschaftlich bedeutender Viruserkrankungen des Huhnes in verschiedenen B-Zellstadien. So könnten Untersuchungen an *in vitro* kultivierten B-Zellen zu einem besseren Verständnis der Pathogenese führen, womit der Generierung von Therapeutika und Vakzinen Vorschub geleistet werden würde.

Mit der Nachweismöglichkeit der Aktivierung der B-Lymphozyten anhand des Aktivierungs-Markers CD80 ist zudem eine Basis geschaffen, die Effizienz des rekombinanten ChCD40L als Adjuvanz in der Impfstoffentwicklung zu testen.

## 7 Zusammenfassung

Mit Verfügbarkeit der EST-Datenbanken und der Publikation des Hühnergenoms im Jahre 2004 sind Informationen zugänglich geworden, die zur Untersuchung der Phylogenie, Struktur und Funktion des aviären Immunsystems erforderlich sind. Damit wurde die Möglichkeit geschaffen ein besseres Verständnis der Funktionsweise des Immunsystems, insbesondere aber jener regulatorischer Signale beim Huhn zu erlangen, die die Entwicklung, das Überleben und den Zelltod von B-Zellen regulieren.

Zu den im Mausmodell identifizierten immunregulatorischen Komponenten gehören die Zytokine CD40L, IL-10 und IL-6, die entscheidend an terminalen Differenzierungsprozessen von naiven B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen beteiligt sind. Um zu untersuchen, ob die beim Huhn identifizierten orthologen Zytokine dieselben Funktionen besitzen wie sie für den Säuger postuliert sind, wurden die Interleukine ChIL-6 und ChIL-10 nach Klonierung als rekombinante Proteine exprimiert und *in vitro*-Untersuchungen zu ihrer Funktion im Zusammenspiel mit dem Zytokin ChCD40L in Hinblick auf die B-Zellentwicklung durchgeführt. Hierzu wurden B-Zellen der Milz und der Bursa des Huhnes mit den Zytokinen ChCD40L, ChIL-6 und ChIL-10 stimuliert.

Während bereits durch Stimulation mit ChCD40L eine massive Proliferation der B-Zellen induziert wird, konnte für das Zusammenspiel mit ChIL-10 ein synergistischer Effekt mit weiterer Proliferationssteigerung nachgewiesen werden, wohingegen das Zusammenspiel mit ChIL-6 eine komplette Inhibition der Proliferation zur Folge hatte.

Bezüglich der Aktivierung von B-Zellen konnte ebenfalls ein positiver Effekt für die Stimulation mit ChCD40L nachgewiesen werden, der sich in einer verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 auf der B-Zelloberfläche, insbesondere der B-Lymphoblasten äussert.

Anhand der Hochregulation des Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktors Blimp1 bei gleichzeitiger Herunterregulation B-Zellspezifischer Gene als auch auf morphologischer Ebene konnte durch ChCD40L eine Differenzierung der B-Zellen hin zu einem Plasmablasten-ähnlichen Phänotyp gezeigt werden. Um eine terminale Differenzierung, aber auch den Klassenwechsel nachweisen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die ELISPOT-Technik etabliert. Mit Hilfe dieser Technik konnte so für eine simultane Stimulation mit ChCD40L, ChIL-10 und ChIL-6 ein Immunglobulin-Klassenwechsel hin zu IgG und IgA auf Einzelzellniveau, mittels quantitativer ELISAs aber auch eine

verstärkte Immunglobulin-Sekretion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit ChCD40L in B-Zellen des Huhnes eine Differenzierung in Richtung Plasmazelle initiiert, während weitere Schritte des terminalen Differenzierungsprogrammes wie der Immunglobulin-Klassenwechsel erst durch zusätzliche Stimulation mit ChIL-10 induziert wurden.

## 8 Summary

### **The role of the cytokines CD40L, IL-6 and IL-10 in terminal differentiation of chicken B cells**

The availability of EST database and chicken genome sequence data has greatly facilitated studies on the phylogeny, structure and function of the avian immune system. In particular, signals and signalling molecules which play a critical role in leukocyte development and differentiation can now be identified and functionally characterized.

In murine models the cytokines CD40L, IL-10 and IL-6 amongst others have been described as critical regulators of terminal differentiation of naïve B lymphocytes into antibody secreting plasma cells and orthologs of these cytokines have recently been identified in the chicken. To study their role in avian B cell development and differentiation the cytokines IL-6 and IL-10 were cloned and expressed as recombinant proteins and their functional properties were investigated in combination with CD40L. *In vitro* assays utilizing cell preparations from spleen and bursa of Fabricius were established. Stimulation of these cultures with ChCD40L alone led to a massive proliferation of B lymphocytes. ChIL-10 further increased the proliferative activity in a synergistic way while ChIL-6 completely inhibited the CD40L effect. In addition to its proliferation inducing activity ChCD40L also induced B cell differentiation which was demonstrated by the upregulation of the co-stimulatory molecule CD80 on blastoid transformed B cells.

ChCD40L stimulated B cells developed a plasmablast like phenotype as revealed by transmission electron microscopy up-regulation of the plasma cell specific transcription factor Blimp 1 and the simultaneous down-regulation of B cell specific genes. To further demonstrate the terminal differentiation into antibody secreting cells and to investigate the regulation of immunoglobulin class switching ELISPOT assays for chicken IgG, IgM and IgA were established. Simultaneous stimulation of B cells with ChCD40L, ChIL-10 and ChIL-6 induced class switching by single cells from IgM to IgG and IgA. Quantification of immunoglobulin isotypes in cell culture supernatants by ELISA further showed a significant increase in immunoglobulin secretion by cytokine activated cells.

Collectively these data show that chicken B cells differentiate into plasma blasts in response to ChCD40L treatment. However, further differentiation steps such as immunoglobulin class switching require additional stimulation in particular with ChIL-10.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Rast, J.P., et al., *alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny*. *Immunity*, 1997. **6**(1): p. 1-11.
2. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 595-621.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. *Int Rev Immunol*, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
7. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. *J Immunol*, 1996. **157**(12): p. 5478-86.
8. 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.
9. 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.
10. Pink, J.R. and O. Lassila, *B-cell commitment and diversification in the bursa of Fabricius*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1987. **135**: p. 57-64.
11. Glick, B., *The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery*. *Poult Sci*, 1994. **73**(7): p. 979-83.
12. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. *Eur J Immunol*, 1973. **3**(9): p. 585-95.
13. 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.
14. 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.

15. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1015-26.
16. Nieminen, P., J. Liippo, and O. Lassila, *Pax-5 and EBF are expressed in committed B-cell progenitors prior to the colonization of the embryonic bursa of fabricius*. Scand J Immunol, 2000. **52**(5): p. 465-9.
17. 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.
18. Pink, J.R., M.J. Ratcliffe, and O. Vainio, *Immunoglobulin-bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes*. Eur J Immunol, 1985. **15**(6): p. 617-20.
19. Kohonen, P., K.P. Nera, and O. Lassila, *Avian model for B-cell immunology--new genomes and phylotranscriptomics*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 113-21.
20. 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.
21. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
22. Lassila, O., et al., *B cell precursors in chick embryos surgically bursectomized at 72 h of incubation*. Eur J Immunol, 1988. **18**(11): p. 1867-70.
23. Mansikka, A., et al., *Bursectomy of chicken embryos at 60 hours of incubation leads to an oligoclonal B cell compartment and restricted Ig diversity*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3601-9.
24. Lassila, O., et al., *The origin of lymphoid stem cells studied in chick yold sac-embryo chimaeras*. Nature, 1978. **272**(5651): p. 353-4.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Pike, K.A., et al., *The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to support efficient early B cell development*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2210-8.

29. Le Douarin, N.M. and F.V. Jotereau, *Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras*. J Exp Med, 1975. **142**(1): p. 17-40.
30. Dunon, D., et al., *Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development*. Dev Comp Immunol, 1998. **22**(3): p. 279-87.
31. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
32. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Du Pasquier, L., *Phylogeny of B-cell development*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(2): p. 185-93.
37. 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.
38. 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.
39. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
40. Arakawa, H. and J.M. Buerstedde, *Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 458-64.
41. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. Arakawa, H., H. Saribasak, and J.M. Buerstedde, *Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate*. PLoS Biol, 2004. **2**(7): p. E179.
46. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.
47. Furlong, R.F., *Insights into vertebrate evolution from the chicken genome sequence*. Genome Biol, 2005. **6**(2): p. 207.
48. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate*. Dev Comp Immunol, 2005. **29**(4): p. 361-74.
49. 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.
50. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
51. De Togni, P., et al., *Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin*. Science, 1994. **264**(5159): p. 703-7.
52. Yamashita, T., et al., *Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor*. Anat Sci Int, 2005. **80**(1): p. 37-41.
53. Armitage, R.J., *Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(3): p. 407-13.
54. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
55. 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.
56. Gruss, H.J., J. Duyster, and F. Herrmann, *Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease*. Ann Oncol, 1996. **7 Suppl 4**: p. 19-26.

57. Vogel, L.A. and R.J. Noelle, *CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family*. Semin Immunol, 1998. **10**(6): p. 435-42.
58. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
59. Anderson, D.M., et al., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 175-9.
60. Bennett, S.R., et al., *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 478-80.
61. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
62. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 35-9.
63. Huard, B., et al., *T cell costimulation by the TNF ligand BAFF*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6225-31.
64. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 807-17.
65. Schneider, P., *The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 282-9.
66. Karpusas, M., et al., *A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. Structure, 1995. **3**(12): p. 1426.
67. Eck, M.J. and S.R. Sprang, *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17595-605.
68. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker, *Structure of tumour necrosis factor*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 225-8.
69. Rossmann, M.G., et al., *Cell recognition and entry by rhino- and enteroviruses*. Virology, 2000. **269**(2): p. 239-47.
70. Marsters, S.A., et al., *Identification of cysteine-rich domains of the type I tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 5747-50.
71. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.

72. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling*. Semin Immunol, 2006. **18**(5): p. 263-75.
73. Gruss, H.J. and S.K. Dower, *The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases*. Cytokines Mol Ther, 1995. **1**(2): p. 75-105.
74. Muppidi, J.R., J. Tschopp, and R.M. Siegel, *Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 461-5.
75. Nagata, S., *Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality*. Genes Cells, 1996. **1**(10): p. 873-9.
76. Callard, R.E., et al., *CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome*. Immunol Today, 1993. **14**(11): p. 559-64.
77. Notarangelo, L.D., M. Duse, and A.G. Ugazio, *Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM)*. Immunodeficiency Rev, 1992. **3**(2): p. 101-21.
78. Costello, R.T., J.A. Gastaut, and D. Olive, *What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy?* Immunol Today, 1999. **20**(11): p. 488-93.
79. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
80. Tsukamoto, N., et al., *Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1234-9.
81. Tone, M., et al., *Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1751-6.
82. Armitage, R.J., et al., *CD40 ligand is a T cell growth factor*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2326-31.
83. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 131-51.
84. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 79-83.
85. 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.
86. Quezada, S.A., et al., *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 307-28.

87. Adawi, A., et al., *Blockade of CD40-CD40 ligand interactions protects against radiation-induced pulmonary inflammation and fibrosis*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **89**(3): p. 222-30.
88. Challa, A., et al., *Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylke Burkitt lymphoma cells*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3411-8.
89. Mazzei, G.J., et al., *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7025-8.
90. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1749-54.
91. Lane, P., et al., *Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1209-13.
92. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 9-19.
93. Carbone, E., et al., *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2053-60.
94. Laman, J.D., et al., *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 272-7.
95. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
96. Larsen, C.P., et al., *CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway*. Transplantation, 1996. **61**(1): p. 4-9.
97. Grammer, A.C., et al., *Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4150-9.
98. Schattner, E.J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2689-97.
99. Lee, B.O., et al., *CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary B cell responses*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5707-17.
100. Grammer, A.C., et al., *The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 4996-5010.
101. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, and I.C. MacLennan, *A subset of CD4+ memory T*

- cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex.* J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1293-301.
102. Cronin, D.C., 2nd, R. Stack, and F.W. Fitch, *IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help.* J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3118-27.
103. Hollenbaugh, D., et al., *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity.* EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4313-21.
104. Gray, J.D., et al., *Transforming growth factor beta enhances the expression of CD154 (CD40L) and production of tumor necrosis factor alpha by human T lymphocytes.* Immunol Lett, 2001. **78**(2): p. 83-8.
105. Roy, M., et al., *The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells.* J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2497-510.
106. Fuleihan, R., et al., *Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes.* J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1315-20.
107. Hostager, B.S., I.M. Catlett, and G.A. Bishop, *Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15392-8.
108. Vidalain, P.O., et al., *CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts.* EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3304-13.
109. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization.* Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 10168-77.
110. Werneburg, B.G., et al., *Molecular characterization of CD40 signaling intermediates.* J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43334-42.
111. Inoue, J., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling.* Exp Cell Res, 2000. **254**(1): p. 14-24.
112. Hsing, Y., B.S. Hostager, and G.A. Bishop, *Characterization of CD40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa B activation in B lymphocytes.* J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4898-906.
113. Cheng, G., et al., *Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1494-8.
114. Xu, Y. and G. Song, *The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation.*

- J Biomed Sci, 2004. **11**(4): p. 426-38.
115. Ishida, T., et al., *Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28745-8.
116. McWhirter, S.M., et al., *Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8408-13.
117. Pullen, S.S., et al., *CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14246-54.
118. Haswell, L.E., M.J. Glennie, and A. Al-Shamkhani, *Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3094-100.
119. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
120. Alcamo, E., et al., *Targeted mutation of TNF receptor 1 rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1592-600.
121. Senftleben, U., et al., *IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis*. Immunity, 2001. **14**(3): p. 217-30.
122. Weih, F. and J. Caamano, *Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 91-105.
123. Coope, H.J., et al., *CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52*. EMBO J, 2002. **21**(20): p. 5375-85.
124. Manning, E., et al., *Cellular responses to murine CD40 in a mouse B cell line may be TRAF dependent or independent*. Eur J Immunol, 2002. **32**(1): p. 39-49.
125. Galibert, L., et al., *The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34120-7.
126. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
127. Grossmann, M., et al., *The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression*. EMBO J, 2000. **19**(23):

- p. 6351-60.
128. Ahonen, C., et al., *The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 451-6.
  129. Nakano, H., et al., *Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9803-8.
  130. Hanissian, S.H. and R.S. Geha, *Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 379-87.
  131. Karras, J.G., et al., *Induction of STAT protein signaling through the CD40 receptor in B lymphocytes: distinct STAT activation following surface Ig and CD40 receptor engagement*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4350-5.
  132. Saemann, M.D., et al., *CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited*. Transplant Proc, 2002. **34**(5): p. 1407-8.
  133. Saemann, M.D., et al., *Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3*. Am J Transplant, 2003. **3**(11): p. 1341-9.
  134. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
  135. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 85-106.
  136. Lanzavecchia, A., *Antigen-specific interaction between T and B cells*. Nature, 1985. **314**(6011): p. 537-9.
  137. Rock, K.L., B. Benacerraf, and A.K. Abbas, *Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors*. J Exp Med, 1984. **160**(4): p. 1102-13.
  138. Carey, G.B., et al., *B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 105-15.
  139. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *The CD40 ligand. At the center of the immune universe?* Immunol Res, 1997. **16**(1): p. 59-70.
  140. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.

141. Barrett, T.B., G. Shu, and E.A. Clark, *CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells*. J Immunol, 1991. **146**(6): p. 1722-9.
142. Foy, T.M., et al., *gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 157-63.
143. Foy, T.M., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1567-75.
144. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. Immunity, 1994. **1**(3): p. 167-78.
145. Janeway, C., *Immunobiology*. Vol. 7. 2008, New York: Garland Science.
146. Grewal, I.S., et al., *Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis*. Science, 1996. **273**(5283): p. 1864-7.
147. Agarwal, A. and K.A. Newell, *The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance*. Curr Opin Organ Transplant, 2008. **13**(4): p. 366-72.
148. Toubi, E. and Y. Shoenfeld, *The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway*. Autoimmunity, 2004. **37**(6-7): p. 457-64.
149. Vonderheide, R.H., *Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1083-8.
150. Younes, A., et al., *Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 135-41.
151. Tong, A.W. and M.J. Stone, *Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(1): p. 1-13.
152. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands*. Genome Biol, 2005. **6**(6): p. 223.
153. Krensky, A.M., et al., *T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection*. N Engl J Med, 1990. **322**(8): p. 510-7.
154. Parnes, J.R., *Molecular biology and function of CD4 and CD8*. Adv Immunol, 1989. **44**: p. 265-311.
155. Goldstein, M.D. and T.H. Watts, *Identification of distinct domains in CD40 involved*

- in B7-1 induction or growth inhibition.* J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2837-43.
156. Schattner, E.J., et al., *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway.* J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1557-65.
157. Garside, P., et al., *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.* Science, 1998. **281**(5373): p. 96-9.
158. Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations.* J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1165-75.
159. MacLennan, I.C., *Germinal centers.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
160. Van den Eertwegh, A.J., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions.* J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1555-65.
161. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen.* Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
162. Smith, K.G., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci.* Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-8.
163. Cozine, C.L., K.L. Wolniak, and T.J. Waldschmidt, *The primary germinal center response in mice.* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 298-302.
164. Kelsoe, G., *Life and death in germinal centers (redux).* Immunity, 1996. **4**(2): p. 107-11.
165. Wolniak, K.L., S.M. Shinall, and T.J. Waldschmidt, *The germinal center response.* Crit Rev Immunol, 2004. **24**(1): p. 39-65.
166. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5.* Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
167. Campbell, D.J., C.H. Kim, and E.C. Butcher, *Chemokines in the systemic organization of immunity.* Immunol Rev, 2003. **195**: p. 58-71.
168. Cyster, J.G., et al., *Traffic patterns of B cells and plasma cells.* Adv Exp Med Biol, 2002. **512**: p. 35-41.
169. Allen, C.D., et al., *Imaging of germinal center selection events during affinity maturation.* Science, 2007. **315**(5811): p. 528-31.

170. Liu, Y.J., et al., *Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 165-70.
171. Koni, P.A. and R.A. Flavell, *Lymph node germinal centers form in the absence of follicular dendritic cell networks*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 855-64.
172. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 241-50.
173. King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 741-66.
174. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, *Maturation of the immune response in germinal centers*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1121-9.
175. Erickson, L.D., et al., *Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40*. J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 613-20.
176. Jacob, J. and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers*. J Exp Med, 1992. **176**(3): p. 679-87.
177. Tuscano, J.M., et al., *Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center*. Blood, 1996. **88**(4): p. 1359-64.
178. Holder, M.J., et al., *Suppression of apoptosis in normal and neoplastic human B lymphocytes by CD40 ligand is independent of Bcl-2 induction*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2368-71.
179. Randall, T.D., et al., *Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 733-42.
180. Clark, L.B., T.M. Foy, and R.J. Noelle, *CD40 and its ligand*. Adv Immunol, 1996. **63**: p. 43-78.
181. Funakoshi, S., et al., *Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation*. Blood, 1994. **83**(10): p. 2787-94.
182. Griebel, P., et al., *CD40 signaling induces B cell responsiveness to multiple members of the gamma chain-common cytokine family*. Int Immunol, 1999. **11**(7): p. 1139-47.
183. Cocks, B.G., et al., *IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand*. Int Immunol, 1993. **5**(6): p. 657-63.
184. Armitage, R.J., et al., *Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines*. J Immunol, 1993.

- 150(9): p. 3671-80.
185. Fecteau, J.F. and S. Neron, *CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4621-9.
186. Laytragoon-Lewin, N., *Programmed cell death: the influence of CD40, CD95 (Fas or Apo-1) and their ligands*. Med Oncol, 1998. **15**(1): p. 15-9.
187. Lens, S.M., et al., *A dual role for both CD40-ligand and TNF-alpha in controlling human B cell death*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 507-14.
188. Garrone, P., et al., *Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1265-73.
189. Rothstein, T.L., et al., *Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 163-5.
190. Hartley, S.B., et al., *Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 765-9.
191. Shokat, K.M. and C.C. Goodnow, *Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses*. Nature, 1995. **375**(6529): p. 334-8.
192. Galibert, L., et al., *Negative selection of human germinal center B cells by prolonged BCR cross-linking*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2075-85.
193. Hu, B.T., et al., *Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1068-71.
194. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
195. Choi, M.S., et al., *The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1352-7.
196. Lefterova, P., et al., *Induction of apoptosis in B lymphoma cells by activation with CD40L*. Acta Haematol, 2000. **103**(3): p. 168-71.
197. French, R.R., et al., *CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 548-53.
198. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.

199. Muramatsu, M., et al., *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18470-6.
200. Kolar, G.R., et al., *A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID.* Blood, 2007. **109**(6): p. 2545-52.
201. Dedeoglu, F., et al., *Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB.* Int Immunol, 2004. **16**(3): p. 395-404.
202. Shen, H.M., S. Ratnam, and U. Storb, *Targeting of the activation-induced cytosine deaminase is strongly influenced by the sequence and structure of the targeted DNA.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 10815-21.
203. Shapiro, G.S., et al., *Predicting regional mutability in antibody V genes based solely on di- and trinucleotide sequence composition.* J Immunol, 1999. **163**(1): p. 259-68.
204. Manis, J.P., M. Tian, and F.W. Alt, *Mechanism and control of class-switch recombination.* Trends Immunol, 2002. **23**(1): p. 31-9.
205. Schrader, C.E., et al., *Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG.* J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 561-8.
206. Christmann, M., et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update.* Toxicology, 2003. **193**(1-2): p. 3-34.
207. Stavnezer, J. and C.E. Schrader, *Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination.* Trends Genet, 2006. **22**(1): p. 23-8.
208. Beard, W.A. and S.H. Wilson, *Structure and mechanism of DNA polymerase Beta.* Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 361-82.
209. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
210. Cogne, M. and B. Birshstein, *Regulation of class switch recombination.* Molecular Biology of B cells, ed. T. Honjo, F.W. Alt, and M.S. Neuberger. 2004, London: Elsevier.
211. Gascan, H., et al., *Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones.* J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 747-50.
212. Tangye, S.G. and P.D. Hodgkin, *Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses.* Immunology, 2004. **112**(4): p. 509-20.

213. Paus, D., et al., *Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1081-91.
214. Hsu, M.C., et al., *B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5905-10.
215. Tarlinton, D., *B-cell memory: are subsets necessary?* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 785-90.
216. Benson, M.J., et al., *Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 275-80.
217. Spets, H., et al., *Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival*. Eur J Haematol, 2002. **69**(2): p. 76-89.
218. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
219. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
220. Kallies, A., et al., *Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 555-66.
221. Weaver, D. and D. Baltimore, *B lymphocyte-specific protein binding near an immunoglobulin kappa-chain gene J segment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(6): p. 1516-20.
222. Horcher, M., A. Souabni, and M. Busslinger, *Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 779-90.
223. Czerny, T., G. Schaffner, and M. Busslinger, *DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site*. Genes Dev, 1993. **7**(10): p. 2048-61.
224. Fitzsimmons, D., et al., *Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter*. Genes Dev, 1996. **10**(17): p. 2198-211.
225. Eberhard, D., et al., *Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family*. EMBO J, 2000. **19**(10): p. 2292-303.
226. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.

227. Laiosa, C.V., M. Stadtfeld, and T. Graf, *Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 705-38.
228. Nutt, S.L., et al., *Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus*. *Genes Dev*, 1997. **11**(4): p. 476-91.
229. Busslinger, M., *Transcriptional control of early B cell development*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 55-79.
230. Miller, J.P., et al., *The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7*. *J Exp Med*, 2002. **196**(5): p. 705-11.
231. Cobaleda, C., et al., *Pax5: the guardian of B cell identity and function*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(5): p. 463-70.
232. Nutt, S.L., et al., *Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 556-62.
233. Nutt, S.L., et al., *Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments*. *EMBO J*, 1998. **17**(8): p. 2319-33.
234. Rolink, A.G., et al., *Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 603-6.
235. Cobaleda, C., W. Jochum, and M. Busslinger, *Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors*. *Nature*, 2007. **449**(7161): p. 473-7.
236. Delogu, A., et al., *Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells*. *Immunity*, 2006. **24**(3): p. 269-81.
237. Schebesta, A., et al., *Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 49-63.
238. Hesslein, D.G., et al., *Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 37-42.
239. Souabni, A., et al., *Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1*. *Immunity*, 2002. **17**(6): p. 781-93.
240. Gonda, H., et al., *The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression*. *J Exp Med*, 2003. **198**(9): p. 1427-37.

241. Nera, K.P., et al., *Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 283-93.
242. Lin, K.I., et al., *Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4771-80.
243. Collins, T., J.R. Stone, and A.J. Williams, *All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(11): p. 3609-15.
244. Wong, C.W. and M.L. Privalsky, *Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27695-702.
245. Cattoretti, G., et al., *BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells*. Blood, 1995. **86**(1): p. 45-53.
246. Allman, D., et al., *BCL-6 expression during B-cell activation*. Blood, 1996. **87**(12): p. 5257-68.
247. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. Science, 1997. **276**(5312): p. 589-92.
248. Ranuncolo, S.M., et al., *Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 705-14.
249. Phan, R.T., et al., *Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1132-9.
250. Scheeren, F.A., et al., *STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 303-13.
251. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.
252. Tarlinton, D., et al., *Plasma cell differentiation and survival*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 162-9.
253. Niu, H., B.H. Ye, and R. Dalla-Favera, *Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 1953-61.
254. Moriyama, M., et al., *BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo*. Oncogene, 1997. **14**(20): p. 2465-74.

255. Klein, U., et al., *Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 773-82.
256. Harris, M.B., et al., *Transcriptional repression of Stat6-dependent interleukin-4-induced genes by BCL-6: specific regulation of iepsilon transcription and immunoglobulin E switching*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7264-75.
257. Niu, H., G. Cattoretti, and R. Dalla-Favera, *BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 211-21.
258. Dorfman, D.M., et al., *In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4297-306.
259. Hsing, Y. and G.A. Bishop, *Requirement for nuclear factor-kappaB activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2804-11.
260. Cattoretti, G., et al., *Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 445-55.
261. Kearney, J.F. and A.R. Lawton, *B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes*. J Immunol, 1975. **115**(3): p. 671-6.
262. Shaffer, A.L., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 51-62.
263. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
264. Ozaki, K., et al., *Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5361-71.
265. Keller, A.D. and T. Maniatis, *Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression*. Genes Dev, 1991. **5**(5): p. 868-79.
266. Rousseau-Merck, M.F., et al., *The KOX zinc finger genes: genome wide mapping of 368 ZNF PAC clones with zinc finger gene clusters predominantly in 23 chromosomal loci are confirmed by human sequences annotated in Ensembl*. Cytogenet Genome Res, 2002. **98**(2-3): p. 147-53.
267. Keller, A.D. and T. Maniatis, *Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(5): p. 1940-9.

268. Huang, S., G. Shao, and L. Liu, *The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression.* J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 15933-9.
269. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells.* Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-20.
270. Randall, T.D., et al., *Interleukin-5 (IL-5) and IL-6 define two molecularly distinct pathways of B-cell differentiation.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 3929-36.
271. Angelin-Duclos, C., et al., *Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo.* J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5462-71.
272. Kuo, T.C., et al., *Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro.* J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 819-30.
273. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow.* J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1471-6.
274. Messika, E.J., et al., *Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development.* J Exp Med, 1998. **188**(3): p. 515-25.
275. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells.* Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
276. Early, P., et al., *Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways.* Cell, 1980. **20**(2): p. 313-9.
277. Tunyaplin, C., M.A. Shapiro, and K.L. Calame, *Characterization of the B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) gene, mRNA isoforms and basal promoter.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(24): p. 4846-55.
278. Vasanwala, F.H., et al., *Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene.* J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1922-9.
279. Neiman, P.E., et al., *Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6378-83.
280. Shaffer, A.L., et al., *XBPI1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation.* Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.

281. Iwakoshi, N.N., et al., *Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 321-9.
282. Cattoretti, G., et al., *PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage*. J Pathol, 2005. **206**(1): p. 76-86.
283. Kallies, A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 466-74.
284. Martins, G.A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 457-65.
285. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
286. Abdalla, S.A., et al., *Molecular study on chicken tumor necrosis factor receptor-II and tumor necrosis factor receptor-associated factor-5*. Vet Immunol Immunopathol, 2004. **98**(1-2): p. 31-41.
287. Boissy, P., O. Destaing, and P. Jurdic, *RANKL induces formation of avian osteoclasts from macrophages but not from macrophage polykaryons*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(2): p. 340-6.
288. Reddy, S.K., et al., *The BAFF-Interacting receptors of chickens*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1076-87.
289. Buerstedde, J.M., et al., *Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line*. EMBO J, 1990. **9**(3): p. 921-7.
290. Compton, M.M. and H.M. Waldrip, *Endogenous activation of apoptosis in bursal lymphocytes: inhibition by phorbol esters and protein synthesis inhibitors*. Cell Immunol, 1998. **184**(2): p. 143-52.
291. Takata, M., Y. Homma, and T. Kurosaki, *Requirement of phospholipase C-gamma 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 907-14.
292. Segui, B., et al., *CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37251-8.
293. Heath, A.W., et al., *Antibodies to murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells*. Cell Immunol, 1993. **152**(2): p. 468-80.
294. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
295. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the*

- response of T cells to stimulation.* J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 459-65.
296. Walunas, T.L., et al., *CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation.* Immunity, 1994. **1**(5): p. 405-13.
297. Van Gool, S.W., et al., *CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model.* Immunol Rev, 1996. **153**: p. 47-83.
298. Roy, M., et al., *Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses.* Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 596-603.
299. Nagafuchi, H., et al., *Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus.* Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(1): p. 71-7.
300. Greene, J.L., et al., *Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions.* J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26762-71.
301. Orabona, C., et al., *CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86.* Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1134-42.
302. Suvas, S., et al., *Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7766-75.
303. Bhatia, S., et al., *B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties.* Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 70-5.
304. Pentcheva-Hoang, T., et al., *B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse.* Immunity, 2004. **21**(3): p. 401-13.
305. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse and CD28-CD80 interactions.* Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1159-66.
306. Linsley, P.S., et al., *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.* J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 721-30.
307. Thompson, C.B., et al., *CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1333-7.
308. Fallarino, F., P.E. Fields, and T.F. Gajewski, *B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28.* J Exp Med,

1998. **188**(1): p. 205-10.
309. Hirokawa, M., et al., *Transmembrane signaling through CD80 (B7-1) induces growth arrest and cell spreading of human B lymphocytes accompanied by protein tyrosine phosphorylation*. Immunol Lett, 1996. **50**(1-2): p. 95-8.
310. Tangye, S.G., et al., *Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 686-94.
311. Commins, S., J.W. Steinke, and L. Borish, *The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1108-11.
312. Donnelly, R.P., et al., *The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 314-21.
313. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 165-90.
314. Spits, H. and R. de Waal Malefyt, *Functional characterization of human IL-10*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **99**(1): p. 8-15.
315. Walter, M.R. and T.L. Nagabhushan, *Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold*. Biochemistry, 1995. **34**(38): p. 12118-25.
316. Liu, Y., et al., *Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1821-9.
317. Donnelly, R.P., H. Dickensheets, and D.S. Finbloom, *The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(6): p. 563-73.
318. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
319. Staples, K.J., et al., *IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4779-85.
320. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
321. Platzer, C., H.D. Volk, and M. Platzer, *5' noncoding sequence of human IL-10 gene obtained by oligo-cassette PCR walking*. DNA Seq, 1994. **4**(6): p. 399-401.
322. Platzer, C., et al., *Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells*. J

- Neuroimmunol, 2000. **105**(1): p. 31-8.
323. Platzer, C., et al., *Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs*. Int Immunol, 1995. **7**(4): p. 517-23.
324. Herbeuval, J.P., et al., *Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4630-6.
325. Williams, L.M., et al., *Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle*. Immunology, 2004. **113**(3): p. 281-92.
326. Schottelius, A.J., et al., *Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 31868-74.
327. Ito, S., et al., *Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1456-63.
328. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
329. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
330. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 297-322.
331. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *How diverse--CD4 effector T cells and their functions*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 20-36.
332. O'Garra, A. and P. Vieira, *T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 425-8.
333. Fillatreau, S., D. Gray, and S.M. Anderton, *Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 391-7.
334. Clarke, C.J., et al., *IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1719-26.
335. Brown, C.Y., et al., *Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20108-12.

336. Gazzinelli, R.T., et al., *IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1792-6.
337. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
338. Mocellin, S., et al., *The dual role of IL-10*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 36-43.
339. Ding, L., et al., *IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1224-34.
340. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
341. Demangel, C., P. Bertolino, and W.J. Britton, *Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production*. Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 994-1002.
342. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
343. Bettelli, E., et al., *IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3299-306.
344. Feng, C.G., et al., *Transgenic mice expressing human interleukin-10 in the antigen-presenting cell compartment show increased susceptibility to infection with Mycobacterium avium associated with decreased macrophage effector function and apoptosis*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6672-9.
345. Groux, H., et al., *A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1723-9.
346. Saeland, S., et al., *Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 113-20.
347. Fluckiger, A.C., et al., *Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1473-81.
348. Itoh, K. and S. Hirohata, *The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4341-50.
349. Levy, Y. and J.C. Brouet, *Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal*

- center B cells by induction of the *bcl-2* protein. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 424-8.
350. Hu, B.T. and R.A. Insel, *Up-regulation of telomerase in human B lymphocytes occurs independently of cellular proliferation and with expression of the telomerase catalytic subunit*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(11): p. 3745-53.
351. Go, N.F., et al., *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells*. *J Exp Med*, 1990. **172**(6): p. 1625-31.
352. Rousset, F., et al., *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1890-3.
353. Fecteau, J.F., A. Roy, and S. Neron, *Peripheral blood CD27(+) IgG(+) B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction*. *Immunology*, 2008.
354. Coffman, R.L., et al., *The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation*. *Immunol Rev*, 1988. **102**: p. 5-28.
355. Purkerson, J. and P. Isakson, *A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching*. *FASEB J*, 1992. **6**(14): p. 3245-52.
356. Malisan, F., et al., *Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 937-47.
357. Defrance, T., et al., *Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A*. *J Exp Med*, 1992. **175**(3): p. 671-82.
358. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 709-60.
359. Gantner, F., et al., *CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(6): p. 1576-85.
360. Rousset, F., E. Garcia, and J. Banchereau, *Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen*. *J Exp Med*, 1991. **173**(3): p. 705-10.
361. Minges Wols, H.A., et al., *The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity*. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4213-21.
362. Rothwell, L., et al., *Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima**. *J Immunol*, 2004. **173**(4): p. 2675-82.

363. Kaiser, P., et al., *Evolution of the interleukins*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 375-94.
364. Kaiser, P., H.M. Wain, and L. Rothwell, *Structure of the chicken interferon-gamma gene, and comparison to mammalian homologues*. Gene, 1998. **207**(1): p. 25-32.
365. Tone, M., et al., *IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 286-91.
366. Benjamin, D., T.J. Knobloch, and M.A. Dayton, *Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10*. Blood, 1992. **80**(5): p. 1289-98.
367. O'Garra, A., et al., *Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10*. Int Immunol, 1990. **2**(9): p. 821-32.
368. Bazan, J.F., *Emerging families of cytokines and receptors*. Curr Biol, 1993. **3**(9): p. 603-6.
369. Foster, C.B., et al., *An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2562-7.
370. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.
371. Hibi, M., et al., *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
372. Horn, F., C. Henze, and K. Heidrich, *Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function*. Immunobiology, 2000. **202**(2): p. 151-67.
373. Murakami, M., et al., *IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase*. Science, 1993. **260**(5115): p. 1808-10.
374. Hirano, T., et al., *Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2)*. Immunol Lett, 1988. **17**(1): p. 41-5.
375. Suematsu, S., et al., *Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 232-5.
376. Gauldie, J., et al., *Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7251-5.

377. Luheshi, G. and N. Rothwell, *Cytokines and fever*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(4): p. 301-7.
378. LeMay, L.G., A.J. Vander, and M.J. Kluger, *Role of interleukin 6 in fever in rats*. Am J Physiol, 1990. **258**(3 Pt 2): p. R798-803.
379. Shabo, Y., et al., *The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6*. Blood, 1988. **72**(6): p. 2070-3.
380. Hirano, T., et al., *Biological and clinical aspects of interleukin 6*. Immunol Today, 1990. **11**(12): p. 443-9.
381. Fabry, Z., et al., *Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes*. J Neuroimmunol, 1993. **47**(1): p. 23-34.
382. Benveniste, E.N., *Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action*. Am J Physiol, 1992. **263**(1 Pt 1): p. C1-16.
383. Ishihara, K. and T. Hirano, *IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 357-68.
384. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
385. Takatsu, K., et al., *T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties*. Immunol Rev, 1988. **102**: p. 107-35.
386. Choe, J. and Y.S. Choi, *IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 508-15.
387. Chen-Kiang, S., *Regulation of terminal differentiation of human B-cells by IL-6*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **194**: p. 189-98.
388. Wen, X.Y., et al., *Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells*. Int J Oncol, 1999. **15**(1): p. 173-8.
389. Vanden Bush, T.J. and G.A. Bishop, *TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(2): p. 400-9.
390. Matthes, T., C. Werner-Favre, and R.H. Zubler, *Cytokine expression and regulation of human plasma cells: disappearance of interleukin-10 and persistence of transforming growth factor-beta 1*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 508-12.
391. Roldan, E., A. Garcia-Pardo, and J.A. Brieva, *VLA-4-fibronectin interaction is*

- required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med*, 1992. **175**(6): p. 1739-47.
392. Vernino, L., et al., *Generation of nondividing high rate Ig-secreting plasma cells in cultures of human B cells stimulated with anti-CD3-activated T cells*. *J Immunol*, 1992. **148**(2): p. 404-10.
393. Klein, B. and R. Bataille, *Cytokine network in human multiple myeloma*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1992. **6**(2): p. 273-84.
394. Jourdan, M., et al., *Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor I*. *Cell Death Differ*, 2000. **7**(12): p. 1244-52.
395. Suematsu, S., et al., *IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(19): p. 7547-51.
396. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. *Nature*, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
397. Schneider, K., et al., *Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(15): p. 4200-6.
398. Kaiser, P., et al., *The chicken proinflammatory cytokines interleukin-1beta and interleukin-6: differences in gene structure and genetic location compared with their mammalian orthologues*. *Anim Genet*, 2004. **35**(3): p. 169-75.
399. Geissen, M., et al., *The specification of sympathetic neurotransmitter phenotype depends on gp130 cytokine receptor signaling*. *Development*, 1998. **125**(23): p. 4791-801.
400. Van Snick, J., et al., *Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(24): p. 9679-83.
401. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. *Cell*, 1979. **18**(2): p. 375-90.
402. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
403. DuBridg, 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.
404. Klaas, R., *Charakterisierung der biologischen Aktivität von*

*Hühner Interleukin-6 und erste Untersuchungen*

zum Toll-like Rezeptor-System des Huhnes, in Institut für Tierphysiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung. 2003, LMU: München.

405. 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.
406. 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.
407. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 375-80.
408. 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.
409. 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.
410. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
411. Hirano, A., W.C. Brown, and D.M. Estes, *Cloning, expression and biological function of the bovine CD40 homologue: role in B-lymphocyte growth and differentiation in cattle*. Immunology, 1997. **90**(2): p. 294-300.
412. Takamatsu, H., et al., *Establishment of long-term CD154-dependent porcine B-cell cultures*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 211-8.
413. Le Douarin, N.M., E. Houssaint, and F. Jotereau, *Differentiation of the primary lymphoid organs in avian embryos: origin and homing of the lymphoid stem cells*. Adv Exp Med Biol, 1977. **88**: p. 29-37.
414. Le Douarin, N.M., et al., *Ontogeny of the avian thymus and bursa of Fabricius studied in interspecific chimeras*. Ann Immunol (Paris), 1976. **127**(6): p. 849-56.
415. Winding, P. and M.W. Berchtold, *The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments*. J Immunol Methods, 2001. **249**(1-2): p. 1-16.
416. 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.
417. Wallis, J.W., et al., *A physical map of the chicken genome*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 761-4.

418. Grandien, A., A. Bras, and C. Martinez, *Acquisition of CD40 expression during murine B-cell differentiation*. Scand J Immunol, 1996. **43**(1): p. 47-55.
419. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot, *A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2060-3.
420. Kaufman, J., P.J. Sime, and R.P. Phipps, *Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1862-71.
421. Yellin, M.J., et al., *Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1857-64.
422. Burdin, N., et al., *Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2533-44.
423. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S2.
424. Morgenroth, I., *Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns*, in *Institut für Tierphysiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung*. 2007, LMU: München.
425. Spriggs, M.K., et al., *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1543-50.
426. Avery, S., et al., *Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(10): p. 600-10.
427. Leclercq, L., et al., *Supernatant from a cloned helper T cell stimulates most small resting B cells to undergo increased I-A expression, blastogenesis, and progression through cell cycle*. J Immunol, 1986. **136**(2): p. 539-45.
428. Enbergs, H., ed. *Die Feinstruktur der Leukozyten des Hausgeflügels*. Fortschritte der Veterinärmedizin. Vol. 22. 1975, Verlag Paul Parey: Berlin und Hamburg.
429. Fairfax, K.A., et al., *Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches*. Semin Immunol, 2008. **20**(1): p. 49-58.
430. Mansikka, A., et al., *B cell maturation in the chicken Harderian gland*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1826-33.
431. Urashima, M., et al., *CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation*. Leuk Res, 1996. **20**(6): p. 507-15.

- 
432. Splawski, J.B. and P.E. Lipsky, *Cytokine regulation of immunoglobulin secretion by neonatal lymphocytes*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 967-77.

## 10 Anhang

### Verwendete Chemikalien und Reagenzien

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

- 1 Applichem, Darmstadt
- 2 Biochrom, Berlin
- 3 Ratiopharm, Ulm
- 4 Invitrogen, Karlsruhe
- 5 Roche, Grenzach-Wyhlen
- 6 Sigma, Deisenhofen
- 7 Macherey-Nagel, Düren
- 8 Solis BioDyne, Tartur, Estland
- 9 Fermentas, St. Leon-Rot
- 10 MWG, Ebersberg.
- 11 Roth, Karlsruhe
- 12 Promega, Mannheim
- 13 Biontex, München
- 14 Millipore, Billerica, USA
- 15 Schleicher und Schuell, Dasseln
- 16 BioRad, München
- 17 Uptima, Montluçon, France
- 18 Dianova, Hamburg
- 19 Nunc, Wiesbaden
- 20 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham/USA
- 21 Miltenyi, Bergisch Gladbach
- 22 Peqlab, Erlangen
- 23 Merck, Darmstadt
- 24 Qiagen, Hilden
- 25 Amersham/GE Healthcare, München
- 26 Polysciences, Eppelheim
- 27 Honeywell Riedel-de-Haën, Seelze
- 28 Plano GmbH, Wetzlar
- 29 Freundlicherweise von Dr. K. Schneider, Institut für Virologie, Universität Freiburg zur Verfügung gestellt
- 30 Freundlicherweise von Dr. J. Young, Institute of Animal Health, Compton, UK zur Verfügung gestellt
- 31 Freundlicherweise von Dr. K. Hala, Institut für Pathologie, Universität Innsbruck, Österreich zur Verfügung gestellt
- 32 Calbiochem, La Jolla, Canada
- 33 SDT, Baesweiler
- 34 Sanquin, Amsterdam, Niederlande
- 35 KPL, Gaithersburg, USA
- 36 Jackson, Baltimore, USA
- 37 Bethyl, Montgomery, USA
- 38 Becton Dickinson, Heidelberg

**Geräte in alphabetischer Reihenfolge:**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	TV-300	Memmert, Schwabach
Brutschrank für Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
	Software: CellQuest, FlowJo	
ELISA Washer	Atlantis 2	Asys, Dornstadt
ELISPOT-Reader	AID ELISpot-Reader ELHR 03	AID GmbH, Straßberg
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, München
Gel Dokumentation	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
	Software: Image Quant Capture 300	
Harvester	Omnifilter-96 Harvester	PerkinElmer, Monza, Italien
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Inkubatorschüttler	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Mikroskop	Axiovert 25 HBO-50/AC	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Peristaltische Pumpe	Perstaltic Pump P-1	Pharmacia
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Plattenschüttler	Titertek	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
Sicherheitswerkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Szintillationsmessgerät	TopCount, 6-Detector, 96-well	Perkin Elmer, Monza, Italien
Thermocycler	MJ Mini	BioRad, München
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Köln
Transmissions- Elektronenmikroskop	EM902	Zeiss, Jena
Ultramikrotom	Ultracut E	Leica, Wetzlar
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	4K15C	Sigma, Osterode

## 10.1 Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stets freundliche und hervorragende fachliche Betreuung. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Sonja Kothlow für die fachliche Betreuung bedanken.

Nur durch ihre kollegiale Zusammenarbeit und fachliche Kompetenz konnte diese Arbeit gelingen.

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

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die Gewährung des Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 1029, „Functional Genome Research in Veterinary Medicine“.

Ganz herzlich möchte ich mich für die freundliche Betreuung in bürokratischen Angelegenheiten bei Frau Angelika Kammerer bedanken. Auch allen lehrenden Mitgliedern des Graduiertenkollegs möchte ich für die hervorragende Ausbildung, allen Mitstipendiaten für die freundliche Atmosphäre untereinander danken.

Für die stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich ganz herzlich bei Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl, Marina Kohn und Ramona Schmitt bedanken. Euch ist es zu verdanken, dass ich diese Vielzahl an Labor-Techniken erlernen durfte. Vielen Dank dass ihr immer ein offenes Ohr hattet, für Probleme aller Art. Auch Susanne Schwarz möchte ich danken für die gründliche Einarbeitung in die q-PCR-Technik. Birgit Viertböck möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Einarbeitung in die Zytospin-Technik danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Sven Reese und Annette Müller für die nette Betreuung bei der Herstellung der Präparate für die elektronenmikroskopische Analyse.

Für die Betreuung der Tiere danke ich Herrn Fritz Meggendorfer, Hedwiga Opitz und Thomas Hoschka.

Auch bei den Doktoranden unserer Arbeitsgruppe und allen anderen Doktoranden des Instituts möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an die Rechnerbetriebsgruppe, die mir bei vielen technischen Problemen weiterhelfen konnte und die meinen Rechner und mich bestimmt nicht so schnell vergessen werden.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir immer alle Optionen offen liessen und durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium erst ermöglichten. Auch meinen beiden Schwestern Karin und Evelyn möchte ich danken, dass sie mich immer in meinem Tun bestärkt haben. Danken möchte ich auch Ingrid Nägele deren Optimismus durch nichts zu überbieten ist und die fest an mich glaubt. Ganz besonders danken möchte ich Chris Gahr der immer ein offenes Ohr hatte für die kleinen und scheinbar großen Probleme, und der mich immer wieder in meinem Tun bestärkt und motiviert hat.