

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

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

Untersuchungen zur Rolle von CXCR4 und CXCR5 in der B-Zellentwicklung beim Huhn

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

von
Florian Christopher Busalt
aus Eberbach

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbelt
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs

Tag der Promotion: 09.02.2012

Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés

(Louis Pasteur)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	B-Zellen beim Säuger	4
2.1.1	Die Charakteristika einer B-Zelle	4
2.1.2	Von der hämatopoetischen Stammzelle zur Plasmazelle	5
2.2	B-Zellen beim Huhn	8
2.2.1	Die Bursa Fabricii als zentrales Organ der B-Zell-Reifung beim Huhn	9
2.2.2	Die frühe Kolonisierung der Bursa	10
2.2.3	B-Zellen in der Bursa Fabricii	11
2.2.4	Postbursale B-Zellen besiedeln die Peripherie	12
2.3	Chemotaxis bei Leukozyten	14
2.3.1	Chemotaktisch wirksame Stoffe	14
2.3.2	Chemokine und ihre Rezeptoren	15
2.3.2.1	Systematik der Chemokine	15
2.3.2.2	Chemokinrezeptoren.....	18
2.3.2.3	Atypische Chemokinrezeptoren.....	20
2.3.2.4	Regulation der Chemokinrezeptor-Aktivität	21
2.3.3	Folgen der Interaktion zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren	22
2.3.3.1	Chemokin-induzierte Signale	22
2.3.3.2	Polarisation von Zellen als Grundlage der Migration.....	22
2.3.3.3	Chemokine aktivieren Integrine	24
2.3.3.4	Rezeptor-Desensitivierung und Internalisierung nach Ligandenbindung	25
2.4	Die homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13.....	26
2.4.1	CXCL12 und CXCR4.....	26
2.4.2	CXCL13 und CXCR5.....	28
2.4.3	Organogenese unter dem Einfluss homöostatischer Chemokine	28
2.4.4	Die Germinale Zentrums-Reaktion unter dem Einfluss homöostatischer Chemokine	29
2.5	Chemokine und Chemokinrezeptoren beim Huhn.....	30
2.5.1	CXCL12 und CXCR4 beim Huhn	31
2.5.2	CXCR5 und die drei CXCL13-Isoformen beim Huhn	32
3	ZIELSETZUNG.....	33
4	MATERIAL UND METHODEN.....	34
4.1	Tiere und Tierhaltung	34
4.1.1	Hühner	34
4.1.2	Mäuse	34
4.2	Gewinnung primärer Leukozyten.....	34
4.2.1	Gewinnung von Leukozyten aus dem Blut.....	35
4.2.1.1	Gewinnung peripherer Blutleukozyten mittels Slow-Speed-Zentrifugation.....	35
4.2.1.2	Gewinnung peripherer Blutleukozyten mittels Dichtegradient-Zentrifugation	35

4.2.2	Gewinnung von Leukozyten aus Organen.....	35
4.2.2.1	Gewinnung von Leukozyten aus Milz, Bursa und Thymus adulter Hühner.....	36
4.2.2.2	Gewinnung von Leukozyten aus Caecaltonsillen.....	36
4.2.2.3	Gewinnung von Leukozyten aus dem Knochenmark.....	36
4.2.2.4	Gewinnung von Leukozyten aus embryonalen Organen.....	37
4.2.3	Qualitative und quantitative mikroskopische Beurteilung der Leukozyten.....	37
4.3	Zellkultur.....	37
4.3.1	Medien und Zusätze.....	37
4.3.2	Verwendete Zelllinien.....	39
4.3.3	Kultivierung primärer Zellen.....	39
4.3.4	Einfrieren von Zellen.....	39
4.3.5	Auftauen von Zellen.....	39
4.4	RNA-Präparation.....	40
4.4.1	Bestimmung der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer.....	41
4.5	cDNA-Synthese.....	41
4.6	Erstellen von Primern.....	41
4.6.1	Primer für die konventionelle PCR.....	42
4.6.2	Primer für die quantitative PCR.....	42
4.7	Polymerase Kettenreaktion.....	43
4.7.1	Polymerase Kettenreaktion mittels <i>Phusion Hot Start II Polymerase</i>	43
4.7.2	Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion.....	44
4.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
4.9	DNA-Aufreinigung.....	46
4.10	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen.....	46
4.11	Klonierung.....	46
4.11.1	Klonierung mittels Ligation nach Restriktions-Endonuklease-Verdau.....	46
4.11.1.1	Dephosphorylierung mittels FastAP.....	46
4.11.1.2	Ligationsreaktion.....	47
4.11.1.3	Klonierung von chCXCR4 in PCR3-HA-FLAG.....	47
4.11.1.4	Klonierung von chCXCR5 in p3XFLAG-myc-CMV25.....	48
4.11.1.5	Klonierung von chCXCL12a in pcIpac.....	48
4.11.2	TOPO-Klonierung mittels <i>CT-GFP Fusion TOPO@TA Expression Kit</i>	49
4.11.2.1	Klonierung von chCXCR4.....	49
4.12	Transformation von Bakterien.....	50
4.12.1	Transformation von JM109.....	50
4.12.2	Transformation von TOP10.....	51
4.13	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen.....	51
4.14	Erfolgskontrolle der Ligation.....	52
4.15	Eukaryotische Expression rekombinanter Proteine.....	52
4.15.1	Transiente Transfektion von HEK-293-T-Zellen.....	52
4.15.2	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen.....	53
4.16	Erzeugung monoklonaler Maus-Antikörper.....	53
4.16.1	Immunisierung von Balb/c-Mäusen.....	53
4.16.2	Zellfusion.....	54

4.16.3	Screening der Hybridom-Überstände	55
4.16.4	Subklonierung und Isotyp-Bestimmung	55
4.16.5	Sammeln von Antikörper-haltigen Hybridom-Überständen	55
4.16.6	Chromatografische Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	56
4.17	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	57
4.17.1	Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern.....	58
4.17.2	Indirekte Färbungen.....	58
4.17.3	Mehrfachfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps.....	59
4.17.4	Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD.....	60
4.18	Fluoreszenz-Histologie	60
4.19	CXCR4-Bindungs-Assays	61
4.19.1	AMD3100 und huCXCL12a	61
4.20	Calciumflux-Assays	61
4.21	Chemotaxis-Assays	63
4.22	Statistische Auswertung	65
5	ERGEBNISSE	67
5.1	chCXCR4	67
5.1.1	Expression von chCXCR4 und chCXCL12 im Verlauf der Ontogenese.....	67
5.1.2	Erzeugung eines monoklonalen anti-chCXCR4-Antikörpers.....	68
5.1.3	Transfektion von HEK-293-T-Zellen mit chCXCR4	68
5.1.4	Zellfusion und Test der Hybridom-Überstände	69
5.1.5	chCXCR4 Expression auf B-Zellen während der Ontogenese	71
5.1.6	chCXCR4-Expression auf B-Zellen von Hühnern mit ausgereiftem Immunsystem	72
5.1.6.1	Phänotypisierung der B-Zellen aus der Bursa	74
5.1.6.2	Die Expression von chCXCR4 in kryo-histologischen Bursa-Präparaten.....	77
5.1.6.3	Phänotypisierung der B-Zellen aus den Caecaltonsillen.....	77
5.1.6.4	Phänotypisierung der B-Zellen aus der Milz	78
5.1.6.5	chCXCR4-Expression auf chCD40L-stimulierten primären Hühnerleukozyten.....	80
5.1.7	chCXCR4-Expression auf weiteren Zellen des Hühner-Immunsystems	81
5.1.8	chCXCR4-Expression auf Thymozyten	83
5.1.9	chCXCR4-Expression auf Zelllinien.....	84
5.2	Rezeptor/Ligand-Interaktion zwischen chCXCR4 und CXCL12	84
5.2.1	Messung des Calciumeinstroms nach Bindung potentieller chCXCR4-Liganden	85
5.2.1.1	Messung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration nach Ligandenbindung	85
5.2.1.2	Hemmung der CXCL12a/chCXCR4-Interaktion	87
5.2.2	Effekt der CXCL12/chCXCR4-Interaktion auf die chCXCR4-Expression.....	89
5.2.2.1	huCXCL12a-Bindung führt zu einer Internalisierung von chCXCR4.....	89
5.2.3	Chemotaxis-Assays	90
5.2.3.1	Chemotaxis von DT40-Zellen mit huCXCL12a und chCXCL12a.....	90
5.2.3.2	Chemotaxis primärer Hühnerleukozyten	92
5.2.3.3	Inhibition der CXCL12-bedingten Migration.....	93
5.3	chCXCR5	95
5.3.1	Expression von chCXCR5 und der chCXCL13-Isoformen während der Ontogenese	95
5.3.2	Erstellung einer stabil chCXCR5-exprimierenden Zelllinie	97

5.3.3	Zellfusion und Test der Hybridomüberstände	98
5.3.4	chCXCR5-Expression auf B-Zellen in Milz und Bursa während der Ontogenese	99
5.3.5	chCXCR5-Expression auf B-Zellen im Gewebe adulter Hühner	100
5.3.5.1	Bursa.....	101
5.3.5.2	Blut	102
5.3.5.3	Milz	103
5.3.5.4	chCXCR5-Expression auf B-Zellen der Caecaltonsillen.....	104
5.3.6	chCXCR5-Expression auf anderen Zellen des Immunsystems des Huhnes	107
5.3.6.1	Expression von chCXCR5 auf chCD4 ⁺ und chCD8 ⁺ Zellen	107
5.3.6.2	Thymozyten.....	108
5.3.6.3	Expression von chCXCR5 auf Kul01 ⁺ Zellen	109
6	DISKUSSION.....	110
6.1	Die Expression von chCXCR4 auf B-Zellen und die Interaktion mit CXCL12.....	111
6.1.1	chCXCL12 und chCXCR4 während der Ontogenese.....	111
6.1.2	Die Expression von chCXCR4 auf bursalen B-Zellen	112
6.1.3	Die Expression von chCXCR4 auf postbursalen B-Zellen.....	114
6.1.4	Funktionelle Untersuchungen der CXCL12/CXCR4-Interaktion.....	115
6.2	Die Expression von chCXCR5 auf B-Zellen und chCXCL13	116
6.2.1	chCXCL13 und chCXCR5 während der B-Zell-Ontogenese	116
6.2.2	Die Expression von chCXCR5 auf bursalen B-Zellen	117
6.2.3	Die Expression von chCXCR5 auf postbursalen B-Zellen.....	118
6.3	chCXCR4 und chCXCR5 auf T-Zellen und Zellen der myeloiden Reihe	122
6.4	Mögliche Rollen von chCXCR4 und chCXCR5.....	122
6.5	Ausblick.....	124
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	127
8	SUMMARY.....	129
9	LITERATURVERZEICHNIS	131
10	ANHANG	152
11	LEBENS LAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
12	DANKSAGUNG	155

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Bursa während der Ontogenese	11
Abbildung 2: Der typische Aufbau eines Chemokins und seines Rezeptors.....	17
Abbildung 3: Signalkaskaden nach Chemokinrezeptor-Aktivierung (zusammengetragen aus [184-186]).....	23
Abbildung 4: <i>Inside-Out-Signalling</i> aktiviert Integrine (modifiziert nach [187]).....	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Transwell-Migrations-Assays	64
Abbildung 6: Untersuchung der Expression von chCXCR4 und chCXCL12 in Milz und Bursa zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten	67
Abbildung 7: Expression von chCXCR4-GFP und FLAG-chCXCR4 in HEK-293-T	69
Abbildung 8: Screening und Nachweis der Spezifität der chCXCR4-Hybridom-Überstände	70
Abbildung 9: chCXCR4-Expression auf B-Zellen während der Ontogenese	72
Abbildung 10: chCXCR4-Expression auf B-Zellen unterschiedlicher lymphatischer Gewebe.....	73
Abbildung 11: B-Zell-Rezeptor- und chCXCR4-Expression auf bursalen B-Zellen	74
Abbildung 12: MHCII- und chCXCR4-Expression auf bursalen B-Zellen	75
Abbildung 13: chL12 (OV)- und chCXCR4-Expression auf B-Zellen aus Bursa und Blut.....	76
Abbildung 14: Die Lokalisation der chCXCR4-Expression in der Bursa.....	77
Abbildung 15: Phänotypisierung von B-Zellen aus Caecaltonsillen.....	78
Abbildung 16: Phänotypisierung von B-Zellen aus der Milz.....	79
Abbildung 17: chCXCR4-Phänotyp von Hühnerlymphozyten in chCD40L-stimulierten Kurzzeitkulturen	80
Abbildung 18: chCXCR4-Expression auf T-Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe	81
Abbildung 19: chCXCR4-Expression auf Kul01 ⁺ Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe.....	82
Abbildung 20: chCXCR4-Expression auf Thymozyten.....	83
Abbildung 21: chCXCR4-Expression auf Hühner-Leukozyten-Linien	84
Abbildung 22: Durchflusszytometrische Untersuchung des Calcium-Einstroms in DT40-Zellen nach Bindung verschiedener Liganden	86
Abbildung 23: Calciumflux-Hemmung durch AMD3100 und anti-chCXCR4.....	88
Abbildung 24: Bindungsvermögen eines anti-chCXCR4-Antikörpers nach Inkubation mit potentiellen chCXCR4-Liganden.....	89
Abbildung 25: Chemotaxis von DT40-Zellen in Richtung verschiedener Konzentrationen von huCXCL12a und chCXCL12a	91
Abbildung 26: Chemotaxis-Verhalten primärer B-Zellen aus unterschiedlichen lymphatischen Organen.....	92
Abbildung 27: Chemotaxis von T-Zellen aus Bursa, Milz und Blut.....	93
Abbildung 28: Hemmung der huCXCL12a-bedingten Migration von DT40-Zellen mittels AMD3100 und anti-chCXCR4-Antikörper	94
Abbildung 29: Expression von chCXCR5, chCXCL13 L1, chCXCL13 L2 und chCXCL13 L3 während der Ontogenese.....	96
Abbildung 30: Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen mit 3XFLAG-chCXCR5	97
Abbildung 31: Durchflusszytometrische Untersuchung der Hybridom-Überstände aus der chCXCR5-Fusion... 98	
Abbildung 32: Untersuchung der chCXCR5-Expression auf B-Zellen während der Ontogenese	99
Abbildung 33: chCXCR5-Expression auf B-Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe	101

Abbildung 34: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in der Bursa	102
Abbildung 35: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen im Blut.....	103
Abbildung 36: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in der Milz.....	104
Abbildung 37: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in den Caecaltonsillen	105
Abbildung 38: chCXCR5-Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen.....	107
Abbildung 39: chCXCR5-Expression auf Thymozyten.....	108
Abbildung 40: chCXCR5-Expression auf Kul01 ⁺ Zellen	109
Abbildung 41: Hypothese zur Chemokin-gesteuerten B-Zell-Wanderung	123

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften von B-Zellen und ihren Vorläufern während der frühen Entwicklung im Knochenmark (modifiziert nach LeBien [59])	7
Tabelle 2: Humane Chemokine, ihre Synonyme, Funktionen und Rezeptoren	19
Tabelle 3: verwendete Zelllinien.....	39
Tabelle 4: Klonierungsprimer	42
Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR	42
Tabelle 6: Protokoll der durchgeführten qRT-PCR	44
Tabelle 7: Konstrukte zur eukaryotischen Expression	52
Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper	58
Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper.....	59
Tabelle 10: Im Calciumflux-Assays eingesetzte potentielle chCXCR4-Liganden	63
Tabelle 11: Übersicht über Phänotypen der B-Zellen verschiedener lymphatischer Organe	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
AC	Adenylatcyclase
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
Akt	Syn.: Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	Aktivierendes Protein 1
APC	Allophycocyanin
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
BAFF	<i>B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BAFF-R	<i>B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family-receptor</i>
BCA-1	<i>B cell attracting chemokine-1</i>
bcl-6	<i>B cell lymphoma 6</i>
BCR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BLC	<i>B lymphocyte chemoattractant</i>
Blimp-1	<i>B lymphocyte maturation protein 1</i>
BLR1	Burkitt-Lymphom-Rezeptor-1
bp	Basenpaare
BRAK	breast and kidney cell chemokine
BSDC	Bursale Sekretorische Dendritische Zelle
Bu-1	Typ I Glykoprotein, identisch mit <i>chB6</i>
CALDAG-GEFI	<i>calcium diacylglycerol nucleotide exchange factor 1</i>
CCL	CC-Chemokin
CCR	Rezeptor für CC-Chemokine
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CD62L	CD62-Ligand
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ch	<i>chicken</i>
chCAF	<i>chicken chemotactic and angiogenic factor</i>
chL12	<i>chicken L12</i>
c-Jun	Zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-Jun (von jap. <i>Ju-nana</i> für 17, da aus aviärem Sarkomavirus-17)
c-kit	Zelluläres Homolog des viralen Onkogens c-kit (von engl. <i>kitten</i> , da in Katzensarkomvirus entdeckt)
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CRAC	<i>calcium release activated calcium channel</i>
CREP	<i>cAMP-response-element-binding protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL	CXC-Chemokin
CXCR	Rezeptor für CXC-Chemokin

DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'6'Diamidino-2-phenylindol
DARC	<i>duffy antigen receptor for chemokines</i>
DMC	<i>dendritic cell and monocyte chemokine-like protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOCK2	<i>dedicator of cytokinesis 2</i>
E2A	Transkriptionsfaktor E2-alpha
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ED	<i>Embryonic day</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELC	<i>EBI-1-ligand chemokine</i>
Elk	<i>eag-like kalium channel</i>
ENA-78	<i>epithelial neutrophil-activating protein 78</i>
ET	Embyonaltag
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoroisothiocyanat
FLAG-Tag	Oktapeptid als Epitop zum Nachweis
flt-3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
Fluo-4-AM	Fluo-4-acetoxymethylester
FSC	<i>forward scatter</i>
G418	Geneticin
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GC	Germinales Zentrum (<i>germinal center</i>)
GCP-2	<i>granulocyte chemotactic peptide-2</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRK	<i>G-protein-coupled receptor kinase</i>
Gro	<i>growth regulated oncogene</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HCC	<i>hemofiltrate CC-chemokine</i>
HEK-293	<i>human embryonic kidney-293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HEV	<i>high endothelial venule</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>

HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
HMGB-1	<i>high mobility group box-1</i>
HT	Hypoxanthin und Thymin
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
kDa	Kilo-Dalton
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IFE	Interfollikuläres Epithel
Ig	Immunglobulin
IL-12	Interleukin-12
IL-15	Interleukin-15
IL-16	Interleukin-16
IL-17	Interleukin-17
IL2	Intrazelluläre Schleife 2 (<i>intracellular loop 2</i>)
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor
IL-8	Interleukin-8
ILC	<i>interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP-10	<i>Interferon-inducible protein-10</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
LARC	<i>liver and activation regulated chemokine</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LESTR	<i>leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
Lin ⁻	<i>lineage negative</i>
L-Kette	Leichte Kette des Immunglobulins
LMPP	<i>lymphoid primed multipotent progenitor cell</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSL	<i>Lohmann's selected leghorn</i>
Lti	<i>lymphoid tissue inducer cell</i>
MadCAM-1	<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Max	<i>MY-associated factor X</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MDC	<i>macrophage-derived chemoattractant</i>
MDR15	<i>monocyte-derived receptor 15</i>
MEC	<i>mammary enriched chemokine</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHCII	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIG	<i>monokine induced by gamma-Interferon</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MPIF	<i>myeloid progenitor inhibitory factor</i>
MPP	Multipotente Progenitorzelle
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
mSos	<i>murine homologue of the Drosophila Son of sevenless gene</i>
NAP-2	<i>neutrophil-activating protein-2</i>

NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Notch	Gen benannt nach <i>Drosophila melanogaster</i> -Mutante mit gekerbten Flügeln (engl. <i>notches</i> = Kerben)
N-Terminus	Amino-Terminus
OV-Antigen	Syn.: chL12
PARC	<i>pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
PAPL	<i>purple acid phosphatase-like protein</i>
Pax5	<i>paired box protein 5</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBSF	<i>pre-B-cell growth stimulating factor</i> (heute CXCL12)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	<i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
PF4	<i>platelet factor-4</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase A
PNA _d	<i>peripheral node adressin</i>
pre-BCR	Pre-B-Zell-Rezeptor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pyk-2	Pyruvat-Kinase 2
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	Proteinkinase, benannt nach <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAG	<i>recombination activating gene</i>
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted</i>
Rap1	<i>ras-related protein 1</i>
RBE	<i>recent bursal emigrants</i>
RGS	<i>regulator of G-protein signalling</i>
RHOA	<i>Ras homolog family member</i>
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adaptor molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i>
SCF	Stammzell-Faktor (<i>stem cell factor</i>)
SCM	<i>single C motif-1</i>
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein</i>
sIgD	Oberflächliches Immunglobulin D
sIgM	Oberflächliches Immunglobulin M
SLC	<i>secondary lymphoid-tissue chemokine</i>

SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
Src	Tyrosinkinase; benannt nach sarcoma
Stat3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TARC	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
Tdt	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Thy1.1	<i>thymus cell antigen 1.1</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TM2	Transmembrandomäne 2
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
VAVI	<i>Vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>

1 EINLEITUNG

Leukozyten sind keine residenten Zellen, sondern müssen während ihrer Reifung und auch zur Erfüllung ihrer mannigfaltigen Effektor-Funktionen im Körper umherwandern. Sie migrieren allerdings nicht ziellos im Organismus, sondern werden bei ihrer Wanderung durch ein Netzwerk chemotaktisch wirksamer Substanzen geleitet. Die prominenteste Gruppe dieser Stoffe ist die Zytokin-Untergruppe der Chemokine. Dies sind kleine Proteine, die an spezielle Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Zellen binden und nachfolgend Signalkaskaden auslösen, welche unter anderem in eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens münden. Von den sogenannten inflammatorischen Chemokinen, deren Expression während entzündlicher Prozesse induziert wird, sind die homöostatischen Chemokine abzugrenzen. Diese werden konstitutiv exprimiert und sind unverzichtbar für die Entwicklung lymphatischer Strukturen während der Ontogenese und auch während immunologischer Reaktionen. Bei Maus und Mensch sind einige der Funktionen homöostatischer Chemokine und ihrer Rezeptoren mittlerweile gut charakterisiert.

Während der murinen Ontogenese wird die Wanderung von hämatopoetischen Stammzellen von ihrem Entstehungsort in der para-aortikalen Splanchnopleura über die fetale Leber ins Knochenmark durch Rezeptoren für homöostatische Chemokine gesteuert. CXCR4-exprimierende hämatopoetische Stammzellen werden nachgeburtlich durch hohe Konzentrationen des homöostatischen Chemokins CXCL12 im Knochenmark zurückgehalten. Das Chemokin CXCL13 wirkt nach der Auswanderung von B-Zellen aus dem Knochenmark stark anziehend auf diese Zellen, da sie den korrespondierenden Chemokinrezeptor CXCR5 auf ihrer Oberfläche tragen. Hierdurch ist CXCL13 essentiell an der physiologischen Ausprägung der B-Zell-Areale innerhalb der verschiedenen lymphatischen Gewebe beteiligt.

Auch die Leukozyten von Vögeln migrieren während der Ontogenese sowie während immunologischer Reaktionen in koordinierter Weise durch den Organismus. Während der Ontogenese des Huhnes entstehen hämatopoetische Stammzellen in der para-aortikalen Splanchnopleura. Deren Nachfolger wandern etwa ab ET7 als präbursale B-Zellen über die fetale Milz und das fetale Knochenmark in die Bursa ein. Die bursalen B-Zellen verbleiben zur Proliferation sowie zur Diversifizierung des Immunglobulin-Repertoires in diesem Organ und beginnen erst kurz nach dem Schlupf auszuwandern und die lymphatische Peripherie als postbursale B-Zellen zu besiedeln. Inzwischen wurden auch beim Huhn homöostatische

Chemokine sowie die zugehörigen Rezeptoren identifiziert und so liegt es nahe, dass diese die Migration von Leukozyten durch den Organismus lenken. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression der Chemokinrezeptoren chCXCR4 und chCXCR5 auf der Oberfläche von Hühner-Leukozyten mittels neu generierter monoklonaler Antikörper untersucht. Die so erlangten Informationen stellen eine Grundlage für weiterführende funktionelle Untersuchungen dar, in denen die Folgen einer Interaktion zwischen homöostatischen Chemokinen und den jeweiligen Chemokinrezeptoren vor dem Hintergrund der B-Zell-Migration durch den Organismus näher betrachtet werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

Schon zu Beginn ihres Auftretens während der Evolution mussten sich mehrzellige Lebewesen nicht nur vor Übergriffen von Fressfeinden schützen, sondern auch vor den Übergriffen verschiedenster Pathogene. Die Zellen dieser Organismen mussten nicht mehr omnipotent sein wie die der Einzeller. Vielmehr konnten diese sich differenzieren, um hochspezifische Aufgaben zu übernehmen. Erst hierdurch wurde es Mehrzellern ermöglicht, spezielle Organe für verschiedenste Aufgaben zu entwickeln. Das Organsystem, das für die Abwehr vor Übergriffen von Pathogenen auf den Mehrzeller-Organismus zuständig ist, ist das Immunsystem. Das Immunsystem verschiedener mehrzelliger Organismen kann sehr verschieden aufgebaut sein. Pflanzen und einfache tierische Mehrzeller schützen sich vor Pathogenen beispielsweise durch die Produktion und Sekretion von Defensinen [1, 2]. Insekten und Stachelhäuter entwickelten Toll- oder Toll-like-Rezeptoren (TLR) als membrangebundene, Pathogen-erkennende Rezeptoren [3, 4]. Das Immunsystem höherer Wirbeltiere ist funktionell in ein angeborenes und ein erworbenes Teilsystem untergliedert. Zum angeborenen Immunsystem werden unspezifische Abwehrmechanismen wie die Produktion antimikrobieller Peptide, die Expression von TLRs sowie die Phagozytose gezählt. Der Hauptmechanismus des adaptiven Immunsystems besteht hingegen vor allem in der Entwicklung von spezifischeren Pathogen-erkennenden Proteinen in Form von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren, die von Lymphozyten synthetisiert werden. Dieser Zelltyp tritt erstmals vor 500 Millionen Jahren mit der Entwicklung der ersten kiefertragenden Wirbeltiere auf [5].

Lymphozyten sehen bei lichtmikroskopischer Betrachtung recht einheitlich aus. Nach funktionellen und molekularbiologischen Untersuchungen dieser Zellen innerhalb der letzten 50 Jahre kann heute jedoch eine große Vielfalt an Lymphozyten-Subpopulationen differenziert werden. Eine grobe Klassifizierung stellt die Unterscheidung von T- und B-Zellen dar [6, 7]. T-Zellen durchlaufen große Teile ihrer Entwicklung im Thymus und sind vorwiegend für die sogenannte zelluläre Immunantwort zuständig. B-Zellen hingegen, deren Hauptaufgabe die humorale Immunantwort darstellt, entwickeln sich beim Säuger vor allem im Knochenmark, bei Vögeln in der später näher beschriebenen Bursa Fabricii. Die verschiedenen Lymphozyten sind keine Zellen, die dauerhaft unbeweglich an einer ortsfesten Lokalisation im Organismus residieren. Vielmehr müssen sie während ihrer Entwicklung sowie zur Immunüberwachung und zur Erfüllung ihrer Effektor-Funktionen innerhalb des Organismus umherwandern. In den

letzten Jahrzehnten wurde vor allem bei Maus und Mensch mit der Untersuchung der Mechanismen begonnen, die derartige Wanderungsprozesse bestimmen. So wurde bei diesen Spezies ein weitverzweigtes Netzwerk chemotaktisch wirksamer Substanzen entdeckt, die bei der Migration von Leukozyten sowohl während physiologischer als auch pathologischer Prozesse wichtige Rollen spielen.

2.1 B-Zellen beim Säuger

2.1.1 Die Charakteristika einer B-Zelle

Die für die humorale Immunabwehr verantwortlichen Lymphozyten sind die B-Zellen. Die Hauptfunktion dieser Lymphozyten-Population liegt in der Produktion von Immunglobulinen. Diese Antikörper-Moleküle wurden 1938 in der γ -Globulin-Fraktion von Serumproben beschrieben [8], 1948 erfolgte die Entdeckung der Antikörper-produzierenden B-Effektor-Zelle, der sogenannten Plasmazelle [9]. Das Hauptcharakteristikum im Phänotyp einer B-Zelle ist die Expression des B-Zell-Rezeptors, welcher eigentlich ein membrangebundenes Immunglobulin darstellt [10]. Jeder B-Zell-Klon hat einen eigenen, einzigartigen B-Zell-Rezeptor, der für die Erkennung eines einzigen spezifischen Antigens zuständig ist. Immunglobuline können also löslich, beispielsweise wie oben beschrieben im Serum, oder in membrangebundener Form vorliegen. Sie sind bilateral symmetrisch aufgebaut und bestehen aus je zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten [11, 12]. Das Gesamtmolekül besteht aus einem Isotyp-spezifischen konstanten Teil, welcher die verschiedenen Effektorfunktionen vermittelt, und einem variablen Teil, der für die Antigen-Erkennung zuständig ist. Die Immunglobulin-codierenden Gene bestehen aus verschiedenen Gensegmenten, die während der frühen B-Zellentwicklung in einem als Gen-Rearrangement bezeichneten Mechanismus in geordneter Abfolge zusammengelagert werden [13]. Für die schwere Kette existiert ein Pool aus V-, D-, und J-Segmenten, für die leichte Kette ein Pool aus V- und J-Segmenten. Aus diesen beiden Pools von DNA-Abschnitten wird für jeden Teil-Locus jeweils ein DNA-Segment zur Bildung des Gesamt-Immunglobulin-Gens ausgewählt. Hiernach werden diese V(D)J-Genabschnitte an einen Isotyp-spezifischen konstanten Genabschnitt gelagert. Bei Säuger-Spezies mit großen Pools an V-, D- und J-Segmenten, wie beispielsweise Maus und Mensch, entsteht bereits durch diesen Prozess ein großes Immunglobulin-Repertoire (kombinatorische Vielfalt), welches durch Ungenauigkeiten während des Zusammenfügens der verschiedenen DNA-Abschnitte nochmals diversifiziert wird (Verknüpfungs-Vielfalt). Spezies mit einer geringen Anzahl an vorgenannten DNA-Abschnitten, wie beispielsweise das Kaninchen, liefert das Gen-Rearrangement nur ein geringes

Immunglobulin-Repertoire. Daher nutzen diese zur Diversifizierung ihrer Immunglobulin-Vielfalt einen anderen Mechanismus, der als Genkonversion bezeichnet wird [14]. Hierbei wird nach dem Gen-Rearrangement ein Teil der variablen Region des Immunglobulin-Gens durch eines vieler vorhandener Pseudogene ersetzt, welches zuvor aus anderen Regionen des Genoms herausgeschnitten wurde. Auch beim Huhn wird die B-Zell-Rezeptorvielfalt durch Genkonversion generiert [15].

2.1.2 Von der hämatopoetischen Stammzelle zur Plasmazelle

Alle Leukozyten stammen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab. Diese ist die hämatopoetische Stammzelle (HSC) mesodermalen Ursprungs, die erstmals 1956 funktionell als zur vollständigen Rekonstitution durch Strahlung depletierten Knochenmarks fähige Zellpopulation beschrieben wurde [16]. Bei der Maus befinden sich HSCs ab Embryonaltag 7 (ET7) vor allem im Dottersack [17]. Diese Zellen stellen aufgrund ihrer Hämoglobinproduktion nach neueren Erkenntnissen allerdings eher Erythrozyten-Vorläufer dar [18]. Echte frühe HSCs finden sich in der para-aortikalen Splanchnopleura [19, 20], teils auch in der Plazenta und der Wand der Umbilikal-Vene [21, 22]. HSCs wandern während der murinen Ontogenese in die fetale Leber ein, wo etwa an ET16 eine massive Proliferation dieser Zellen stattfindet [23]. Erst hier entwickeln die HSCs die Fähigkeit, depletiertes Knochenmark zu rekonstituieren [24]. Ab ET 17 wandern HSCs ins murine Knochenmark ein [25], ihrer postnatalen Lokalisation [26]. Innerhalb dieses Gewebes können die Leukozyten-Vorläufer je nach aktuellen Bedürfnissen verschiedene Orte besiedeln. Frühe Entwicklungsstadien dieser Zellen werden vermutlich bevorzugt in der sauerstoffarmen, aber Calcium-reichen endostalen Nische in direkter Nachbarschaft zum Periost [27-29] und spätere, teils bereits emigrationsfähige Stadien vermehrt in der gefäßreicheren sinusoidalen Nische gefunden [30]. Bei der Entwicklung von der murinen HSC zu differenzierteren Zelltypen spielen verschiedene von Knochenmarks-Stromazellen produzierte Wachstumsfaktoren wie TSLP, flt-3-Ligand [31] sowie IL-7 [32] eine entscheidende Rolle.

Die HSC verharrt monatelang ruhend im Knochenmark und teilt sich nur etwa alle 145 Tage [33], wobei sich eine der beiden Tochterzellen zu einer sich differenzierenden Zelle weiterentwickelt, die andere im Stadium einer HSC bleibt [34]. Somit ist die HSC lebenslang bei jeder Zellteilung selbsterneuernd [35]. Murine HSC sind $c\text{-kit}^+$ $\text{Thy1.1}^{\text{low}}$ Lin^- CD150^+ Sca1^+ flt-3^- [36, 37]. Die sich weiterdifferenzierende Tochterzelle, *multipotente Progenitorzelle* (MPP) genannt, verliert hingegen die CD150-Expression und gewinnt die Expression von CD34

hinzu [38]. Diese Zellen teilen sich frequenter, haben eine durchschnittliche Überlebenszeit von nur noch 4-6 Wochen und differenzieren sich, nachdem sie $flt3^+$ geworden sind, zu sogenannten *lymphoid primed multipotent progenitor cells* (LMPP). Diese werden nachfolgend zu sogenannten *common lymphoid progenitors* (CLP), die $Lin^- Sca^{low} IL-7R^{high}$ sind und sich zu B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und auch Teilpopulationen von Dendritischen Zellen entwickeln können. Während sich T-Zell-Vorläufer schon im Knochenmark von den B-Zell-Vorläufern trennen und sich Notch-Signal-abhängig im Thymus weiterentwickeln [39], verbleiben B-Zell-Vorläufer im Knochenmark und entwickeln sich wie in Tabelle 1 dargestellt weiter zur frühen B-Zelle (auch pre-pro-B-Zelle genannt), die noch $CD19^-$ ist [40]. Nach beginnender CD19- und Pax-5-Expression werden diese Zellen zu pro-B-Zellen, bei denen durch die einsetzende RAG-Aktivität das Immunglobulin-Gen-Rearrangement ablaufen kann. Sobald diese Zellen ihre CD34- sowie IL-7R-Expression verlieren werden sie zu pre-BI-Zellen, die über große und kleine pre-BII-Zellstadien zu immaturren B-Zellen werden, welche Oberflächen-IgM exprimieren. Diese B-Zellen können das Knochenmark über sinusoidale Gefäße verlassen, sobald sie keine Retention innerhalb des CXCL12-reichen Gewebes mehr erfahren, nachdem sie die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 über noch unbekannte Mechanismen verringert haben [41].

Die immaturren B-Zellen reifen außerhalb des Knochenmarks zu maturaen B-Zellen heran. Sie wandern zuerst zur Milz, wo sie sich über verschiedene Transitionsstadien (T1/T2) entweder zu nicht-rezirkulierenden Marginalzonen-B-Zellen, die in der Milz verbleiben, oder zu zirkulierenden, CXCR5-exprimierenden folliculären B-Zellen differenzieren, welche die Milz verlassen und die CXCL13-reichen B-Zell-Areale aller peripheren lymphatischen Organe besiedeln können [42-44]. Werden B-Zellen durch Antigenkontakt aktiviert, exprimieren sie vermehrt CCR7, den Rezeptor von durch retikuläre Zellen in den T-Zell-Bereichen produzierten Chemokinen CCL19 und CCL21 [45]. Hierdurch werden diese B-Zellen an die Grenze zwischen B- und T-Zellzone gelockt, wo es zu einer Interaktion zwischen jeweils antigenspezifischen B- und T-Zellen kommen kann [46]. Nach ein bis zwei Tagen regulieren die B-Zellen CCR7 auf ihrer Oberfläche herunter, exprimieren aber weiterhin CXCR5, wodurch sie wieder zu zentraleren Bezirken innerhalb der B-Zell-Follikel migrieren [47]. Aus primären Lymphfollikeln entwickeln sich in der Folge Keimzentren (Geminale Zentren, GCs), bei denen strukturell zwischen einer dunklen Zone mit sich teilenden Zentroblasten und einer hellen Zone mit mitotisch inaktiveren Zentrozyten unterschieden werden kann [48]. Hier kommt es nach Interaktion von CD40 auf den B-Zellen mit CD40L auf den folliculären T-Helferzellen und unter dem Einfluss verschiedener Zytokine wie IL-21 zur starken Proliferation der B-Zellen,

2.2 B-Zellen beim Huhn

Vögel besitzen ein primäres lymphatisches Organ, welches bei Säugetieren nicht existiert: Die bereits 1620 durch Hieronymus Fabricius erwähnte Bursa Fabricii [60]. Jolly beschrieb dieses Organ bereits 1914 als dorsales Divertikel der proktadealen Region [61]. Lange Zeit war die tatsächliche Funktion dieses Organes nicht bekannt. Noch 1950 wurde vermutet, die Bursa diene als Receptakulum seminis, also als Samenspeicher zum Zwecke einer effektiven Fortpflanzung. Dies war allerdings eine widersinnige Annahme, da bereits 1913 bekannt war, dass die Bursa sich gerade während der sexuellen Maturität zurückbildet [62], also zu einem Zeitpunkt, an dem eine Funktion während der Fortpflanzung sinnhaft wäre.

Erst wenige Jahre später wurde die tatsächliche Aufgabe der Bursa als primäres lymphatisches Organ erkannt [63]. Die erste Verbindung zwischen Bursa und der aviären humoralen Immunantwort wurde zufällig hergestellt, als das Serum von bursektomierten Hühnern auf seinen Gehalt an Antikörpern gegen ein zuvor zur Immunisierung benutztes *Salmonella*-Antigen untersucht und eine stark verminderte Antikörperproduktion dieser Tiere festgestellt wurde [64].

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 angedeutet, geht die Diversifizierung des Immunglobulin-Repertoires bei Hühnern andersartig vonstatten als die bei Maus und Mensch: Beim Huhn werden während des Gen-Rearrangements im frühen Entwicklungsstadium nur wenige der vorhandenen V-, D- und J-Gensegmente genutzt, wodurch mithilfe dieses Mechanismus nur eine begrenzte Diversität der Immunglobulin-Moleküle erzielt werden kann [65]. Die B-Zell-Rezeptorvielfalt wird beim Huhn vorrangig durch Genkonversion erreicht. Dieser Vorgang wurde bereits gut untersucht und wird in der Übersichtsarbeit von McCormack et al. näher erläutert [15]. Grob beschrieben wird während der Genkonversion ein Teil der die variablen Anteile des bereits zuvor rearrangierten Immunglobulin-codierenden Gens durch Anteile von Pseudogenen ersetzt, wodurch die neu zustande kommenden Nukleinsäure-Sequenzen Immunglobuline anderer Antigen-Spezifität codieren. Gen-Rearrangement läuft unabhängig vom bursalen Milieu ab, während diese Umgebung für die Genkonversion unerlässlich ist [66]. Eine frühe chirurgische Entfernung der Bursa mittels Bursektomie resultiert daher stets in einem verminderten Immunglobulin-Repertoire [67].

Ein erwähnenswerter Unterschied zu der Erforschung von B-Zellen bei Maus und Mensch stellt die Tatsache dar, dass die verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien aufgrund des Mangels an Zell-Markern beim Huhn momentan nicht so detailliert ansprechbar sind wie bei jenen der besser untersuchten Säugerspezies, vor allem bei der Maus und beim Menschen. Der typische

Marker für B-Zellen beim Huhn ist chB6, der auch Bu-1 (Klonname AV20) genannt wird [68]. Andere verwendete Marker, deren Expression während Teilen der B-Zell-Differenzierung reguliert ist, sind unter anderem: Oberflächen-Immunglobulin [69], chMHCII, Lewis^x/Sialyl-Lewis^x [70] und das später näher beschriebene chL12 (OV-Antigen) [71].

Generell wird beim Huhn aufgrund der Wanderungsprozesse während der B-Zellentwicklung zwischen präbursalen, bursalen sowie postbursalen B-Zell-Stadien unterschieden.

2.2.1 Die Bursa Fabricii als zentrales Organ der B-Zell-Reifung beim Huhn

Das Wachstum der Bursa lässt sich bei Hühnern in drei altersabhängige Phasen untergliedern [72]. Bis zum Alter von drei Wochen zeigen die Bursen von Hühnern ein schnelles Wachstum, zwischen vier und acht Wochen befindet sich die Größe des Organs auf einer Plateauphase und ab der achten Woche nach dem Schlupf beginnt die Involution des Organes, welche bis zum Alter von sechs bis sieben Monaten in einer nahezu vollständigen Rückbildung des Gewebes resultiert [73]. Diese Rückbildungsprozesse werden unter anderem stark von Steroidhormonen wie Testosteron [74] oder Glucocorticoiden [75] gesteuert.

Die Bursa Fabricii ist makroskopisch betrachtet ein Hohlorgan, dessen Inneres über einen schlitzförmigen Kanal mit der Lumen des Enddarms in Verbindung steht. In das Lumen des Organes ragen 15 bis 20 große Gewebefalten vor, die der Sitz der sogenannten Bursafollikel sind. Die gesamte Bursa ist nach außen hin durch eine Bindegewebskapsel abgegrenzt. Unter dieser befindet sich eine deutlich erkennbare Schicht glatter Muskulatur [76]. Durch die Kontraktion dieser Muskelschicht kommt es zu einer starken Verengung des Bursalumens sowie zu Veränderungen der Druckverhältnisse innerhalb des bursalen Gewebes, wodurch der Inhalt der Bursa passiv in Bewegung versetzt werden kann. Dies ist möglicherweise für die Verteilung beweglicher Zellen sowie verschiedener, in Lösung befindlicher Stoffe innerhalb einiger Teilbereiche der Bursa von Bedeutung [76].

Im Zentrum jeder Bursafalte liegen die Gewebe-versorgenden Einheiten bestehend aus Arterien, Venen und Lymphgefäßen. Seitlich dieser Versorgungsstrukturen sind die sogenannten Bursafollikel zu finden, die die eigentlichen funktionellen und strukturellen Einheiten der Bursa darstellen. Jeder Follikel einer immunologisch reifen Bursa besteht aus Rinde (Cortex) und Mark (Medulla), die strukturell durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind und auch funktionell eigenständige Bereiche darstellen. Jeder dieser Follikel hat eine eigene Gefäßversorgung, welche die Rinde durchzieht, die aber nicht bis ins Mark hineinreicht [76].

Die Follikel sind dicht besiedelt von lymphoiden Zellen, wobei die Zellen im Mark verglichen mit denen in der Rinde weniger dicht gepackt liegen. Das Gerüstwerk der Follikel wird durch verschiedene Stromazellen gebildet. Eine Stromazellart ist beispielsweise die bursale sekretorische dendritische Zelle (BSDC), die früh in der Ontogenese bereits vor den lymphoiden Zellen in die Bursa-Anlage einwandert [77] und später vorwiegend im Mark zu finden ist [78]. Das Mark steht über das sogenannte Follikel-assoziierte Epithel (FAE) mit dem Bursa-Lumen in Verbindung [79]. Dieses macht etwa zehn Prozent der gesamten inneren Auskleidung der Bursa aus, die restlichen 90% werden als interfollikuläres Epithel (IFE) bezeichnet [79]. Unterhalb des IFE ist eine Basalmembran ausgebildet, die beim FAE fehlt und durch zwei bis drei Schichten squamöser Epithelzellen ersetzt wird [80]. Am FAE findet in gewissem Umfang eine Antigenaufnahme aus dem Bursalumen ins Follikelmark statt [81]. Lösliche Substanzen gelangen nach Auftragen auf die Anallippen des Huhnes retrograd ins Lumen des Enddarmes des Huhnes und nachfolgend ins Bursalumen, wo sie nach Transport über das FAE in der Medulla auftauchen [82, 83]. Auch umgekehrt gelangen Stoffe, vor allem Produkte der BSDCs, die zum Ende der Embryonalentwicklung in großer Menge anfallen, aus der Medulla über das FAE ins Bursalumen [84]. Die Verbindung von Bursalumen zum Darmlumen ist für eine physiologische Ausprägung des Follikelkortex essentiell [85], während die generelle Kolonisierung der Bursa mit lymphoiden Zellen im Laufe der Ontogenese durch eine Unterbrechung dieser Verbindung nicht beeinträchtigt ist [86].

2.2.2 Die frühe Kolonisierung der Bursa

Vorläufer der präbursalen lymphoiden Zellen stammen wie die HSC-Vorläufer beim Säuger aus der para-aortikalen Region des Embryos. Diese Zellen wandern ins embryonale Knochenmark und in die embryonale Milz ein [87]. Hier beginnt in Bursa-unabhängiger Weise das Immunglobulin-Gen-Rearrangement [66]. In der mittleren Bebrütungswoche sind in einem normal entwickelten Hühner-Embryo etwa $1-5 \times 10^4$ präbursale B-Zellen vorhanden, die bereit sind, in die Bursa einzuwandern. Hierfür müssen diese Zelle aber Knochenmark und Milz über Blutgefäße verlassen und den Übertritt vom Blutstrom ins Bursa-Gewebe vollziehen [88]. Dies geschieht eventuell mithilfe eines L-Selektin-abhängigen Mechanismus wie beim Einwanderungsprozess von B-Zellen in den Appendix des Kaninchens. Hier exprimieren einwanderungsbereite B-Zellen das L-Selektin CD62L, welches an ein Molekül namens *peripheral node adressin* (PNAd) an der luminalen Seite spezieller Gefäße, den sogenannten *high endothelial venules* (HEV), bindet [89]. Ein Molekül, das bei der Besiedlung der Bursa

vermutlich eine Rolle spielt, ist das Kohlenhydrat-Epitop Sialyl-Lewis^x, welches von präbursalen und frühen bursalen B-Zellen exprimiert wird [70].

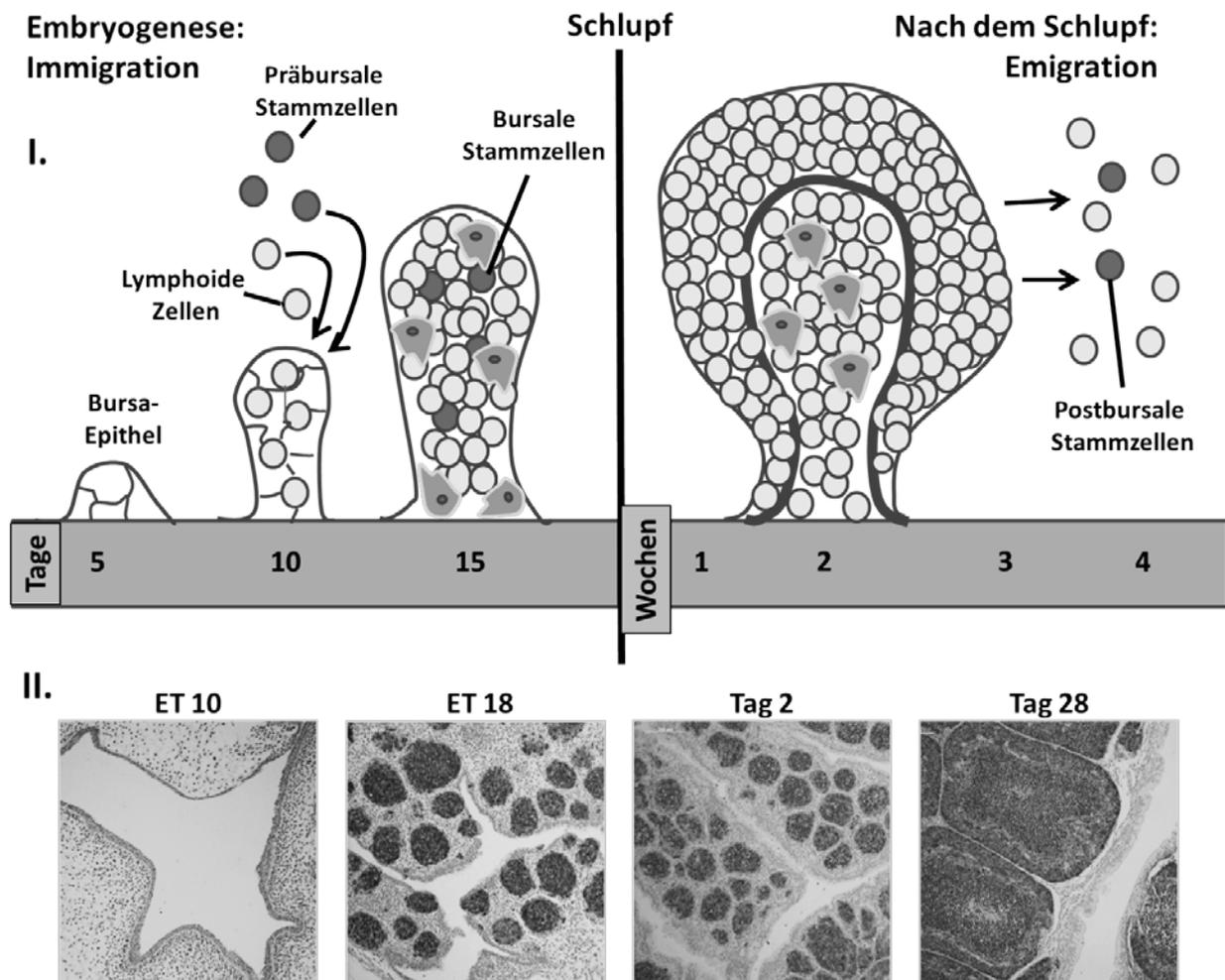


Abbildung 1: Die Bursa während der Ontogenese

Die Zeichnung in I. (modifiziert nach [90]) sowie die histologische Untersuchung des bursalen Gewebes mittels B-Zell-Färbung gegen chB6 in II. zu verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese [91] zeigt, dass sich ab ET4 eine epitheliale Knospe ausbildet, die sich zur Follikel-Anlage differenziert und in die während der zweiten Brutwoche lymphoide Zellen einwandern. Hier kommt es zur Proliferation und Genkonversion. Zum Zeitpunkt des Schlupfes verlassen die ersten B-Zellen die Bursa und der Follikel-Kortex beginnt sich auszuprägen, sodass der Bursa-Follikel wenige Wochen nach dem Schlupf seine typische Unterteilung in Rinde und Mark aufweist. Gezeigt ist außerdem, dass es sowohl präbursale, bursale sowie vermutlich auch postbursale Stammzellen gibt, die auch nach der Involution der Bursa zur Aufrechterhaltung der humoralen Immunität beitragen [92].

2.2.3 B-Zellen in der Bursa Fabricii

Obwohl der Übertritt von präbursalen B-Zellen ins Bursa-Stroma unabhängig von einer Oberflächen-Immunglobulin-Expression ist, können nur Zellen mit produktivem Gen-Rearrangement aus dem Bursa-Stroma in die Follikel-Anlagen einwandern [93]. Die Follikel-Anlagen der Bursa werden nicht schlagartig gebildet, sondern entstehen sukzessive zwischen

Bebrütungstag 11 und 14, wobei schon hier die Entwicklung des FAE zu erkennen ist [80]. In jede Follikel-Anlage wandern in der mittleren Brutwoche ein bis fünf lymphoide Zellen ein, die in der letzten Brutwoche in exponentieller Weise proliferieren, sodass zum Zeitpunkt des Schlupfes in jedem der insgesamt ungefähr 10000 Follikel jeweils etwa 1000 Zellen vorhanden sind [88, 94]. Während dieser initialen klonalen Expansion findet noch keine Genkonversion statt. Die Phase, in der die Genkonversion beginnt, ist durch die Expression von Lewis^x anstelle von Sialyl-Lewis^x auf der Oberfläche der bursalen B-Zellen gekennzeichnet [70]. Bei den bursalen Follikeln kann vor dem Schlupf noch nicht zwischen Mark und Rinde unterschieden werden. Erst kurze Zeit nach dem Schlupf wandern bursale Zellen aus dem homogenen Follikel über die Basalmembran nach außen und bilden nach starker Proliferation die Follikelrinde (siehe Abbildung 1). Im Bursa-Gewebe findet Milieu-abhängig die oben genannte Genkonversion statt, wodurch die Immunglobulin-Vielfalt der Hühner-B-Zellen hauptsächlich generiert wird [67].

Bei den lymphoiden Zellen in der Bursa findet man eine sehr hohe Apoptoserate von etwa 95% [95]. Der Apoptose dieser Zellen vorausgehend ist eine Abnahme der Oberflächen-Immunglobulin-Expression [69]. Nur fünf Prozent der bursalen B-Zellen erreichen ein zur Emigration fähiges Stadium. Diese Zellen sind durch die Expression des chL12-Antigens, auch OV-Antigen genannt [96, 97], gekennzeichnet, während zur Auswanderung unfähige B-Zell-Stadien chL12-negativ sind [98]. Die chL12-exprimierenden bursalen B-Zellen verlassen die Bursa ab dem Zeitpunkt des Schlupfes bis zur Involution des Organes wahrscheinlich über Blutgefäße in der Follikelrinde [71] und tauchen im Blut als sogenannte *recent bursal emigrants* (RBE) auf. Dies sind kleine Zellen, die MHCII sowie Oberflächen-Immunglobulin exprimieren [71] und die die Expression von Lewis^x eingestellt haben [70]. Stündlich wird etwa ein Prozent der im Blut zirkulierenden B-Zellen durch frisch aus der Bursa kommende RBE ersetzt [71].

2.2.4 Postbursale B-Zellen besiedeln die Peripherie

RBE sind die ersten postbursalen Zellen. Sie können anhand ihrer Expression eines bislang undefinierten Antigens, LT2, in zwei Untergruppen unterteilt werden. 90% der RBE sind LT2-positiv, die restlichen zehn Prozent exprimieren dieses Antigen nicht. Bei postbursalen B-Zellen können verschiedene Subpopulationen anhand ihrer Lebensdauer differenziert werden [99, 100]. Nach einer Bursektomie verschwinden etwa 60% der im Blut vorkommenden B-Zellen innerhalb von drei Tagen. Diese Zellen sind LT-positiv, während die länger überlebenden B-Zellen im Blut LT-negativ sind. 35% aller B-Zellen im Blut haben eine Überlebenszeit von drei

Wochen. Die verbleibenden 5% sind wahrscheinlich extra-bursalen Ursprungs und stammen von peripheren, mitotisch aktiven B-Zellen, deren Lokalisation und Phänotyp bislang allerdings umstritten sind. Vermutet werden diese Zellen in der Milz, wo eine Population von chL12-negativen B-Zellen mit überdurchschnittlich großem Zellvolumen bereits nachgewiesen wurde [99]. Diese Zellen sind wahrscheinlich postbursale Stammzellen, durch die der periphere B-Zell-Pool auch nach der Bursa-Involution aufrechterhalten wird [92]. Postbursale B-Zellen kommen beim Huhn in allen peripheren lymphatischen Organen wie beispielsweise Milz, Caecaltonsillen und Harder'scher Drüse vor. Die peripheren lymphatischen Strukturen des Huhnes zeigen im Vergleich zu denen der Säuger teils bedeutende Unterschiede. So existieren keine Lymphknoten, in denen sich postbursale B-Zellen aufhalten könnten und auch das B-Zell-Areal in der Milz des Huhnes ist beispielsweise auf die peri-ellipsoidale weiße Pulpa beschränkt. Über die genaue weitere Entwicklung postbursaler B-Zellen ist bislang noch wenig bekannt.

Auch beim Huhn entwickeln sich im Laufe von Immunreaktionen Germinale Zentren (GCs), wo eine weitere Differenzierung von der durch Antigen-Kontakt aktivierten B-Zelle zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle stattfindet [101]. Diese GCs haben allerdings einen anderen mikroskopischen Aufbau als die typischen GCs beim Säuger [102]. Sie zeigen eine dunkle Zone im peripheren Bereich des Germinalen Zentrums und eine helle Zone im Zentrum, während diese Zonen bei Säugern an verschiedenen Polen des Keimzentrums liegen. Auch hier kommt es wie beim Säuger zur somatischen Hypermutation, Klassenwechsel und Affinitätsreifung [103, 104].

Etwa 48 Stunden nach Antigenkontakt findet man die IgM-produzierende Plasmazellen in der Milz. Diese liegen vor allem im Grenzbereich zwischen T-Zell-Areal und roter Milzpulpa, aber auch innerhalb der roten Pulpa. 72 Stunden nach Antigenkontakt findet man Plasmazellen, die das Säuger-IgG-Ortholog IgY sezernieren und nach 96 Stunden sind Plasmazellen eindeutig innerhalb Germinaler Zentren zu sehen [105]. Während die in der Milz anzutreffenden Plasmazellen nur in geringem Ausmaß IgA synthetisieren, sind diejenigen in der Harder'schen Drüse und in den Caecaltonsillen Produzenten großer IgA-Mengen, aber auch von IgY [106, 107]. IgE und IgD konnten beim Huhn hingegen bislang nicht nachgewiesen werden [63].

2.3 Chemotaxis bei Leukozyten

Viele Leukozyten sind nicht örtlich fixiert, sondern müssen während ihrer Entwicklung, wie oben für B-Zellen beschrieben, und zur Erfüllung bestimmter Aufgaben wie zur Immunüberwachung und zur Interaktion mit anderen Zellen zwischen verschiedenen Lokalisationen migrieren. Bei migratorischen Prozessen von Zellen wird zwischen gerichteter und ungerichteter Fortbewegung unterschieden. Bei einer ungerichteten Fortbewegung wandert eine möglicherweise zuvor aktivierte Zelle in eine mehr oder weniger zufällige Richtung und orientiert sich hierbei nicht an eventuell vorhandenen Stoffgradienten in ihrer unmittelbaren Umgebung. In diesem Fall spricht man von *Chemokinese*. Bei gerichteten Fortbewegungen hingegen orientiert sich die aktivierte Zelle an den Stoffkonzentrationen in ihrer unmittelbaren Umgebung und wandert zielstrebig entlang eines Konzentrationsgradienten. Diese Wanderung geschieht meist in Richtung hoher Stoffkonzentrationen und wird dann als *Chemotaxis* bezeichnet. Eine Wanderung von Zellen kann aber auch in Richtung niedrigerer Stoffkonzentrationen orientiert sein, wobei dann von einer sogenannten *Chemofugetaxis* gesprochen wird. Diese ist beispielsweise bei T-Zellen zu beobachten, wenn im Falle des Chemokins CXCL12 eine bestimmte Konzentration überschritten wird [108].

Wasserlösliche Substanzen verteilen sich in wässrig-flüssigem Milieu durch Diffusion, wodurch die dauerhafte Aufrechterhaltung eines Stoffgradienten unmöglich wird. Diese Diffusion kann verhindert werden, indem sich Stoffe an bestimmte Strukturen von Bindegewebsmatrix-Proteinen oder Zelloberflächen anlagern [109] und so für längere Zeit an einer bestimmten Lokalisation gehalten werden [110]. Im Falle der Chemokine spricht man in diesem Zusammenhang von einem Bindegewebs-assoziierten Konzentrationsgradienten. Orientieren sich Zellen an einem solchen Gewebs-assoziierten Stoffgradienten wird diese Sonderform der Chemotaxis als *Haptotaxis* bezeichnet. *Haptotaxis* ist sowohl für die Extravasation von Leukozyten als auch für die Migration dieser Zellen innerhalb von Organen wichtig. So werden Leukozyten von Chemokinen angezogen, die an der luminalen Seite auf Endothelzellen spezieller Gefäße, der sogenannten *high endothelial venules* (HEV), gebunden sind [111]. Nach Chemokinrezeptor-Aktivierung laufen in der Zelle Prozesse ab, die eine nachfolgende Extravasation erst ermöglichen (siehe Kapitel 2.3.3).

2.3.1 Chemotaktisch wirksame Stoffe

Eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen kann anziehend oder abstoßend auf migrationsfähige Zellen einwirken. Neben der Zytokin-Untergruppe der Chemokine bewirken

auch andere Stoffe Chemotaxis. Während entzündlicher Prozesse wirken lokal produzierte Lipidmediatoren wie Leukotriene [112] und Prostaglandine [113] anziehend auf eosinophile und basophile Granulozyten [114] sowie auf verschiedene T-Zellen [115]. Lysophospholipide, wie beispielsweise der prominenteste Vertreter dieser Stoffgruppe Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Nebenprodukt des Sphingolipid-Stoffwechsels, beeinflussen über verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren in vielfältiger Weise das Migrationsverhalten diverser Immunzellen [116, 117], darunter Lymphozyten [118] und myeloide Zellen [119]. Verschiedene Defensine, wie die aus Neutrophilen sezernierten Defensine-1 und -2, lösen die Migration von T-Zellen und Dendritischen Zellen aus [120, 121]. Auch Produkte der Komplementkaskade wie C3a und C5a können chemotaktisch wirksam sein [122]. Der Neurotransmitter Serotonin kann als von Mastzellen produzierter Entzündungsmediator Eosinophile anlocken [123] und auch verschiedene Nicht-Chemokin-Zytokine wie IL-16 [124] und der Stammzell-Faktor (SCF) [125] können eine gerichtete Migration bewirken.

2.3.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

2.3.2.1 Systematik der Chemokine

Die Chemokine haben ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit, Chemotaxis auszulösen, erhalten und sollen ebenso wie die zugehörigen Rezeptoren im Folgenden näher beschrieben werden. Chemokine sind allesamt kleine Moleküle, die aus durchschnittlich 75-125 Aminosäuren aufgebaut sind und eine Molmasse von etwa 8 bis 14 kDa aufweisen. Die Tertiärstruktur dieser Moleküle ist in Abbildung 2I dargestellt. Sie ist hochkonserviert und wird durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen vier Cysteinen bestimmt. Während der Amino-Terminus ungeordnet erscheint, besteht der Hauptkörper des Moleküls aus einem dreisträngigen, antiparallel verlaufenden β -Faltblatt und endet am Carboxy-Terminus mit einer α -Helix [126]. Die Halbwertszeit im Blut ist sehr kurz und wird in der Regel mit unter zwei Stunden angegeben. Bei CXCL8 beträgt sie beispielsweise lediglich 10 Minuten [127]. Diese kurze Halbwertszeit ist der Anfälligkeit von Chemokinen gegenüber verschiedener Proteasen zuzuschreiben: Degradierung am N-Terminus ist durch Elastase [128], Kathepsin K, Kathepsin G [129] sowie die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 [130] möglich; Degradierung am C-Terminus beispielsweise durch Carboxypeptidase N [131].

Die meisten Chemokine sind lösliche Proteine, die sich aufgrund ihrer positiven Ladung, welche aus dem hohen Gehalt an basischen Aminosäuren resultiert, an negativ geladene

Glykosaminoglykane (GAG) auf Zelloberflächen und Matrixproteinen anlagern. Hierdurch ist die Entstehung eines Gewebs-assoziierten Konzentrationsgradienten möglich. Die einzigen Chemokine, die nicht in sezernierter Form vorliegen, sind CXCL16 und CX₃CL1, die eine Transmembrandomäne aufweisen, mit der sie in Zellmembranen verankert werden [132].

Beim Menschen sind bislang 53 Chemokine und 23 Chemokinrezeptoren bekannt [133, 134]. Die Nomenklatur dieser Moleküle war vor Einführung eines vereinheitlichenden Klassifikations-Systems recht verwirrend, da in vielen Fällen dasselbe Chemokin mehrfach von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt und von diesen dann jeweils unterschiedlich benannt wurde. Eine Einteilung der Chemokine kann entweder anhand ihrer Struktur oder ihrer Hauptfunktion erfolgen.

Eine strukturelle Gruppierung der Chemokine ist anhand zweier amino-terminal gelegener Cysteine möglich. Werden diese beiden Cysteine voneinander durch exakt eine variable Aminosäure voneinander getrennt, werden sie CXC-Chemokine genannt und zur α -Familie gezählt. Liegen diese beiden Cysteine direkt nebeneinander in der Peptid-Kette, spricht man von CC-Chemokinen oder Chemokinen der β -Familie. Bei dem Chemokin XCL1 (Lymphotactin) fehlt das erste Cystein [135], es wird daher zu einer eigenen Chemokin-Familie, der γ -Familie, gezählt. Bei dem zur δ -Familie zählenden CX₃CL (Fractalkine) sind die beiden Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt [136]. Da es sich bei Chemokinen um die Liganden von Rezeptoren handelt, wird im Klassifikationsnamen hinter CC oder CXC noch ein „L“ angehängt, worauf noch eine Nummer folgt, die der Reihenfolge der Entdeckung entsprechend vergeben wurde. Eine Auflistung der beim Menschen bekannten Chemokine, deren alte Bezeichnungen sowie ihre Rezeptoren sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei Betrachtung dieser Tabelle wird deutlich, dass Chemokine und ihre Rezeptoren sich im Regelfall promiskuitiv verhalten. Ein Rezeptor bindet meist mehrere Chemokine und die meisten Chemokine sind Liganden gleich mehrerer Rezeptoren, wodurch innerhalb des Chemokinsystems eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber Teilausfällen entsteht. Ausnahmen hiervon sind die unten näher beschriebenen homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13 mit ihren jeweiligen Rezeptoren, bei deren Ausfall keine Ersatzmechanismen greifen können.

Eine weitere strukturelle Einteilung der CXC-Chemokine erfolgt durch das Vorhandensein oder Fehlen des sogenannten ELR-Motivs [137]. ELR bezieht sich auf das Aminosäure-Motiv Glu-Leu-Arg, welches dem ersten Cystein am amino-terminalen Ende vorangestellt sein kann. Ist dieses Motiv vorhanden, so wirkt es chemotaktisch auf Neutrophile [138], fehlt es, so hat es vorwiegend Wirkung auf Lymphozyten. ELR⁺ sind CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14 und 15, während CXCL4, 9, 10, 11, 12, 13 und 16 ELR⁻ sind.

Funktionell werden Chemokine in homöostatische und inflammatorische Chemokine eingeteilt. Die Expression inflammatorischer Chemokine wird während entzündlicher Prozesse induziert [139], während die homöostatischen Chemokine in der Regel konstitutiv exprimiert werden und eine wichtige Bedeutung während der Ontogenese, speziell der Organogenese, sowie bei der physiologischen Verteilung von Leukozyten innerhalb von Organen haben [140, 141]. Die Einteilung der jeweiligen Chemokine zur inflammatorischen oder homöostatischen Gruppe ist allerdings nicht als starr anzusehen. Auch homöostatische Chemokine sind in gewissem Ausmaß induzierbar, wie später in 2.4.1 für das Beispiel CXCL12 beschrieben wird, und einigen inflammatorischen Chemokinen wird mittlerweile eine Rolle während nicht-entzündlicher Prozesse zugeschrieben, sodass man teils von bifunktionalen Chemokinen spricht. Funktionell kommt bei Betrachtung dieser Einteilung auch zum Tragen, dass die Rezeptoren sowohl inflammatorischer als auch homöostatischer Chemokine in ihrer Expression und Aktivität reguliert werden können, was später in 2.3.2.4 näher beschrieben wird.

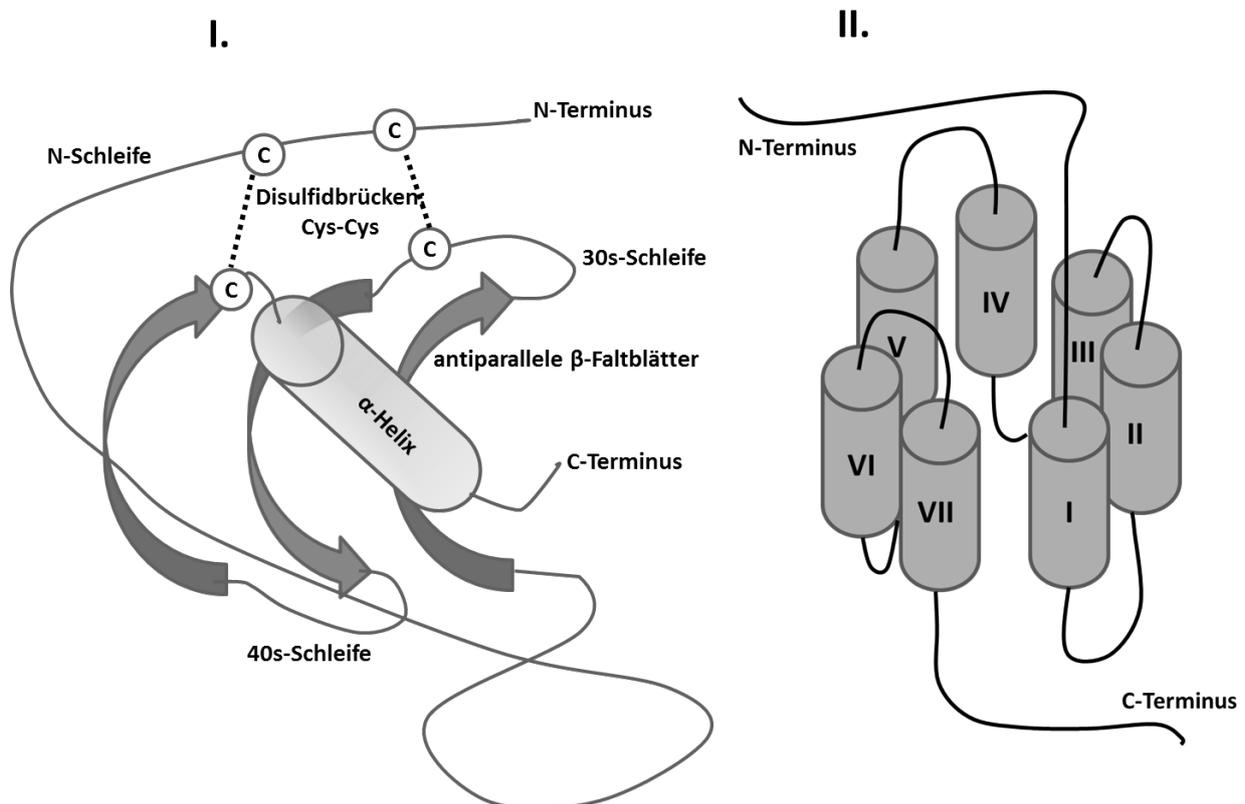


Abbildung 2: Der typische Aufbau eines Chemokins und seines Rezeptors

Der Hauptkörper eines Chemokins (I) besteht aus drei antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, die durch verschiedene Schleifen miteinander verbunden sind. Der Carboxy-Terminus ist stets als α -Helix ausgebildet, während das amino-terminale Ende typisch für das jeweilige Chemokin gestaltet ist. Ein Chemokinrezeptor (II) besteht aus sieben α -helikalen Transmembran-Domänen, die durch je drei intra- sowie drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der Amino-Terminus ragt aus der Zelle hinaus, während das carboxy-terminale Ende zytoplasmatisch liegt.

Chemokine neigen in gelöster Form sowie als membrangebundene Einheiten zur Dimerisierung und in hohen Konzentrationen zur Ausbildung höher organisierter Strukturen [142]. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass bereits Chemokin-Monomere eine hohe Affinität zu ihrem jeweiligen Rezeptor aufweisen und nach Bindung an den membranständigen Rezeptor ein Signal in der Zelle auslösen können [143]. *In vivo*-Daten hingegen ergaben, dass eine Oligomerisierung für die Funktion diverser Chemokine im Organismus essentiell ist [110] und vor allem im Falle einiger inflammatorischer Chemokine wie CCL2, CCL4, CCL5 und CCL10 eine verstärkte Rekrutierung von Leukozyten bewirkt [144]. Neben Chemokin-Homodimeren kommen *in vivo* auch Heterodimere vor, wobei vor allem CXCL8 in Verbindung mit CCL2 und CXCL4 durch allosterische Modulation nach Bindung an die jeweiligen Rezeptoren einen eindeutigen Synergismus im Verlauf entzündlicher Prozesse zeigt [145, 146].

2.3.2.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind spezifisch für jeweils einen Chemokin-Typ, das heißt sie binden entweder nur C-, CC-, CXC- oder CX₃C-Chemokine und werden danach CR, CCR, CXCR oder CX₃CR genannt, wobei „R“ für Rezeptor steht. Auch die jeweiligen Rezeptornamen werden mit Nummern versehen, welche die Reihenfolge ihrer Entdeckung widerspiegeln. Die beim Menschen bislang identifizierten Vertreter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Um ein typischer Vertreter seiner Art zu sein, muss ein Chemokinrezeptor folgende zwei Bedingungen erfüllen: Erstens muss er eine hohe Affinität für Chemokine zeigen und zweitens muss die Rezeptor-Ligand-Interaktion ein Signal in der Zelle auslösen, das letztlich zu einer gerichteten Fortbewegung der Zelle führt [147].

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die innerhalb dieser Rezeptor-Gruppe, wie beispielsweise auch Rhodopsin, zu den Klasse C-Rezeptoren gezählt werden, die durch die Anlagerung einer G α_i -Untereinheit gekennzeichnet sind. Hierdurch ist ihre Aktivierung mittels *Pertussis-Toxin* hemmbar [148]. Die Tertiärstruktur eines typischen Vertreters dieser Gruppe ist schematisch in Abbildung 2II dargestellt. Der Amino-Terminus des Moleküles liegt außerhalb der Zelle, während der Carboxy-Terminus ins Zytoplasma ragt. Sieben α -Helices durchspannen jeweils einmal die Zellmembran und lagern sich derart zusammen, dass an der Außenfläche des Rezeptors eine zentrale Vertiefung zur Interaktion mit einem Liganden entsteht. Die Transmembran-Domänen sind durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Die Bindung eines Liganden an einen Chemokinrezeptor läuft als zweistufiger Prozess ab. Zuerst bindet der Hauptkörper des Chemokins, wie oben beschrieben bestehend aus drei anti-parallel verlaufenden β -Faltblättern,

an die extrazellulären Schleifen des Rezeptors, wodurch eine Konformationsänderung am Chemokin ausgelöst wird. Erst danach kann das freie amino-terminale Ende des Chemokins an seine vorgesehene Interaktionsstelle am α -Helix-Bündel des Chemokinrezeptors binden [149].

Tabelle 2: Humane Chemokine, ihre Synonyme, Funktionen und Rezeptoren

I = inflammatorisch; H = homöostatisch; D = dual (H+I); U = unbekannt; (nicht alle atypischen Chemokinrezeptoren werden in der Auflistung angeführt)

Humanes Chemokin	Synonym	Funktion	Rezeptor	Humanes Chemokin	Synonym	Funktion	Rezeptor
CC-Chemokine (β -Familie)				CXC-Chemokine (α -Familie)			
CCL1	I-309	I	CCR8	CXCL1	Gro α	I	CXCR2, CXCR1
CCL2	MCP-I	I	CCR2	CXCL2	Gro β	I	CXCR2
CCL3	MIP-1 α , LD78 α	I	CCR1, CCR5	CXCL3	Gro γ	I	CXCR3
CCL3	LD78 β	I	CCR1, CCR5	CXCL4	PF4	U	CXCR3B
CCL3L3	LD78 β	I		CXCL4VI	-	U	
CCL4	MIP-1 β	I	CCR5	CXCL5	ENA-78	I	CXCR2
CCL4L1	AT744.2	I		CXCL6	GCP-2	I	CXCR1, CXCR2
CCL4L2	-	I		CXCL7	NAP-2	I	Unbekannt
CCL5	RANTES	I	CCR1, CCR3, CCR5	CXCL8	IL-8	I	CXCR1, CXCR2
CCL7	MCP-3	I	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL9	MIG	I	CXCR3, CXCR3B
CCL8	MCP-2	I	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	CXCL10	IP-10	I	CXCR3, CXCR3B
CCL11	Eotaxin	I	CCR3	CXCL11	I-TAC	I	CXCR3, CXCR3B, CXCR7
CCL13	MCP-4	I	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL12 α - ζ	SDF-1 α - ζ	H	CXCR4, CXCR7
CCL14	HCC-I	H	CCR1	CXCL13	BLC, BCA-I	H	CXCR5
CCL15	HCC-2	H	CCR1, CCR3	CXCL14	BRAK, Bolekine	I	Unbekannt
CCL16	HCC-4 LEC	H	CCR1, CCR2, CCR4, HRH4	CXCL16	-	I	CXCR6
CCL17	TARC	D	CCR4	CXCL17	DMC	U	Unbekannt
CCL18	PARC	H	Unbekannt	C-Chemokine (γ -Familie)			
CCL19	MIP3 β , ELC	H	CCR7	XCL1	Lymphotactin, SCM-1 α	D	XCR1
CCL20	MIP3 α , LARC	D	CCR6	XCL2	SCM-1 β	D	
CCL21	SLC	D	CCR7	CX ₃ C-Chemokin (δ -Chemokin)			
CCL22	MDC	D	CCR4	CX ₃ CL1	Fractalkine	I	CX3CR1
CCL23	MPIF-I	I	CCR1, FRPL-1				
CCL24	Eotaxin 2	I	CCR3				
CCL25	TECK	H	CCR9				
CCL26	Eotaxin 3	I	CCR3				
CCL27	CTACL, ILC	H	CCR10				
CCL28	MEC	U	CCR10, CCR3				

Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung am Chemokinrezeptor, welche vornehmlich den zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors betrifft. Durch diese Konformationsänderung wird eine Dissoziation der α_i -Untereinheit des angelagerten G-Proteins nach Austausch von GDP gegen GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ermöglicht. Beide Untereinheiten lösen wie in Kapitel 2.3.3 dargestellt unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle aus [150, 151].

Wie schon bei den Chemokinen beschrieben, kann auch bei Chemokinrezeptoren regelmäßig eine Zusammenlagerung an Zelloberflächen beobachtet werden [152]. Eine Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren findet in der Regel schon während der Synthese im endoplasmatischen Retikulum statt [153]. Während allerdings G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Klasse A, wie beispielsweise der GABA-Rezeptor, zur Erfüllung ihrer Aufgaben obligat als Dimer vorliegen müssen, ist die Zusammenlagerung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse C, zu der, wie bereits beschrieben, auch die Chemokinrezeptoren gezählt werden, funktionell betrachtet fakultativ [154]. Das heißt, auch der monomerische Chemokinrezeptor ist schon funktionell [155]. *In vivo* liegen Chemokinrezeptoren innerhalb sogenannter *membrane rafts* [156] und werden innerhalb dieser Membran-Mikrodomänen in einer aktivierbaren Form gehalten [157]. Der Cholesterolgehalt dieser auch *lipid rafts* genannten Strukturen ist für die Funktionalität der eingelagerten Rezeptoren sehr bedeutsam [158], und so kann eine Ligand-Rezeptor-Interaktion bei absolutem Cholesterolmangel kein Signal in der Zelle auslösen [159].

2.3.2.3 Atypische Chemokinrezeptoren

In den letzten Jahren wurden Chemokin-bindende Rezeptoren identifiziert, welche strukturell eindeutig der Chemokinrezeptor-Familie zuzuordnen sind, die nach Chemokinbindung allerdings nicht zu Chemotaxis führen. Diese Rezeptoren werden als atypische Chemokinrezeptoren bezeichnet. Ihnen fehlen bestimmte, ansonsten bei typischen Chemokinrezeptoren hochkonservierte Struktur motive, die für eine $G\alpha_i$ -Aktivierung mit nachfolgender Chemotaxis zwingend nötig sind: ein Asp in der Transmembran-Domäne 2 (TM2) und ein DRY-Motiv (Asp-Arg-Tyr) in der zweiten intrazellulären Schleife (IL2) [160, 161]. Diese Rezeptoren wurden früher als *silent*, also ruhend oder inaktiv, bezeichnet [162]. Sie sind allerdings keinesfalls ruhend, sondern dienen über bislang schlecht untersuchte Signalwege folgenden Zwecken. Manche sind anti-inflammatorisch wirkende Fänger-Rezeptoren, sogenannte *Decoys*. Andere hingegen sind Transportmoleküle, die Chemokine durch Zellen

hindurchschleußen können, und einige dienen auch der Konzentrierung von Chemokinmolekülen an speziellen Oberflächen [163].

Der am besten untersuchte atypische Chemokinrezeptor ist D6 (CCR10). *In vitro* bindet D6 an alle inflammatorischen CC-Chemokine [164] und führt nach Bindung zur Internalisierung des Chemokin-D6-Komplexes mit nachfolgendem Chemokinabbau, ist also ein typischer *Decoy*-Rezeptor [165]. Durch diesen Mechanismus wirkt der vor allem in der Lunge exprimierte D6 auch *in vivo* anti-inflammatorisch, indem er beispielsweise hilft, Immunreaktionen während einer *Mycobacterium*-Infektionen zu kontrollieren [166].

Andere *Decoy*-Rezeptoren sind: CCX-CKR (vormals CCR11), der homöostatische Chemokine (CCL19, CCL21, CCL25 und CXCL13) bindet [167] und CXCR7, der als Fänger von CXCL12 sowie CXCL11 gilt [168], und der bei einigen Spezies eine Rolle beim Aufbau von Chemokingradienten während der Wanderung primordialer Keimzellen spielt [169].

Ein atypischer Chemokinrezeptor, mit dessen Hilfe Chemokine via Transcytose von einer Seite einer Zelle zur anderen transportiert werden kann, ist der sogenannte *Duffy Antigen Receptor for Chemokines* (DARC). Ursprünglich wurde er als Rezeptor für *Malaria*-Erreger auf Erythrozyten identifiziert [170]. Erst später wurde gezeigt, dass DARC auch inflammatorische Chemokine wie CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CCL2 sowie CCL5 bindet [171]. Eine Bindung homöostatischer Chemokine findet dagegen nicht statt [172]. DARC beeinflusst die Bioverfügbarkeit inflammatorischer Chemokine: Zum einen wird der Level einiger Chemokine im Blut durch die DARC-Expression auf Erythrozyten niedrig gehalten, da diese überschüssige Chemokinmoleküle aufnehmen; zum anderen tritt DARC auch auf Endothelzellen postkapillärer Venolen in Niere und Milz sowie von HEV in Lymphknoten und Tonsillen in Erscheinung [173]. Dadurch können im Gewebe produzierte Chemokine an der abluminalen Seite der Endothelzellen von DARC aufgenommen und den im Blutstrom vorbeikommenden Zellen nach Transzytose auf der luminalen Seite präsentiert werden [174].

2.3.2.4 Regulation der Chemokinrezeptor-Aktivität

Die Aktivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann durch die sogenannten Regulatoren des G-Protein-Signallings (RGS) reguliert werden [175]. Diese Proteine sitzen an der Innenseite der Plasmamembran und binden an aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten, welche GTP gebunden haben. Hierbei wirken sie als GTPase-aktivierende Proteine, wodurch die Umbildungsrate von GTP zu GDP erhöht wird. Nach dieser Hydrolyse kann die $G\alpha$ -Untereinheit wieder einen inaktiven

Komplex mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit bilden, der G-Protein gekoppelte Rezeptor wird inaktiviert. Drei der beim Menschen insgesamt 30 bekannten RGS spielen bei B-Zellen eine essentielle Rolle und sollen daher näher beschrieben werden.

RGS1 induziert bei follikulären B-Zellen eine Desensitivierung von CXCR4 und CXCR5, was zur Aufrechterhaltung der Homöostase wichtig ist [176]. RGS13 wird in hohem Maße von B-Zellen unter dem Einfluss von CD40L in Germinalen Zentren produziert. Auch dieses Molekül wirkt durch seine GTPase-Aktivität desensitivierend auf CXCR4 und CXCR5 [177]. RGS16-Expression findet man ebenfalls in Germinalen Zentren. Dieses Protein setzt die Aktivierbarkeit von CXCR4, CCR3 und CCR7 herab [178].

Die Expression von RGS13 und RGS16 durch B-Zellen wird vor der Bildung Germinaler Zentren unter dem Einfluss von IL-17 gesteigert und ist essentiell für die korrekte Ausbildung dieser Strukturen [179].

2.3.3 Folgen der Interaktion zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren

2.3.3.1 Chemokin-induzierte Signale

Wie oben beschrieben, kommt es nach Chemokinbindung an den GPCRs zur Dissoziation der α_i -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Abbildung 3 zeigt, welche Signalkaskaden durch beide Untereinheiten angestoßen werden und worin diese enden. Vor allem die Aktivierung kleiner GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 durch PI3K führt zu Umbauvorgängen im Zytoskelett, wodurch die Polarisation der Zelle als Grundlage der Migration möglich wird. Überdies kommt es zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration. Calcium-Einstrom findet IP_3 -abhängig aus intrazellulären, extrazytoplasmatischen Calcium-Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum und nach dieser ersten Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration über *Calcium-Release Activated Calcium Currents* (CRAC) aus dem extrazellulären Raum statt. Außerdem werden zelluläre Mechanismen wie Proliferation sowie Apoptose über verschiedene Zwischenschritte, die in der Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren resultieren, gesteuert.

2.3.3.2 Polarisation von Zellen als Grundlage der Migration

Um sich aktiv fortbewegen zu können, müssen Zellen ihre Form verändern können. Hierzu ist der Umbau des Zytoskeletts notwendig, der durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Signalmoleküle gesteuert wird. Hierbei kommt vor allem den kleinen GTPasen

wie Rho, Ras und Rac eine bedeutende Rolle zu [180]. Letztlich werden Zytoskelettbestandteile derart umgebaut [181], dass eine Zelle mit einer Vorder- und Hinterseite entsteht [182]. Es bilden sich bei Leukozyten zunächst mehrere als *Lamellipodien* bezeichnete Zellausstülpungen aus, von denen sich eines nach etwa 30 Sekunden stabilisiert. Hier entsteht die zukünftige Vorderseite der Zelle. Am gegenüberliegenden Pol der Zelle bildet sich ein sogenanntes *Uropodium* aus, welches die Polarisation der Zelle vervollständigt [183]. Erst dadurch, dass die Zelle ihre Radiär-Symmetrie einbüßt, kann sie sich an Faktoren in ihrer Umgebung orientieren und zielgerichtet auf etwas zu oder von etwas weg bewegen. Neben den hier beschriebenen Zytoskelett-Umformungen werden durch Chemokinrezeptor-Aktivierung und die nachfolgende Signalkaskade auch Veränderungen auf der Zellmembran induziert, die die Eigenschaften der Zellen stark modulieren (*Inside-Out-Signalling*, Kapitel 2.3.3.3).

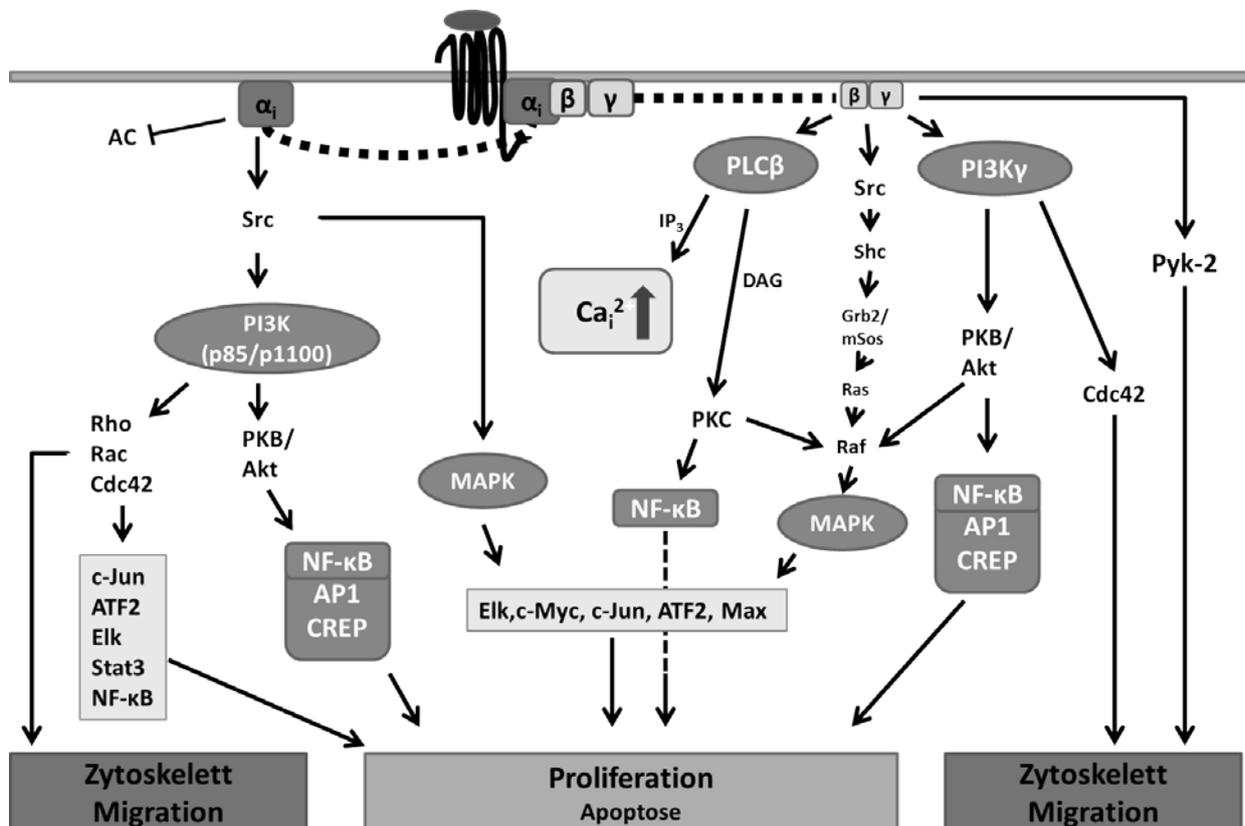


Abbildung 3: Signalkaskaden nach Chemokinrezeptor-Aktivierung (zusammengetragen aus [184-186]).

Die Aktivierung von Chemokinrezeptoren bewirkt eine Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten. Diese induzieren verschiedene Signalkaskaden, die die Migration sowie den Zellzyklus beeinflussen. Die wichtigsten Zwischenschritte sind die Aktivierung der Phosphoinositol-3-kinase (PI3K) sowie der Phospholipase C (PLC). Nachfolgend wird eine Erhöhung des zytoplasmatischen Calcium-Gehaltes sowie die Aktivierung kleiner GTPasen und verschiedener Transkriptionsfaktoren ausgelöst, die zu Veränderungen im Zellzyklus sowie der Migration der Zelle führen.

2.3.3.3 Chemokine aktivieren Integrine

Die Chemokinrezeptor-Aktivierung auf Leukozyten beeinflusst den Vorgang der Extravasation dieser Zellen. Dieser Vorgang beginnt mit der losen Anlagerung im Blutstrom schwimmender Leukozyten an die Gefäß-Auskleidung. Danach Rollen diese Zellen Selectin-vermittelt am Endothel entlang. Ob die Zellen zum Arrest kommen, der für eine Transmigration nötig ist, wird durch die Avidität und Valenz der auf der Leukozyten-Oberfläche exprimierten Integrine bestimmt. Diese Eigenschaften sind wiederum abhängig von der Konformation und der lokalen Konzentration der Integrine auf der Zelloberfläche. An Glykosaminoglykane auf Endothelzellen gebundene Chemokine werden den vorbeihrollenden Leukozyten präsentiert.

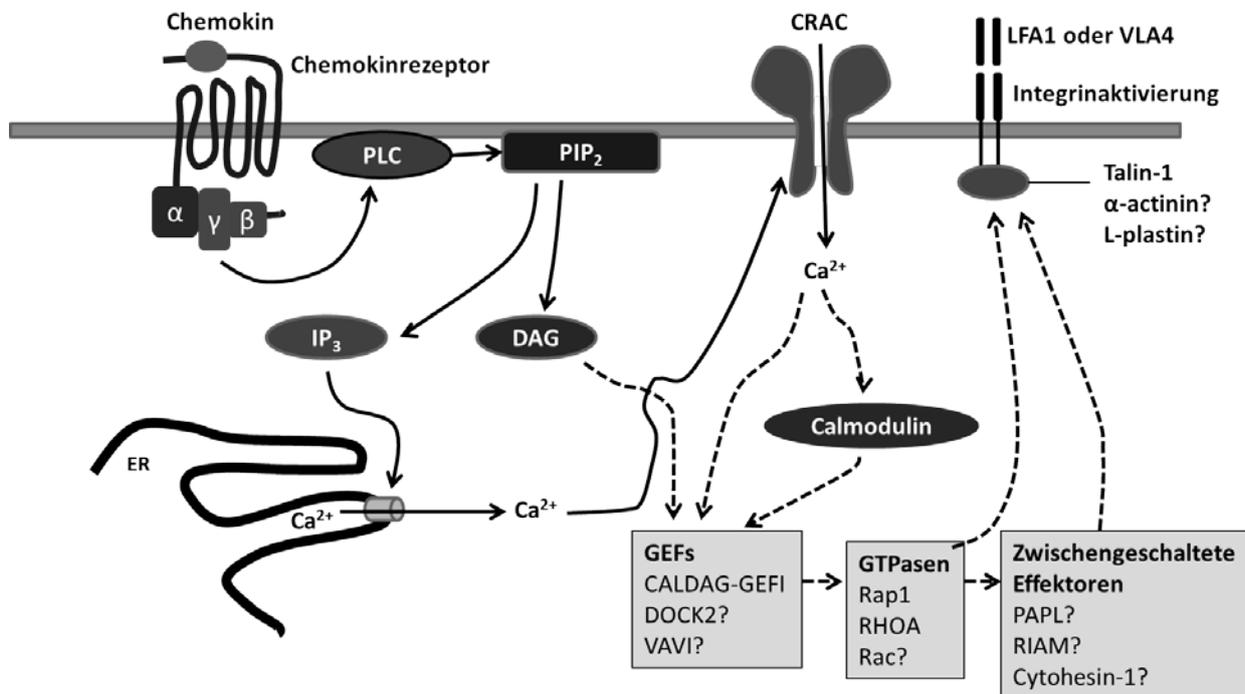


Abbildung 4: *Inside-Out-Signalling* aktiviert Integrine (modifiziert nach [187]).

Zur sogenannten Integrinaktivierung ist eine Aktivierung von Chemokinrezeptoren nötig, was durch auf Endothelzellen präsentierte Chemokine geschehen kann. In der Folge kommt es in der Zelle zu sogenannten *Inside-Out-Signalling*, welche in der Konformationsänderung der Integrine mündet. Durchgehende Pfeile kennzeichnen bewiesene Teile dieser Signalkaskade, gestrichelte Pfeile hingegen wahrscheinliche, jedoch noch nicht vollständig bestätigte Signalwege. Erst nach der Beendigung des Rollens und einem Integrin-abhängigen Arrest können Zellen transzellulär oder parazellulär transmigrieren.

Nach Chemokinrezeptor-Aktivierung kommt es durch das sogenannte *Inside-Out-Signalling* in einem mehrstufigen Prozess zur Integrin-Aktivierung (Abbildung 4). Die schnelle Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt zur Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration sowie zur Produktion von Diacylglycerol (DAG) [188], welche über sogenannte *guanine-*

nucleotide-exchange factors (GEF) [189] kleine GTPasen aktivieren [190]. Kleine GTPasen wiederum können vermutlich die sogenannten Actin-bindenden Proteine wie Talin-1 beeinflussen, welche durch Bindung an bestimmte zytoplasmatische Anteile der Integrin-Moleküle zur Konformationsänderung ebendieser führen [191]. Diese Integrin-Konformationsänderung stärkt die Bindung der Leukozyten an das Endothel, wodurch das Rollen beendet, eine feste Anheftung eingeleitet und eine nachfolgende Diapedese erst möglich wird.

2.3.3.4 Rezeptor-Desensitivierung und Internalisierung nach Ligandenbindung

Auch bei Chemokinrezeptoren kommt es nach Bindung von Agonisten zu der für G-Protein gekoppelte Rezeptoren typischen herabgesetzten Aktivierbarkeit bei abermaligem Agonisten-Kontakt, einem *Desensitivierung* genannten Vorgang. Die Grundlagen für dieses Phänomen sind in verschiedenen Mechanismen zu sehen, die damit eine Dauerstimulation der Zelle vermeiden.

Innerhalb von Sekunden nach Rezeptor-Aktivierung kommt es an den GPCRs zu Phosphorylierungen, wodurch G-Proteine nicht mehr gebunden werden können und die Ligandenbindung folglich nicht mehr zu einer Signalweiterleitung führen kann. Zuständig für solche Phosphorylierungen sind PKA, PKC und GRKs, die Serin- und Threoninreste an den intrazellulären Schleifen und am carboxy-terminalen Ende des Rezeptors phosphorylieren [192, 193].

Nach wenigen Minuten kommt es zur Rezeptor-Internalisierung. Die Mechanismen hierzu können sehr verschieden sein. Beispielsweise lagert sich β -Arrestin an einen zuvor durch Phosphorylierung inaktivierten GPCR an, wodurch dieser zu sogenannten *clathrin-coated pits* innerhalb der Zellmembran transportiert und nachfolgend über eine Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert wird [194]. Die GPCR-enthaltenden Endosomen werden entweder lysosomal abgebaut oder verschmelzen nach einer gewissen Zeit wieder mit der Zellmembran, nachdem sie durch Dephosphorylierung wieder in eine aktivierbare Form gebracht wurden. Es findet somit in gewissem Umfang ein GPCR-Recycling statt, ein Prozess, der *Resensitivierung* genannt wird [195].

Im Gegensatz zur schnellen Desensitivierung und Internalisierung dauert es einige Stunden bis die Transkriptionsraten der Chemokinrezeptor-codierenden Gene je nach aktuellem Bedarf der Zelle erhöht oder verringert werden.

2.4 Die homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13

Die homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13 spielen eine essentielle Rolle während der Wanderung von B-Zellen und stehen im Zentrum dieser Arbeit. Daher sollen die Funktionen dieser beiden Chemokine und ihrer Rezeptoren im Folgenden näher betrachtet werden.

2.4.1 CXCL12 und CXCR4

Das Zusammenspiel zwischen CXCL12 und CXCR4 ist bei Maus und Mensch mittlerweile gut untersucht. Das lange Zeit als monogam angesehene Ligand-Rezeptor-Paar ist während der Ontogenese sowie der Myelo- und Lymphopoese unverzichtbar, wodurch eine absolute CXCL12- beziehungsweise CXCR4-Defizienz bereits in einem frühen Stadium der Ontogenese letal ist [196-198].

1993 wurde die cDNA von CXCL12 aus einer Knochenmarksstroma-Zelllinie isoliert, wobei das mRNA-Produkt zunächst als *stromal-derived factor-1* (SDF-1) bezeichnet wurde [199]. Weiterhin erhielt das Molekül aufgrund seines bei murinen Zellen entdeckten co-mitogenen Effekts im Zusammenspiel mit IL-7 die Bezeichnung *pre-B-cell growth-stimulating factor* (PBSF) [200]. Im Zuge der Vereinheitlichung der Chemokin-Nomenklatur wurde SDF-1 in CXCL12 umbenannt [133]. Mittlerweile ist beim Menschen das Vorkommen von sechs verschiedenen, durch alternatives Spleißen entstehenden CXCL12-Isoformen bekannt: CXCL12 α , β , γ , δ , ϵ und ζ , wobei bislang nur die ersten beiden Isoformen näher charakterisiert sind [201]. Die konformelle Integrität von CXCL12, die zur Interaktion mit seinem Rezeptor nötig ist, wird in flüssiger Umgebung durch die Bindung an Proteine wie beispielsweise HMGB1 (*high mobility group box-1*) aus Dendritischen Zellen und Makrophagen gewährleistet [202]. Im Knochenmark ist eine hohe Expression von CXCL12 durch Stromazellen augenfällig, wo es für das *Homing* und die Retention [41] sowie das proliferative Verhalten [203] der dort residierenden und sich differenzierenden Zellen innerhalb dieses Gewebes essentiell ist. Auch im Thymus ist die Expression von CXCL12 zu finden. Hier bestimmt es neben anderen Chemokinen weite Teile der Wanderungsprozesse während der Thymozyten-Differenzierung mit [204].

Erst nach der Entdeckung von CXCL12 wurde ein potentiell zugehöriger Rezeptor nahezu gleichzeitig, aber unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen beschrieben [205, 206]: der *leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor* (LESTR), der teils auch als fusin

bezeichnet wurde [207]. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass LESTR als Co-Rezeptor für X4-Stämme von HIV-1 dient, wobei der Viruseintritt in CD4⁺ Zellen durch die Applikation von CXCL12 verhindert werden konnte. Später wurde LESTR in CXCR4 umbenannt [133]. CXCR4-Expression ist auf einer Vielzahl verschiedenster Zellen zu finden: unter anderem auf Stammzellen [208], wie beispielsweise bereits auf embryonalen Zellen der Maus im Blastocysten-Stadium oder auf humanen CD34⁺ Knochenmarks-Stammzellen [209], aber auch auf diversen Leukozyten-Populationen, Zellen des zentralen Nervensystems [210] sowie metastasierenden Tumorzellen [211].

CXCR4 ist allerdings nicht der einzige Rezeptor für CXCL12. 2005 wurde erkannt, dass auch CXCR7 ein Rezeptor für CXCL12 ist [212]. CXCR7 gehört zu den in Kapitel 2.3.2 beschriebenen atypischen Chemokinrezeptoren und löst daher nach einer Bindung von CXCL12 keine Chemotaxis aus, sondern spielt als *Decoy*-Rezeptor bei Säugern eine wichtige Rolle bei der Errichtung lokaler Chemokin-Konzentrationsgradienten [213].

Die Expression von CXCR4 auf Zelloberflächen sowie die Aktivität des Rezeptors ist wie auch die der anderen Chemokinrezeptoren nicht statisch, sondern fein reguliert. Neben den in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Mechanismen kommen hierbei weitere Einflussfaktoren zum Tragen. Stress wie beispielsweise Hypoxie bewirkt in Zellen die Induktion vom *hypoxie-inducible factor-1α* (HIF-1α), woraufhin die Expression von CXCR4 gesteigert wird [214]. Parallel hierzu ist unter hypoxischen Bedingungen auch die CXCL12-Expression durch Stromazellen gesteigert [215], was interessant ist, da in einigen Bereichen des Knochenmarks solche hypoxischen Bedingungen herrschen [28]. Andere Faktoren, die zur CXCR4-Expressionssteigerung auf verschiedenen Zelltypen führen können, sind: IL-6 in Verbindung mit *stem cell factor* (SCF) oder *hepatocyte growth factor* (HGF) [216], *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) [217], *transforming growth factor-β* (TGF-β) [218], IL-4, IL-7 sowie IL-15 [219]. Hingegen führen IL-12 und Interferon-γ beispielsweise zu einer Verringerung der CXCR4-Expression [219]. Bei Lymphozyten führt eine Aktivierung des B-Zell-Rezeptors oder T-Zell-Rezeptors zu einer Proteinkinase C-abhängigen CXCR4-Internalisierung [220, 221]. Von myeloiden Knochenmarkszellen ist bekannt, dass sie nach der Einwirkung von *granulocyte and macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) die Oberflächen-Expression von CXCR4 verringern und erst hiernach befähigt sind, aus dem Knochenmark auszuwandern [222]. Ähnliche Mechanismen der CXCR4-Herunterregulation werden für die Emigration lymphoider Knochenmarkszellen angenommen.

Die Aktivierbarkeit von CXCR4 kann durch Anwendung spezifischer CXCR4-Antagonisten gehemmt werden. CXCR4-Antagonisten sind beispielsweise das Bicyclam AMD3100 [223],

welches zur Knochenmarks-Stammzell-Mobilisation beim Menschen unter dem Präparate-Handelsnamen *Mozobil*® (Plerixafor) zugelassen ist, oder der Polyphemusin II-Abkömmling T140 [224], wobei Polyphemusin II ein aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* isoliertes Peptid ist.

2.4.2 CXCL13 und CXCR5

Auf der Suche nach Chemokinrezeptoren, die auf B-Zellen exprimiert werden, stieß man 1992 auf einen Rezeptor von Burkitt-Lymphom-Zellen, der als *Burkitt-Lymphom-Rezeptor-1* (BLR1) [225] oder *monocyte-derived receptor 15* (MDR15) [226] benannt wurde. 1998 wurde ein zum Rezeptor gehörender Ligand gefunden: das *B cell Attracting Chemokine-1* (BCA-1) [227] oder *B lymphocyte chemoattractant* (BLC) [228]. Im Zuge der Vereinheitlichung der Chemokin-Nomenklatur wurde BLR1 in CXCR5 und BCA-1 in CXCL13 umbenannt [133].

Umfangreiche Studien haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen CXCL13 und CXCR5 bei Maus und Mensch eine essentielle Rolle während der Entwicklung physiologisch ausgeprägter lymphatischer Strukturen spielt. CXCR5-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Bildung von Primärfollikeln. Auch Germinale Zentren und inguinale Lymphknoten werden nur bei intakter CXCL13/CXCR5-Achse physiologisch ausgebildet [229]. B-Zellen betroffener Mäuse können zwar in lymphatisches Gewebe einwandern, die Ausprägung typischer B-Zell-Areale innerhalb des lymphatischen Gewebes bleibt allerdings aus [230].

Obwohl CXCR5 vorwiegend von B-Zellen exprimiert wird [231], ist die Expression dieses Chemokinrezeptors auch auf anderen Zelltypen zu finden. Dies wird in den Kapiteln 2.4.3 und 2.4.4 an entsprechenden Stellen näher ausgeführt.

2.4.3 Organogenese unter dem Einfluss homöostatischer Chemokine

Die Entwicklung lymphatischer Strukturen hängt von der Migration verschiedenster Zellen ab. Nicht nur die Zellen, die später das Immungeschehen bestimmen, müssen an den Ort ihrer Bestimmung gelangen, sondern auch andere Zellen wie beispielsweise die sogenannten *Lymphoid tissue inducer cells* (LTi). Hierbei sind die homöostatischen Chemokine CXCL12, CXCL13, CCL19 sowie CCL21 entscheidende Faktoren. CXCL13 ist beteiligt an der Entstehung bestimmter Lymphknoten [232] und führt bei Überexpression zur Entstehung ektopischen lymphoiden Gewebes [233]. CD45⁺ CD4⁺ CD3⁻ LTis exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 [234]. Diese Zellen wandern während der Ontogenese

in Richtung der sogenannten *Lymph node organizers* [235], spezialisierten Stromazellen, die nach Lymphotoxin-Stimulation CXCL13, CCL19 und CCL21 sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, MadCAM-1 und ICAM-1 exprimieren [236]. LTis produzieren ihrerseits Lymphotoxin, sobald sie in der Umgebung der *Lymph node organizers* angekommen sind, was wiederum eine verstärkte Stimulation dieser Zellen auslöst. Hierdurch wird ein optimales Milieu geschaffen, das für die weitere Einwanderung von verschiedenen Chemokinrezeptor-exprimierenden Zellen nötig ist [237].

Naive T-Zellen exprimieren CCR7, den Rezeptor für CCL19 und CCL21. Diese Chemokine werden innerhalb lymphatischer Strukturen vor allem in den sogenannten T-Zell-Arealen synthetisiert und zirkulierenden CCR7⁺ T-Zellen an der luminalen Seite der Endothelien dortiger Gefäße präsentiert, wodurch ein *Homing* der T-Zellen in T-Zell-Arealen möglich wird [45]. Naive B-Zellen hingegen exprimieren CXCR5, und in den B-Zell-Arealen wird das korrespondierende Chemokin CXCL13 produziert [234]. Hierdurch finden sowohl B- als auch T-Zellen ein für ihre Ansprüche jeweils optimiertes Milieu.

2.4.4 Die Germinale Zentrums-Reaktion unter dem Einfluss homöostatischer Chemokine

Im Laufe von Immunreaktionen entwickeln sich aus B-Zell-Follikeln lymphatischer Organe Germinale Zentren. Innerhalb Germinaler Zentren ist zwischen einer dunklen und einer hellen Zone zu unterscheiden [238]. Die dunkle Zone ist von sich teilenden Zentroblasten besiedelt, die sich zu kleineren, mitotisch inaktiven Zentrozyten differenzieren und in die helle Zone wandern. Hier sind neben den Zentrozyten auch folliculäre T-Helfer-Zellen und folliculäre Dendritische Zellen lokalisiert, die mit den Zentrozyten interagieren [48].

In der dunklen Zone des Germinalen Zentrums herrscht eine hohe CXCL12-Konzentration vor, wodurch die Zentroblasten, die eine hohe CXCR4-Expression aufweisen, im Randbereich dieser Struktur zurückgehalten werden. Während ihrer Differenzierung zu Zentrozyten wird die CXCR4-Expression reduziert und die Expression von CXCR5 auf diesen Zellen beginnt zu dominieren. Hierdurch migrieren Zentrozyten in die CXCL13-haltige helle Zone des Keimzentrums [239].

Wie oben erwähnt, findet man in Germinalen Zentren auch folliculäre T-Helfer-Zellen und folliculäre Dendritische Zellen. Diese Zellen exprimieren wie B-Zellen ebenfalls CXCR5, was ihnen ermöglicht, B-Zell-Areale zu besiedeln [240]. Die räumliche Nähe zwischen folliculärer T-Helferzelle und aktivierter B-Zelle ist für das Gelingen einer Germinalen Zentrums-Reaktion unerlässlich [241]. Bei CXCR5-Defizienz der folliculären T-Helfer-Zellen ist die Germinale Zentrums-Reaktion stark vermindert [242]. Als typische T-Zellen exprimieren folliculäre T-

Helferzellen neben CXCR5 auch CCR7. Die Balance zwischen diesen beiden Chemokinen bestimmt, ob die Zelle im B-Zell- oder T-Zell-Areal residiert [243].

Bei B-Zellen findet man neben der CXCR5-Expression in gewissem Ausmaß stets auch die Expression von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptoren. In B-Zell-Follikeln dominiert die CXCL13-Expression gegenüber der von S1P. Auf aktivierten B-Zellen, die bis zur Beendigung ihrer Reifung im B-Zell-Follikel beziehungsweise im Geminalem Zentrum verbleiben sollen, ist die Expression von S1P-Rezeptoren noch gering, wodurch die CXCR5-Expression das Migrationsverhalten bestimmt [244]. Wird die Expression von CXCR5 auf den Zellen vermindert oder die von S1P-Rezeptoren verstärkt, so können diese das B-Zell-Areal verlassen [245].

Das Produkt der Germinalen Zentrums-Reaktion ist die Antikörper-sezernierende Plasmazelle. Diese Zellen reduzieren die Expression von CXCR5, während die CCR7-Expression niedrig und die CXCR4-Expression unverändert hoch bleibt [246]. Die niedrigen CXCR5 und CCR7-Expressionen bewirken, dass die Plasmazellen weder im B- noch im T-Zell-Areal der lymphatischen Strukturen gehalten werden, während die hohe CXCR4-Expression bewirkt, dass Plasmazellen in CXCL12-reiche Lokalisationen wie die rote Milzpulpa, Markstränge von Lymphknoten sowie das Knochenmark migrieren [246].

2.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren beim Huhn

Durch die erfolgreiche Sequenzierung des Hühnergenoms wurde ein entscheidender Schritt zur Identifizierung des Chemokin-Repertoires dieser Tierart gemacht. Young und Kaiser identifizierten im Hühnergenom Gene für 14 CC- und acht CXC-Chemokine sowie für je ein XC- und CX₃C-Chemokin [247]. Teils wurden in dieser Arbeit bislang völlig unbekannte Chemokin-Gene beschrieben, andere waren hingegen bereits unter anderen Namen bekannt.

Beim Menschen sind die Chemokine CXCL1 bis CXCL8 auf Chromosom 4 lokalisiert. In der äquivalenten Region im Hühnergenom, Chromosom 4, befinden sich lediglich drei Gene, die für CXC-Chemokine codieren: CXCLi1, das zuvor bereits als *K60* beschrieben wurde [248], CXCLi2, das vorher unter dem Namen *chemotactic and angiogenic factor* (chCAF) bekannt war [249] und das bis dato nicht beschriebene CXCLi3. CXCLi1 und CXCLi2 sind mit dem humanen CXCL8 verwandt [250]. Das „i“ im Chemokin-Namen soll die Funktion als inflammatorisches Chemokin kennzeichnen [247]. Desweiteren codiert das Hühnergenom fünf weitere CXC-Chemokine mit vermutlich homöostatischer Funktion, die aufgrund der

Orthologie zu Säuger-CXC-Chemokinen folgendermaßen benannt sind: CXCL12, CXCL14 sowie interessanterweise drei Varianten von CXCL13, die als CXCL13 L1, L2 und L3 bezeichnet werden. Zehn der 14 gefundenen CC-Chemokine sind vermutlich inflammatorische Chemokine und werden daher CCL1-10 genannt. Diese konnten bislang keinen direkten Orthologen in einem Säuger genom zugeordnet werden. Allerdings ist eine Einteilung in zwei Untergruppen möglich: Vier gehören zur *macrophage inflammatory protein*-Familie (MIP-Familie), die anderen sechs zur *monocyte chemoattractant protein*-Familie (MCP-Familie). Die restlichen vier, vermutlich homöostatischen CC-Chemokine haben wiederum direkte Orthologe im Säuger-System: CCL17, CCL19, CCL20 sowie CCL21.

Im Hühner genom wurden einige Chemokinrezeptoren gefunden, die direkte Orthologe in Säugersystemen haben: CXCR1, CXCR4, CXCR5, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8 sowie CCR9. Überdies existieren drei weitere CC-Rezeptoren ohne Orthologe in Säuger genom (CCRa-c).

Vergleicht man die Anzahl der hier genannten Chemokine sowie Chemokinrezeptoren, die im Hühner genom identifiziert werden konnten, mit der Anzahl derer, die in sequenzierten Säuger genom bekannt sind (beispielsweise beim Menschen, siehe Tabelle 2), so fällt auf, dass das Chemokin-Netzwerk beim Huhn weniger vielfältig zu sein scheint.

2.5.1 CXCL12 und CXCR4 beim Huhn

chCXCR4 wurde bereits 2001 kloniert [251]. Die Expression von chCXCR4-mRNA war im zentralen Nervensystem, der Bursa, aber auch Leber, Darm, embryonalen Fibroblasten sowie Leukozyten nachzuweisen. Bereits im Stadium der Gastrulation war chCXCR4-mRNA mittels *in-situ*-Hybridisierung in Hühnerzellen zu finden [252]. 2005 gelang es Read et al., chCXCL12 zu klonieren [253]. Mittlerweile ist auch bekannt, dass zwei Isoformen des chCXCL12-Proteins existieren: chCXCL12 α und chCXCL12 β .

Versuche, bei denen mit chCXCR4-transfizierte CHO-Zellen untersucht wurden, zeigten, dass chCXCR4 funktionell mit humanem CXCL12 interagiert. Hierfür wurden Bindungs-Assays unter Verwendung radioaktiv markierter huCXCL12-Moleküle sowie Calciumflux-Messungen durchgeführt [251]. chCXCL12 hat, verglichen mit verschiedenen Säugerspezies wie Maus, Mensch und Ratte eine Sequenzhomologie von lediglich 40-75%. Trotzdem verdeutlichten EDV-gestützte Simulationsversuche, dass die Tertiärstruktur von chCXCL12 der anderer untersuchter Tierarten sehr ähnlich ist [253].

CXCR4 ist beim Huhn an gestaltgebenden Vorgängen während der Ontogenese beteiligt. Die Expression von chCXCR4 wurde in Vorläufern von Muskelzellen via *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen [254] und die Inhibition von chCXCR4 durch Polyphemusin II-Derivate führte zu einer verminderten Einwanderung von myogenen sowie angiogenen Zellen in die Gliedmaßen-Anlagen von Hühnerembryos [255]. Auch die physiologische Ausbildung der Kloakenmuskulatur [256] sowie die Migration von primordialen Keimzellen während der Ontogenese ist beim Huhn durch CXCR4-abhängige Chemotaxis bestimmt [257].

2.5.2 CXCR5 und die drei CXCL13-Isoformen beim Huhn

ChCXCR5 und drei Isoformen von chCXCL13 (chCXCL13 L1, chCXCL13 L2 sowie chCXCL13 L3) wurden im Genom des Huhnes identifiziert [247].

Über mögliche Gründe, weshalb das Hühnergenom drei verschiedene chCXCL13-Isoformen codiert, kann bislang nur spekuliert werden. Möglicherweise ist die Expression dieser drei Isoformen Gewebe- oder Situations-spezifisch. Die exakte Lokalisation sowie der Verlauf der Expression von chCXCR5 und seiner potentiellen Liganden während der Ontogenese sowie im Verlauf von Immunreaktionen wurden bislang noch nicht untersucht.

3 ZIELSETZUNG

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR5 spielen bei der Migration von Säugetier-B-Zellen eine essentielle Rolle. Da sich das B-Zellsystem beim Vogel in seiner Entwicklung und Struktur deutlich von dem des Säugers unterscheidet, war es Ziel dieser Arbeit, eine mögliche Rolle von CXCR4 und CXCR5 in der B-Zellentwicklung des Huhnes zu untersuchen. Hierzu sollten zum einen monoklonale Antikörper gegen diese Chemokinrezeptoren generiert werden, um deren Oberflächen-Expression auf B-Zellen verschiedener Entwicklungsstadien charakterisieren zu können. Darüber hinaus sollte die Expression der jeweiligen Liganden, CXCL12 für CXCR4 und CXCL13 mit seinen drei Isoformen L1-L3 für CXCR5, mittels qRT-PCR untersucht und eine mögliche Rezeptoraktivierung durch rekombinantes Chemokin sowie die Induktion von Zellmigration nachgewiesen werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Tiere und Tierhaltung

4.1.1 Hühner

Für die Gewinnung von primären Hühner-Leukozyten aus Blut und Organen wurden Hühner der Linien M11 (B^{2/2}-Haplotyp) und LSL (Lohmann's Selected Leghorn) verwendet. Eier der M11-Linie wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee zur Verfügung gestellt. Eier der Linie LSL stammten von LSL-Rhein-Main Geflügelvermehrung GmbH, Dieburg.

Die Eier wurden am Institut für Tierphysiologie der LMU München unter Standardbedingungen bebrütet. Die Tiere wurden nach dem Schlupf in Kleingruppen zu vier bis acht Tieren in Volieren gehalten. Die Hühner erhielten handelsübliches Alleinfuttermittel für Legehennen. Die Wasserversorgung erfolgte ad libitum.

4.1.2 Mäuse

Die zur Erzeugung der monoklonalen Antikörper benötigten Balb/c-Mäuse wurden von der Firma Charles River, Wilmington/USA erworben und im Alter von 26 Tagen aufgestellt. Die Mäuse wurden in Kleingruppen zu vier bis fünf Tieren in offener Käfighaltung gehalten. Die Käfige waren mit Beschäftigungsmaterial sowie mit Mäusehäusern aus Plastik ausgestattet. Alleinfuttermittel für Mäuse sowie Wasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

Die Immunisierungen der Mäuse erfolgten mit Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern unter der Anzeigennummer 55.21-1-54.2531.6-12-09.

4.2 Gewinnung primärer Leukozyten

Material:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

8,00g Natriumchlorid (NaCl) ¹

1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O) ¹

0,2g Kaliumchlorid (KCl) ¹

0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) ¹

ad 1000ml Aqua dest.

Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2. Für Arbeiten in der Zellkultur wurde die Lösung autoklaviert.

Biocoll Separating Solution ²**Trypanblau-Lösung** ²**Zählkammer, modifiziert nach Neubauer** ²⁷**Heparinlösung (500 U/ml)**

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml) ³

45 ml RPMI 1640 with Glutamax ⁴

Die Lösung wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.

NH₄Cl-Lösung

155mM NH₄Cl: 8,29g/l ¹

10mM KHCO₃: 1g/l ¹

0,1mM EDTA: 0,03g/l ¹

4.2.1 Gewinnung von Leukozyten aus dem Blut

Zur Blutentnahme wurden Spritzen mit etwa 0,2 ml Heparinlösung (500U/ml) beschichtet und Kanülen der Größe 0,7 x 40 mm benutzt. Als Ort der Blutentnahme wurden die Vena jugularis dextra oder die Vena unlaris gewählt.

4.2.1.1 Gewinnung peripherer Blutleukozyten mittels Slow-Speed-Zentrifugation

Die heparinisierte Vollblutprobe wurde in ein 15ml-Probenröhrchen überführt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur und 600xg zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation den Erythrozyten aufliegenden Lymphozyten wurden vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette aufgewirbelt, anschließend wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Probenröhrchen gegeben. Die gewonnenen Lymphozyten wurden zweimalig mit PBS pH7,2 gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 225xg).

4.2.1.2 Gewinnung peripherer Blutleukozyten mittels Dichtegradient-Zentrifugation

Die heparinisierten Vollblutproben wurden 1:2 mit PBS pH7,2 verdünnt. Das gleiche Volumen an Biocoll Separating Solution wurde verwirbelungsfrei mit der verdünnten Vollblutprobe in einem Probengefäß angemessener Größe überschichtet. Die durch die anschließende zwölfminütige bremsfreie Zentrifugation bei 4°C und 650xg mit langsamer Beschleunigung erzeugte Leukozyten-enhaltende Interphase wurde abgenommen und zweimalig mit PBS pH7,2 gewaschen.

4.2.2 Gewinnung von Leukozyten aus Organen

Die Organe der Hühner wurden nach Betäubung und Tötung durch Blutentzug entnommen. Für die Entnahme von Organen zur anschließenden Verwendung in Kurzzeit-

Kulturen primärer Zellen wurde steriles Besteck verwendet. Nach der Entnahme wurden die Organe in 4°C kaltes PBS pH7,2 aufgenommen und unverzüglich weiterverarbeitet.

4.2.2.1 Gewinnung von Leukozyten aus Milz, Bursa und Thymus adulter Hühner

Zur Herstellung einer Einzelzell-Suspension wurden die Organe nach Eröffnung der Organkapseln mittels Spritzenstempel und Zellsieb in PBS pH7,2 homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein neues 50ml-Probenröhrchen überführt und dieses nachfolgend mit kaltem PBS aufgefüllt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten zur Sedimentation auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend großzügig und sedimentfrei abgenommen, in ein frisches Probenröhrchen geeigneter Größe überführt und 10 Minuten lang bei 4 °C und 225xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10ml PBS pH7,2 resuspendiert und eine Dichtegradient-Zentrifugation mit Biocoll Separating Solution wie in 4.2.1.2 durchgeführt.

4.2.2.2 Gewinnung von Leukozyten aus Caecaltonsillen

Die Darmstücke, die die Caecaltonsillen enthielten, wurden der Länge nach aufgeschnitten, mit der Darm-Innenseite nach unten auf ein Zellsieb gelegt und die Zellen mittels Spritzenstempel und Zellsieb gewonnen. Die Zellsuspension wurde nach 10-minütiger Sedimentation auf Eis in ein frisches Falcon gegeben und für 10 Minuten bei 4°C und 225xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS pH7,2 resuspendiert und in ein 5ml-Probenröhrchen überführt. Zuvor war eine 1ml-Spritze mit aufgesetzter 20G-Kanüle luftblasenfrei mit 1 ml Ficoll Separating Solution befüllt worden. Diese Spritze wurde nun zur verwirbelungsfreien Unterschichtung der Zellsuspension benutzt. Anschließend wurde eine Dichtegradient-Zentrifugation durchgeführt.

4.2.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden die Oberschenkel-Knochen der Hühner entnommen, die proximalen und distalen Enden der Knochen mittels Knieschere entfernt und anschließend die Knochenmarkshöhle mithilfe einer Spritzen-Kanülen-Kombination mit PBS pH7,2 ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde durch ein Zellsieb homogenisiert. Nach 10-minütiger Sedimentation auf Eis wurde die Zellsuspension in ein neues Probenröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C und 225xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des kompletten Überstandes wurde das fünffache Volumen des Zellpellets an NH₄Cl-Lösung zu den Zellen gegeben, kurz leicht durchmischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, wobei es zur Erythrolyse kam. Anschließend wurden

die Zellen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 225xg pelletiert und abschließend zweimalig in PBS pH7,2 gewaschen.

4.2.2.4 Gewinnung von Leukozyten aus embryonalen Organen

Die Entnahme von Milz, Bursa und Thymus von 14- und 18-Tage alten Hühnerembryonen erfolgte nach zügiger Dekapitation der Embryonen nach Eröffnen der bebrüteten Eier. Die Organe wurden in Portionen zu vier bis acht Organen in 1ml PBS in 5ml-Probenröhrchen gesammelt. Anschließend wurden mittels 1ml-Spritzen Einzelzellsuspensionen hergestellt und zusätzlich 1ml PBS zugegeben. Nach 10-minütiger Sedimentation auf Eis wurde die Zellsuspension sedimentfrei in ein neues 5ml-Probenröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde mit 1ml Biocoll Separating Solution unterschichtet, wonach eine Dichtegradient-Zentrifugation durchgeführt wurde.

4.2.3 Qualitative und quantitative mikroskopische Beurteilung der Leukozyten

Nach der Gewinnung der Leukozyten wurde jeweils eine Lebend/Tot-Färbung mittels Trypanblau durchgeführt. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspensionen mit 10µl Trypanblau-Lösung gemischt und die Anzahl sowie die Viabilität der Zellen in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Medien und Zusätze

Die Lagerung der nachfolgend aufgeführten Reagenzien erfolgte, wenn nicht anders angegeben bei 4°C.

Standardmedium

445ml RPMI 1640 with Glutamax⁴

50ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)²

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100IU/ml; Streptomycin 100µg/ml)²

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

Selektionsmedium bei der Erstellung stabil transfizierter Zelllinien

447,5ml RPMI 1640 with Glutamax⁴

50ml FBS²

2,5ml G418 (50mg/ml-Stammlösung)²

HEK-Medium, serumfrei⁵

B Zell-Medium

445ml RPMI 1640 with Glutamax⁴
40ml FBS²
10ml Hühnerserum⁴
5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²

DT40-Medium

444ml RPMI 1640 with Glutamax⁴
50ml FBS²
5ml Hühnerserum⁴
1ml β -Mercaptoethanol (50mM)⁴

Medium für HD11-Zellen

445ml RPMI 1640 with Glutamax⁴
40 ml FBS²
10ml Hühnerserum⁴
5 ml Penicillin/Streptomycin²

Fusionsmedium

425ml Iscove Basal Medium²
50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG²
10ml HAT-Supplement (50x)⁴
5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²
10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63)⁶

Erhaltungsmedium

425ml Iscove Basal Medium²
50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG²
10ml HT-Supplement (50x)⁴
5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²
10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63)⁶

Hybridoma-Medium

445ml Iscove Basal Medium²
50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG²
5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²

Einfriermedium

9ml FBS²
1ml DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH₃)₂SO)¹

4.3.2 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
HEK-293	Embryonale Nierenzellen	Mensch	Standardmedium	[258]
HEK-293-T	Embryonale Nierenzellen	Mensch	Standardmedium	[259]
DT40	Bursale B-Zellen	Huhn	DT40-Medium	[260]
2D8	B-Zellen	Huhn	Standardmedium	[261]
HD11	Myeloide Zellen	Huhn	HD11-Medium	[262]
SP2/0	Myelomzellen	Maus	Hybridoma-Medium	[263]

4.3.3 Kultivierung primärer Zellen

Bei der Kultivierung primärer Leukozyten aus Milz und Bursa wurden die Zellen in B-Zell-Medium aufgenommen und in einer Dichte von 5×10^5 c/Delle für 24h in sterilen 96-Loch-Flachbodenplatten bei 40°C inkubiert. Die Stimulation der Leukozyten mit chCD40L erfolgte in einer Konzentration von 1µg/ml [264].

4.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zelldichte jeweils auf 5×10^6 c/ml in kaltem Einfriermedium eingestellt und diese in Aliquots zu 1,5ml in Kryovials weggefroren. Die Kryovials wurden über Nacht in einer isopropanolhaltigen⁷ Einfrierbox in einen -80°C-Gefrierschrank mit einer Kühlrate von 1°C/min gestellt. Danach wurden die Zellen zur Langzeit-Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff⁸ überführt.

4.3.5 Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Kryovials wurden unter Schwenken im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und möglichst rasch in ein 50ml-Probenröhrchen überführt. Danach wurde zum Verdrängen des zytotoxischen DMSO zunächst tropfenweise kaltes RPMI unter Schwenken des Röhrchens zugegeben. Ab einer Füllmenge von etwa 10ml wurde das Röhrchen zügig mit RPMI aufgefüllt und bei 225xg und 4°C 10min lang zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zweimalig in PBS gewaschen, anschließend zur weiteren Kultivierung in entsprechendes Medium aufgenommen und in eine Petrischale oder Zellkulturflasche angemessener Größe gegeben.

4.4 RNA-Präparation

Material:**RNAlater**⁹**10%ige SDS-Lösung**¹**peqGold Trifast**¹⁰**1,4mm Zirkoniumoxide Beads**¹⁰**Chloroform**¹**75%ige Ethanol-Lösung**¹**Nucleasefreies Wasser**¹³

Embryonales Gewebe wurde nach der Entnahme nach Herstellerangaben in RNAlater überführt. Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurden mit RNasefreiem Einwegmaterial gearbeitet und alle Geräte, Arbeitsflächen und Handschuhe mit 10%iger SDS-Lösung behandelt.

Zur Homogenisierung der Gewebe wurden jeweils 50-100mg Gewebe in 1ml Trizol aufgenommen und mittels 1,4mm Zirkoniumoxide Beads im Precellys24 10 Sekunden lang bei 6000rpm zerkleinert. Danach wurde die RNA jeweils ohne Zwischenlagerung der Homogenate mittels Guanidin-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierzu wurde zu den homogenisierten, in Trizol gelösten Organen 200µl Chloroform gegeben. Diese Mischung wurde 30 Sekunden lang kräftig in der Hand geschüttelt und nachfolgend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Mixturen für 15 Minuten bei 12000xg und 4°C zentrifugiert, während in frische 2ml Eppendorf-Cups je 500µl Chloroform vorgelegt wurden. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und zum vorgelegten Chloroform gegeben. Die Chloroform-Mischung wurde nach vorsichtigem Schwenken für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach nochmals für 10 Minuten bei 12000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 1ml 75%igem Ethanol gelöst und für 5 Minuten bei 7500xg und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das entstandene RNA-Pellet etwa 30 Minuten unter der sterilen Werkbank mit offenem Deckel getrocknet. Danach wurde das trockene RNA-Pellet in etwa 100µl nucleasefreiem Wasser gelöst, indem das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten bei

58°C inkubiert wurde. Die RNA-Konzentration der Probe wurde mittels spectrophotometrischer Messung bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

4.4.1 Bestimmung der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyser

Material:

RNA 6000 Nano-Kit¹¹

Um die RNA-Qualität zu bestimmen wurde die Lab-on-a-Chip Technologie des Bioanalyser-Systems von Agilent verwendet, mit dessen Hilfe die Integrität der RNA auf Basis der Kettenlängen der 18S und 28S rRNA digital bestimmt werden kann. Der Zahlenwert des Verhältnisses dieser Kettenlängen zueinander wird als RIN (*RNA Integrity Number*) bezeichnet und kann Werte von 1 (stark degradierte RNA) bis 10 (intakte RNA) annehmen. Die RNA-Proben wurden nach Hersteller-Angaben auf den Chip aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels „Agilent 2100 Expert“-Software. Für weiterfolgende Experimente wurden nur RNA Proben mit einer RIN größer 7 verwendet.

4.5 cDNA-Synthese

Material:

RNA-Proben

RNase-freie DNase I¹²

GoScriptTM Reverse Transcription System¹³

Vor jeder cDNA-Synthese wurde zunächst ein DNase-Verdau der RNA-Proben mittels RNase-freier DNase I nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Danach wurden exakt 400µg der DNase-verdauten RNA-Proben unter Verwendung des *GoScriptTM Reverse Transcription Systems* nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

4.6 Erstellen von Primern

Alle Primer wurden unter Verwendung der Software *Primer Express 3.0* von Applied Biosciences erstellt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

4.6.1 Primer für die konventionelle PCR

Bei den Klonierungsprimern wurden passende Schnittstellen für die jeweiligen zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme angefügt.

Tabelle 4: Klonierungsprimer

Zielgen	Sequenz	Restriktionsenzyme	Verwendung
chCXCR4 fw	ATGGATCCGACGGCAGCATGGACG	BamHI	4.11.1.1
chCXCR4 rev	ATGAATTCCTAGCTGGAATGGAACTTG	EcoRI	4.11.1.1
chCXCR5 fw	GTGAATTCaGGGCCTGTCAGCTACTCAT	EcoRI	4.11.1.2
chCXCR5 rev	AGTCTAGATTAGAAAGTGGAGATGGAGG	XbaI	4.11.1.2
chCXCR4 fw	GATGGACGGCAGCATGGACGGTTTG	TOPO	4.11.2.1

4.6.2 Primer für die quantitative PCR

Bei der Erstellung der qPCR-Primer-Paare wurde auf eine Maximalgröße der Amplificate von 150bp und eine einheitliche Annealing Temperatur von 59°C geachtet. Die Spezifität der Primerpaare wurde mittels Sequenzierung der amplifizierten DNA durch die Firma GATC, Konstanz bestätigt.

Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR

Zielgen	Sequenz	Amplikonlänge (bp)
chCXCR4	CTGTGGCTGACCTCCTCTTTG	86
chCXCR4	ACACAGGACATTTCCGAAGTACC	86
chCXCR5	CGCTCGCCTATCTGCTTATGT	103
chCXCR5	AAGTTTTTCGGTGGTTGTTCTGA	103
chCXCL12	CTCAAGAGCAACAGCAAGCAA	150
chCXCL12	GCCCTTAACGTTCTACCCTTGA	150
chCXCL13L1	TGCCGGAGGAAAGAGATCAT	116
chCXCL13L1	TTGCTGACATCCGTCTGTGTC	116
chCXCL13L2	GCCAACGGCAACCTGAACT	80
chCXCL13L2	ACCTCGACGCTCTCATATTTCC	80
chCXCL13 L3	AGCAGCCATCCTGGAAGTAAAC	112
chCXCL13 L3	TGCTTCCCACTGGCCTTAAC	112
18S rRNA	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	136
18S rRNA	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA	136

4.7 Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird anhand einer Nucleinsäure-Matrize unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und sequenzspezifischen Primern die Amplifikation einer bestimmten genspezifischen Nucleinsäuresequenz erreicht. Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler nach einem definierten Temperaturprogramm. Ein Amplifikationszyklus besteht aus 3 Phasen:

- 1) Denaturierung des Nucleinsäure-Doppelstranges bei 95°C
- 2) Anlagerung der Primer an den Matrizenstrang bei spezifischen Temperaturen
- 3) Elongation bei 72°C.

Zur Herstellung von in der Klonierung eingesetzten Inserts wurden PCR-Reaktionen mittels *Phusion Hot Start II Polymerase* genutzt. Zur Quantifizierung des mRNA-Gehaltes verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren in unterschiedlichen Gewebeproben wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt.

4.7.1 Polymerase Kettenreaktion mittels *Phusion Hot Start II Polymerase*

Zur möglichst fehlerfreien Amplifikation von Gensequenzen zur anschließenden Klonierung in einen Expressionsvektor wurde die *Phusion Hot Start II Polymerase* verwendet, da diese Polymerase eine besonders niedrige Fehlerrate beim Einbau neuer Nucleotide während der Amplifikation der DNA gewährleistet. Den Amplifikationszyklen wurde eine initiale Denaturierung bei 95°C für 15min vorgeschaltet sowie eine finale Elongation bei 72°C für 10min nachgeschaltet.

Reaktionsansatz:

- | | |
|--------|--|
| 5,0µl | 5X Buffer with MgCl ₂ ¹² |
| 18,5µl | nukleasefreies H ₂ O ¹³ |
| 5,0µl | dNTPs ¹² |
| 10,0µl | Primer sense (1pmol/µl) ¹² |
| 10,0µl | Primer antisense (1pmol/µl) ¹² |
| 1,0µl | Template |
| 0,5µl | <i>Phusion Hot Start II</i> ¹² |

4.7.2 Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion

Für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde der *Promega GoTaq qPCR Master Mix* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die zu analysierenden cDNA-Proben wurden zuvor auf 2ng/µl verdünnt.

Reaktionsansatz:

1,5µl	Primer sense (300nm) ¹⁴
1,5µl	Primer antisense (300nM) ¹⁴
4,25µl	nukleasefreies H ₂ O ¹³
12,5µl	<i>GoTaq Masrermix</i> ¹³
0,25µl	<i>100X CXR Reference Dye</i> ¹³
5µl	cDNA, verdünnt auf 2ng/µl

Die Reaktionen wurden jeweils als Duplikate angesetzt und mittels des *7300 Real-Time PCR Systems* von Applied Biosciences analysiert.

Tabelle 6: Protokoll der durchgeführten qRT-PCR

Initiationsphase	1x	59°C	15 Minuten
Amplifikationsphase	Denaturierung	94°C	15 Sekunden
	Annealing	59°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	30 Sekunden

Nachfolgend wurde zur Überprüfung der Amplifikations-Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zur Normalisierung der Daten wurde der gemittelte *cycle treshold* (Ct)-Wert des *housekeeping* Gens 18S rRNA von dem gemittelten Ct-Wert des Zielgens abgezogen um den dCt-Wert zu erhalten. Nach Subtraktion des dCt-Wertes der Bursa-Probe von Emryonaltag 14 von den anderen erhaltenen dCt-Werten konnte der ddCT-Wert bestimmt und die Expression des Gens im Vergleich zur ET14-Bursa-Probe ermittelt werden, indem der erhaltene ddCt-Wert in die Gleichung : n-fache Expression = 2^{-ddCT} eingesetzt wurde.

4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Material:

5X Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

54g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) ¹

27,5g Borsäure ¹

20ml 0,5M EDTA, pH8,0 ¹

Ad 1000ml Aqua dest

0,5X Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

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

6X DNA Loading Dye mit Gelred

GelRed™ Nucleid Acid Stain (10000X in water) ¹⁵ wurde 1:100 in *6X DNA Loading Dye* ¹² verdünnt

DNA-Marker (*DNA-Ladder-Mix* ¹² oder *GeneRuler™50bp DNA Ladder* ¹²) mit Gelred

100µl Marker

400µl nucleasefreies Wasser ¹³

100µl 6x loading dye mit Gelred

Die 0,7 bis 2,0%igen Agarosegele wurden stets unmittelbar vor der Verwendung gegossen. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen, in ein abgemessenes Volumen an 0,5X TBE-Puffer gegeben und in einem Mikrowellenherd bis zum Klarwerden der Lösung erhitzt. Danach wurde die Lösung nach kurzem Abkühlen blasenfrei in eine Gießvorrichtung mit eingespanntem Probenkamm gegossen, nach 30 Minuten Aushärtezeit wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer überführt und mit 0,5X TBE überschichtet. Die Proben wurden nach Mischen mit *6xLoading Dye mit GelRed* (5 Teile Probe + 1 Teil *Loading Dye*) in die Taschen des Gels gegeben. Als Referenz wurde eine Geltasche mit DNA-Marker befüllt. Bei 0,7-1,5%igen Gelen wurde eine konstante Spannung von 100V für 30 Minuten angelegt, bei 2%igen Gelen eine Spannung von 50V für 60 Minuten. Die entstandenen DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und entweder mittels des *Image Quant 300* Systems fotografisch festgehalten oder für eine spätere Verwendung der DNA mit einem Skalpell ausgeschnitten.

4.9 DNA-Aufreinigung

Material:

*Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*¹³

DNA-haltige Probe

Zur Aufreinigung der DNA sowohl aus Agarosegelen als auch aus PCR-Reaktionen wurde das *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Angaben des Herstellers.

4.10 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktions-Endonukleasen

Material:

DNA (PCR-Produkt oder Plasmid)

Restriktions-Endonukleasen¹²

Enzym-spezifische Reaktions-Puffer¹²

Diese wurden mittels <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest> recherchiert.

Durch einen DNA-Verdau mittels Restriktions-Endonukleasen wurden Plasmide für eine spätere Klonierungsreaktion linearisiert und die DNA-Endstücke der Plasmide und der PCR-Produkte derart gestaltet, dass diese für eine spätere Ligation zur Verfügung standen. Außerdem wurde diese Technik für die Erfolgskontrolle der Ligationsreaktionen benutzt. Alle Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt und inkubiert.

4.11 Klonierung

4.11.1 Klonierung mittels Ligation nach Restriktions-Endonuklease-Verdau

4.11.1.1 Dephosphorylierung mittels FastAP

Material:

*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase*¹²

*10X FastAP™-Puffer*¹²

Plasmid-DNA, vorbehandelt durch Restriktions-Endonukleasen

Zur Dephosphorylierung der jeweils verwendeten Plasmide wurde *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 4µg Vektor-DNA aufgeteilt auf 4 Ansätze dephosphoryliert, die dephosphorylierten Vektoren anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt und die DNA-Konzentration spectrophotometrisch bestimmt.

4.11.1.2 Ligationsreaktion

Material:

*T4 DNA Ligase*¹²

*10X T4 DNA Ligase-Puffer*¹²

Dephosphorylierter Vektor, mit Restriktions-Endonukleasen vorbehandelt

Insert, mit Restriktions-Endonukleasen vorbehandelt

Für die Ligationsreaktionen wurden die Ligationsansätze unter Verwendung von T4-Ligase nach Herstellerangaben pipettiert und inkubiert.

Zur Ligation wurden je 100ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Insert wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Menge Insert für 1X} = \frac{\text{Eingesetzte Menge Vektor} \times \text{Anzahl pb Insert}}{\text{Anzahl bp Vektor}}$$

Nach Berechnung der einzusetzenden Mengen an Insert (dreifache, fünffache, achtfache Menge des errechneten 1X-Wertes) wurden jeweils ein 3X-Ansatz, ein 5X-Ansatz und ein 8X-Ansatz pipettiert, außerdem ein Ansatz ohne Insert als Negativkontrolle.

Im Folgenden sind die jeweiligen Klonierungsstrategien detailliert dargestellt.

4.11.1.3 Klonierung von chCXCR4 in PCR3-HA-FLAG

Material:

cDNA einer Hühner-Bursa

Restriktionsenzyme (BamHI, EcoRI)¹²

PCR3-HA-Flag (Vektor)

chCXCR4 sollte zur eukaryotischen Expression über die Restriktionsenzym-Schnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor PCR3-HA-Flag kloniert werden, der nach Transfektion von eukaryotischen Zellen ein chCXCR4-Protein liefern sollte, das an der Zelloberfläche exprimiert wird und an dessen N-terminalen Ende, welches sich extrazytoplasmatisch an der Zellaußenseite befindet, ein mittels anti-FLAG-Antikörper nachweisbares FLAG-Tag angefügt ist.

Hierfür wurde wie in 4.7.1 beschrieben ein Insert über eine PCR hergestellt. Template hierfür war die Bursa-cDNA eines adulten Huhnes der Linie M11 aus der institutseigenen cDNA-Bank. Dieses wurde nach Restriktions-Enzym-Verdau in den ebenfalls Restriktions-Enzym-verdauten Vektor PCR3-HA-Flag kloniert.

4.11.1.4 Klonierung von chCXCR5 in p3XFLAG-myc-CMV25

Materialien:

Restriktions-Endonukleasen (EcoRI, XbaI, SmaI) ¹²

chCXCR5 in pcDNA3 ¹⁶

p3XFLAG-myc-CMV25

Auch hier war das Ziel wie bei 4.11.1.1 ein chCXCR5-Protein, das nach Transfektion einer eukaryotischen Zelle an der Zelloberfläche exprimiert wird und am N-Terminus ein dreifaches FLAG-Tag trägt. Die ausgewählten Restriktionsenzym-schnittstellen waren EcoRI und XbaI. Als Template für die PCR zur Herstellung des CXCR5-Inserts das Plasmid mit der laborinternen Nummer K120 (chCXCR5 in pcDNA3), das zuvor mittels SmaI-Restriktionsenzym-Verdau linearisiert wurde. Die weiteren Schritte der Klonierung erfolgten nach oben beschriebenem Schema.

4.11.1.5 Klonierung von chCXCL12a in pcIpac

Material:

chCXCL12a in pMA ¹⁷

pcIpac ⁴

Ziel war hier ein chSDF-1a, das nach Transfektion eukaryotischer Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben wird und für funktionelle Tests verwendet werden kann. Hierfür wurde die chSDF-1a-DNA-Sequenz von GeneArt, Regensburg synthetisiert und in einem Standard-Vektor zur prokaryotischen Plasmid-Vermehrung erworben. Mit diesem Plasmid wurden One Shot®TOP10 chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, in LB-Medium hochgeschüttelt und aus diesen Bakterien größere Mengen Plasmid gewonnen. Der Vektor pcIpac wurde von Invitrogen erworben. Die Restriktionsenzym-Schnittstellen waren bei dieser Klonierung NotI und EcoRI. Die weiteren Schritte der Klonierung erfolgten wie oben beschrieben.

4.11.2 TOPO-Klonierung mittels *CT-GFP Fusion TOPO®TA Expression Kit*

Material:

*CT-GFP Fusion TOPO®TA Expression Kit*⁴

In diesem Kit zur TOPO-Klonierung ist der vorbereitete, linearisierte pcDNA3.1-CT-GFP-TOPO-Vektor enthalten, der mit einem Insert über 3' A-Überhänge ligiert werden kann und nach Transfektion einer eukaryotischen Zelle ein Protein liefert, an dessen C-terminalem Ende ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) angehängt ist.

4.11.2.1 Klonierung von chCXCR4

Das Insert mit der chCXCR4-Sequenz wurde via PCR gewonnen. Template für diese PCR war die Bursa-cDNA, die in 4.11.1.1 verwendet wurde. Dieses Amplifikat war nach Anfügen von 3' A-Überhängen mit dem vorbereiteten pcDNA3.1-CT-GFP-TOPO-Vektor ligierbar. Hierfür wurde das gewonnene PCR-Produkt ohne Pufferwechsel mit 1U Taq Polymerase¹² versetzt und 10 Minuten lang bei 72°C inkubiert.

Nach diesem Zwischenschritt wurde der Ligationsansatz wie folgt pipettiert:

4,0µl	PCR-Produkt mit 3' A-Überhängen
1,0µl	Salt Solution
1,0µl	TOPO-Vektor

Dieses Gemisch wurde vorsichtig gemischt, danach 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bis zur Transformation von One Shot®TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien auf Eis gestellt.

4.12 Transformation von Bakterien

Material:

Super optimal broth with catabolite repression Medium (SOC Medium)

5,1g	SOB Pulvermedium ¹
150ml	Aqua bidest.
2ml	250mMKCl ¹ zugeben
	Mit 1M HCl ¹ auf pH7,0 einstellen
	Ad 200ml Aqua bidest., Autoklavieren der Lösung
1ml	MgCl ₂ ¹ -Lösung (2M, steril)
4ml	Glucose-Lösung ¹ (1M, steril)

Lysogeny broth (LB)-Amp-Agar-Platen

Dem noch flüssigen Agar¹ wurde bei einer Temperatur unter 60°C Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml zugegeben.

LB-Amp-Medium¹

Bakterien (One Shot®TOP10 chemisch kompetente *E.coli*⁴ sowie chemisch kompetente *E.coli* vom Subtyp JM109)

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Plasmidvermehrung chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Hierfür wurden One Shot®TOP10 chemisch kompetente *E.coli* sowie chemisch kompetente *E.coli* vom Subtyp JM109 verwendet. Im Folgenden werden diese Bakterien der Einfachheit halber als TOP10 und JM109 bezeichnet. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

4.12.1 Transformation von JM109

Die Bakterien wurden 5 Minuten lang auf Eis aufgetaut. Danach wurden 10µl der Ligationsreaktion zu den Bakterien gegeben und die Plasmid-DNA durch vorsichtigstes Rühren in die Bakteriensuspensionen gemischt, um die instabile Zellwand der chemisch kompetenten Bakterien möglichst zu schonen. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien 50 Sekunden lang in einem 42°C warmen Wasserbad hitzegeschockt und sofort wieder auf Eis gestellt. Danach wurden 900µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im 37°C warmen Thermoschüttler bei 200rpm wurden die Bakteriensuspensionen für 10 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden jeweils in 200µl SOC-Medium resuspendiert und vollständig auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet, am Folgetag konnten Einzelkolonien gepickt und in

5ml LB-Amp-Medium nochmals über Nacht bei 37°C und 200rpm hochgeschüttelt werden. Aus diesen Bakteriensuspensionen konnte nun die gewünschte Plasmid-DNA gewonnen werden.

4.12.2 Transformation von TOP10

Die Bakterien wurden 5 Minuten lang auf Eis aufgetaut. Danach wurden 2µl der Ligationsreaktion zu den Bakterien gegeben und die Plasmid-DNA durch vorsichtigstes Rühren in die Bakteriensuspensionen gemischt, um die instabile Zellwand der chemisch kompetenten Bakterien möglichst zu schonen. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien exakt 30 Sekunden lang in einem 42°C warmen Wasserbad hitzegeschockt und sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Bakterien wurden 250µl SOC-Medium gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im 37°C warmen Thermoschüttler bei 200rpm wurden zwei Portionen der Bakteriensuspension (1x50µl, 1x200µl) auf je einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Die Bebrütung sowie das weitere Vorgehen entsprach der Vorgehensweise in 4.12.1.

4.13 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen

Material:

*Wizard®Plus Miniprep Kit*¹³

*Pure Yield™ Plasmid Midiprep System*¹³

Glycerol¹

Die in 4.12 beschriebenen 5ml-Bakteriensuspensionen wurden in eine 1ml- und eine 4ml-Portion aufgeteilt. Die kleinere Portion diente der Herstellung von Glycerol-Bakterienstocks. Hierfür wurden 150µl Glycerol mit 850µl der Bakteriensuspension vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

Die Plasmid-DNA aus 4ml Bakteriensuspension wurde mittels *Wizard®Plus Miniprep Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Plasmid-DNA aus größeren Bakteriensuspensions-Mengen wurde unter Verwendung des *Pure Yield™ Plasmid Midiprep Systems* nach Gebrauchsanleitung des Herstellers gewonnen.

4.14 Erfolgskontrolle der Ligation

Ob während der Klonierung die gewünschten DNA-Komponenten miteinander ligiert wurden konnte mittels Restriktions-Endonukleasen-Verdau und anschließender Kontrolle der Größe der entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese festgestellt werden. Bei positivem Ergebnis wurden die Plasmide zur Sequenzierung zu GATC, Konstanz gesendet. Die Korrektheit der Gensequenzen wurde unter Verwendung der Software *Lasergene*® von DNASTAR, Madison, USA durch Vergleich mit einer zuvor erstellten Plasmid-Karte festgestellt.

Tabelle 7: Konstrukte zur eukaryotischen Expression

Gen	Accession number	Vektor
chCXCR4	NM_204617	PCR3-HA-FLAG
chCXCR4	NM_204617	CT-GFP Fusion TOPO
chCXCR5	NM_001030912	p3XFLAG-myc-CMV25
chCXCL12a	AY429472	pcIpac

4.15 Eukaryotische Expression rekombinanter Proteine

Material:

RPMI 1640 with Glutamax⁴

Fugene HD¹³

Plasmid-DNA

4.15.1 Transiente Transfektion von HEK-293-T-Zellen

Am Tag vor der geplanten Transfektion wurden HEK-293-T Zellen auf einer 24-Lochplatte in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Delle ausgesät, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 80% erzielen. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt. Alle Lösungen wurden vor Herstellung des Transfektionsansatzes auf Raumtemperatur gebracht. Ein Transfektionsansatz für vier 24-Loch-Dellen bestand aus 2µg DNA gelöst in 100µl RPMI ohne Zusätze, zu denen 6µl

Fugene HD zugegeben wurde und von dem nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur je 25µl pro 24-Loch-Delle zu den Zellen gegeben wurde. Die Herstellung des rekombinanten chSDF-1a erfolgte in serumfreiem HEK-Medium. Nach 48 Stunden weiterer Kultivierung der Zellen wurde der Transfektionserfolg überprüft. Im Falle der membrangebundenen Chemokinrezeptoren erfolgte dies mittels durchflusszytometrischer Analyse. Für die funktionelle Prüfung des gelösten chCXCL12a standen funktionelle Assays in Form eines Calciumflux-Assays und eines Chemotaxis-Assays mit DT40-Zellen zur Verfügung.

Für die Transfektion in 10ml-Zellkulturschalen wurden die Zellzahlen und Volumina entsprechend der Herstellerempfehlungen angepasst.

4.15.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Die stabile Transfektion von HEK-293-Zellen wurde wie in 4.15.1 beschrieben in 24-Loch-Dellen durchgeführt. Allerdings wurden die Zellen bereits 24 Stunden nach der Transfektion in der 24-Lochplatte resuspendiert, 10µl der Zellsuspension entnommen und diese 10µl in 20ml G418-haltiges Selektionsmedium gegeben. Diese 20ml wurden in 200µl-Portionen auf einer 96-Loch-Platte ausplattiert und 7-10 Tage bei 37°C kultiviert. Der Inhalt der Dellen wurde sorgfältig resuspendiert und die Zellsuspensionen bis auf einen kleinen Rest abgenommen und verworfen. Die Dellen wurden mit 200µl frischen Selektionsmediums aufgefüllt und für weitere 7-10 Tage bei 37°C kultiviert. Waren die Klone gut gewachsen konnte man mittels geeigneter Technik die erfolgreich stabil transfizierten Klone identifizieren und in geeigneten größeren Behältnissen in dem unter 4.3.1 beschriebenen G418-haltigen Selektionsmedium weiterkultivieren.

4.16 Erzeugung monoklonaler Maus-Antikörper

Die verwendeten Medien für die Zellkultur wurden in 4.3.1 beschrieben.

4.16.1 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Zur Herstellung eines Hybridoms wurde eine Maus dreimalig im Abstand von vier Wochen mit 1×10^8 transfizierten Zellen gelöst in jeweils 500µl warmem, sterilem PBS pH7,2 durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Im Falle von chCXCR4 wurde jeweils mit transient chCXCR4-transfizierten HEK-293-T-Zellen immunisiert, bei chCXCR5 wurde eine stabil transfizierte 3xFlag-chCXCR5-HEK-293-Zelllinie benutzt. Drei Tage

nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen der Mäuse steril entnommen.

4.16.2 Zellfusion

Material:

RPMI 1640 with Glutamax ⁴

Polyethelene Glycol 1500 (PEG) ¹⁸

Die steril entnommene Mäusemilz wurde in kaltes RPMI gegeben und mit einem Spritzenstempel vorsichtig durch ein Zellsieb homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50ml-Probenröhrchen überführt, welches vor einer 10-minütigen Sedimentation auf Eis mit RPMI aufgefüllt wurde. Anschließend wurde der Überstand sedimentfrei in ein frisches 50ml-Probenröhrchen überführt und 10 Minuten lang bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml raumwarmem Iscove Basal Medium resuspendiert und schließlich die Viabilität und Quantität der Milzzellen nach Trypanblaufärbung mikroskopisch bestimmt.

Die zur Fusion benutzten SP2/0-Zellen²⁹ wurden ebenfalls bei 300xg und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert, die Zellpellets in insgesamt 20ml Iscove Basal Medium resuspendiert und mittels Trypanblaufärbung qualitativ und quantitativ untersucht.

Zur eigentlichen Zellfusion wurden $1,4 \times 10^8$ Mäusemilzzellen mit $2,8 \times 10^8$ SP2/0-Zellen in ein 50ml-Falcon gegeben, 5 Minuten lang bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert und danach der Überstand sorgfältig vom Zellpellet entfernt. Nach vorsichtigem Lockern des Zellpellets durch mäßige Erschütterung wurde innerhalb einer Minute tropfenweise 1,5ml 37°C warmes PEG zugegeben und das Gemisch aus Zellen und PEG eine Minute lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde in drei Intervallen Iscove Basal Medium zugegeben: zuerst tropfenweise 1ml in 30 Sekunden, dann 3ml in 30 Sekunden und schließlich 16ml in einer Minute. Sofort darauf wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, die Zellen in 420 ml Fusionsmedium aufgenommen und die Zellsuspension wurde in 200µl-Portionen auf 20 96-Flachlochplatten verteilt. Diese Zellen wurden 10 Tage lang bei 37°C kultiviert und regelmäßig mikroskopisch überprüft.

4.16.3 Screening der Hybridom-Überstände

Zum Screening der Hybridom-Überstände mittels Durchflusszytometrie wurden nach 10-tägiger Inkubation pro Delle je 100µl Überstand entnommen und durch 100µl frisches Medium ersetzt. Das Screening wurde jeweils auf primären Hühnerzellen durchgeführt. Im Falle des anti-chCXCR4-Antikörpers wurden hierbei Bursazellen eines 4 Wochen alten M11-Huhnes verwendet, für den anti-chCXCR5-Antikörper wurden die Milzzellen eines 7 Wochen alten LSL-Huhnes verwendet. Die durch Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Hühnerleukozyten wurden in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/Färbung eingesetzt. Als Primär-Antikörper dienten jeweils die unverdünnten Hybridom-Überstände, als Sekundär-Antikörper wurde ein anti-Maus IgG-FITC-Antikörper verwendet. Die positiven Klone wurden direkt nach der Auswertung mittels *BD FACS-DIVA*-Software in 24-Loch-Dellen umgesetzt. An den Folgetagen wurden weitere durchflusszytometrische Tests mit den jeweils passend transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Die Überstände der positiven Hybridome waren zu diesem Zeitpunkt noch potentiell polyklonal.

4.16.4 Subklonierung und Isotyp-Bestimmung

Um sicherzustellen, dass es sich bei den erzeugten Hybridomen um monoklonale Hybridome handelt, wurden die ausgewählten positiven Klone subkloniert. Hierzu wurden mehrere 96-Loch-Platten pro Klon in einer Dichte von 0,4 Zellen/Delle ausgesät. Diese Subklone benötigten etwa 14 Tage bis sie mikroskopisch erkennbar waren. Dann wurde ein Screening wie in 4.16.3 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde eine Isotypbestimmung mithilfe isotypspezifischer Sekundäntikörper (jeweils anti-Maus IgG-, IgG2a-, IgG2b-, IgG3-, IgM-FITC) durchgeführt.

4.16.5 Sammeln von Antikörper-haltigen Hybridom-Überständen

Die Hybridome wurden nach dem Screening noch 14 Tage lang in Fusionsmedium gehalten. Danach wurden sie nochmals 14 Tage mit Erhaltungsmedium versorgt bis sie schrittweise auf Hybridoma-Medium umgestellt werden konnten. Die Überstände wurden gesammelt und später teilweise chromatografisch aufgereinigt

4.16.6 Chromatografische Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Material:

Startpuffer (20mM Phosphatpuffer pH7,0)

1,13g $\text{Na}_2\text{HPO}_4^1$ in 400ml Aqua dest. lösen

1,09g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$ in 300ml Aqua dest. lösen

Soviel ml der NaH_2PO_4 in die Na_2HPO_4 -Lösung geben bis pH7,0 exakt erreicht wird.

Elutionspuffer (0,1M Glycinpuffer pH2,5)

3,75g Glycin¹ in 500ml Aqua dest. lösen

Mit HCl¹ auf exakt pH2,5 einstellen

Trislösung 1M

1,211g Tris¹ in 10 ml Aqua dest. lösen

Dialysepuffer pH7,8

1,65g KH_2PO_4^1

29,03g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$

45,00g NaCl¹

Ad 5l Aqua dest.

*Protein G Sepharose 4 Fast Flow*²⁶

Dialyse-Schlauchmembran (MWCO 14000)²⁵

In Aqua dest. mindestens 30 Minuten lang eingeweicht

Antikörperhaltiger Zellkulturüberstand

*0,45 Nalgene® Filter*⁹

Vor der Aufreinigung des Antikörpers wurde der Zellkulturüberstand mithilfe eines *Nalgene® Filters* mit der Porengröße von $0,45\mu\text{m}$ filtriert. Die gesamte Aufreinigung fand bei einer Temperatur von 4°C statt. Die *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* wurde in eine Säule gegeben, deren Ein- und Ausgang an eine Chromatographie-Anlage des Typs *BiolLogic LP* von Bio-Rad in Kombination mit einem *Model 2100 Fraction Collector* angeschlossen wurde. Durch diese Säule wurden wie folgt die vorbereiteten Lösungen gespült. Zuerst zur Equilibrierung der Säulenmatrix Startpuffer pH7,0, danach zur Bindung des Antikörpers an die Säulenmatrix der gesamte Zellkulturüberstand, hiernach nochmals Startpuffer zum Auswaschen unspezifisch gebundenen Proteins und schließlich Elutionspuffer pH2,5. Durch die pH-Wert-Änderung kam es zur Lösung des Antikörper-Proteins von der Säulenmatrix und die Antikörper-haltige Lösung wurde fraktionsweise in 5ml-Probenröhrchen aufgefangen, in die zur Neutralisierung der Probe ein Tropfen 1M Tris-Lösung vorgelegt worden war. Die Antikörper-Konzentrationen dieser Fraktionen wurden bestimmt. Danach wurden die Fraktionen mit hohen Antikörper-Konzentrationen

gepoolt und mittels Dialyse-Schlauchmembran über Nacht in Dialysepuffer umdialysiert. Die Konzentration der Antikörper-Lösung wurde nach Sterilfiltration spectrophotometrisch gemessen. Die Lösung wurde in aliquotierter Form bei -20°C gelagert.

4.17 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Material:

Zellen als klumpenfreie Einzelzellsuspension

Primäre und sekundäre Antikörper verdünnt in Fluo-Puffer

Fluo-Puffer

5g *Albumin, bovine Fraction V*⁹

50mg Natrium-Azid (NaN₃)¹

Ad 500ml PBS pH7,2; Lagerung bei 4°C

Normal Mouse Serum⁴ in einer Verdünnung von 1:20 in Fluo-Puffer (Blockier-Lösung)

7-Actinomycin-D (7-AAD)⁹

1mg 7-AAD in 50µl Methanol¹ lösen, ad 5ml PBS pH7,2; Lagerung in 1ml-Aliquots bei -20°C

Generell wurden pro Färbung 0,2 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden in 96-Rundlochplatten mittels Zentrifugation pelletiert. Nach Resuspendieren in den jeweiligen Antikörper-Lösungen wurden die Zellen für je 20 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden zum Abstoppen der Bindungsreaktion 200µl Fluo-Puffer in die Dellen gegeben, die 96-Lochplatten dann für 1 Minute bei 700xg und 4°C zentrifugiert und abschließend der Überstand durch rasches Abkippen gründlich vom Zellpellet entfernt (im Folgenden als Waschen bezeichnet). Am Ende einer Färbung wurden die Zellen in 200µl Fluo-Puffer resuspendiert und diese 200µl Zellsuspension in ein Messröhrchen überführt, in das zuvor 200µl Fluopuffer vorgelegt wurden. Zur Messung mittels *BD High Throughput System* aus der Rundlochplatte verblieben die 200µl Zellsuspension in der Färbeplatte.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mithilfe der Programme *BD FACS-DIVA Version 3.0* und *FlowJo7.6.1*.

Eine Auflistung der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen.

Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper

Z = Zellkulturüberstand; P = gereinigter Antikörper (*purified*)

Antigen	Klon	Isotyp		Fluorochrom	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller
BAFF-R	12D11	IgM	Z	/	1:5	selbst
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	Z	/	1:20	19
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	P	FITC	2,5µg/ml	19
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	P	RPE	10µg/ml	19
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	P	Alexa Fluor 647	2µg/ml	19
chCD4	CT4	IgG1	P	FITC	1µg/ml	20
chCD4	CT4	IgG1	P	RPE	2µg/ml	20
chCD45	16-6	IgG2a	P	FITC	10µg/ml	selbst
chCD45	16-6	IgG2a	P	APC	1µg/ml	selbst
chCD8a	CT8	IgG1	P	FITC	1µg/ml	20
chCD8a	CT8	IgG1	P	RPE	1µg/ml	20
chCXCR4	9D9	IgG2a	Z	/	1:10	selbst
chCXCR4	9D9	IgG2a	P	/	2,5µg/ml	selbst
chCXCR5	6A9	IgG1	Z	/	unverdünnt	selbst
chIgLc	2G1	IgG1	Z	/	unverdünnt	selbst
chIgLc	2G1	IgG1	P	FITC	10µg/ml	selbst
chIgM	M1 Techno	IgG1	P	/	0,5µg/ml	20
chMHCII	2G11	IgG1	Z	/	1:40	selbst
chMHCII	anti-chla (Cla)	IgM k	P	RPE	1µg/ml	20
Flag	M2	IgG1	P	/	5µg/ml	9
chL12 (OV-Antigen)	11A9	IgM	P	/	10µg/ml	[71]

4.17.1 Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern

Bei Färbungen mit Direktkonjugaten wurden die Zellen in 40µl der Antikörper-Lösungen inkubiert, danach einmalig gewaschen. Wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt, so wurden die Antikörper gemeinsam in ihrer Endkonzentration angesetzt und 40µl der Mixtur zum Färben verwendet.

4.17.2 Indirekte Färbungen

Hierbei wurden nicht markierte Primärantikörper und nach einmaligem Waschen der Zellen Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper eingesetzt. Von den Primärantikörpern wurden pro Färbung 40µl der Antikörper-Lösung eingesetzt. Verwendete man bei Mehrfachfärbungen gereinigte Primärantikörper, so wurden diese gemeinsam in Fluopuffer verdünnt. Bei Einsatz von zwei oder mehr Zellkulturüberständen wurden in

Mehrfachfärbungen bei purem Einsatz jeweils 40µl von jedem Zellkulturüberstand zu den Zellen gegeben. Wurden Mehrfachfärbungen gleichzeitig sowohl mit aufgereinigten Primärantikörpern als auch Zellkulturüberständen durchgeführt, so wurden die gereinigten Primärantikörper in den Zellkulturüberständen verdünnt.

Von den Enverdünnungen der isotypspezifischen Sekundärantikörper wurden jeweils 40µl eingesetzt. Bei Mehrfachfärbungen wurden die benötigten Sekundärantikörper in einem einzigen Endverdünnungs-Ansatz in Fluo-Puffer angemischt.

Wurden bei Mehrfachfärbungen Direktkonjugate und unkonjugierte Antikörper eingesetzt, so wurden die Direktkonjugate stets mit den Sekundärantikörpern zugegeben.

Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
mulgG (H+L)	anti-mulgG	RPE	4µg/ml	21
mulgG (H+L)	anti-mulgG	FITC	4µg/ml	9
mulgG1	anti-mulgG1	PerCP	10µg/ml	21
mulgG1	anti-mulgG1	FITC	5µg/ml	19
mulgG1	anti-mulgG1	RPE	2,5µg/ml	19
mulgG2a	anti-mulgG2a	FITC	10µg/ml	19
mulgG2a	anti-mulgG2a	RPE	2,5µg/ml	19
mulgG2a	anti-mulgG2a	Alexa Fluor 647	0,5µg/ml	4
mulgG2b	anti-mulgG2b	FITC	5µg/ml	19
mulgG2b	anti-mulgG2b	RPE	2,5µg/ml	19
mulgG3	anti-mulgG3	FITC	5µg/ml	19
mulgG3	anti-mulgG3	RPE	2,5µg/ml	19
mulgM	anti-mulgM	FITC	5µg/ml	19
mulgM	anti-mulgM	RPE	0,5µg/ml	19

4.17.3 Mehrfachfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps

Wurden Mehrfachfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps durchgeführt wurde darauf geachtet, dass nur ein nicht konjugierter Antikörper dieses Isotyps in einer Färbung verwendet wurde. Dieser wurde als Primärantikörper wie in 4.17.2 eingesetzt. Nach Abschluss der indirekten Färbung wurden die Zellen in 50µl Blockierlösung resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde der zweite Antikörper gleichen Isotyps als Direktkonjugat eingesetzt.

4.17.4 Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD

Für eine Diskriminierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde in einigen Versuchen direkt vor der Messung 10µl 7-AAD-Lösung zu den im 5ml-Probenröhrchen befindlichen 400µl Zellsuspension gegeben. Lebende Zellen waren befähigt den Farbstoff vor ihrer Zelloberfläche zu beseitigen, tote Zellen wurden hingegen durch 7-AAD markiert.

4.18 Fluoreszenz-Histologie

Material:

Kryo-histologische-Schnitte, angefertigt mittels Kryotom (Kryostat HM500OM), auf Glas-Objekträgern

Glasküvetten mit Schiffchen

Feuchte Kammer

Fettstift (ImmEdge-Pen)²⁸

Aceton zur Analyse¹

PBS pH7,2

PBS pH7,2 mit 1% BSA¹

Ziegenserum²⁸ (1:40 in PBS pH7,2 mit 1% BSA)

DAPI¹

Vectashield Hard & Set Mounting Medium (anti-fading)²⁸

Antikörper: 1. anti-chCXCR4 (2,5µg/ml); 2. anti-mouse IgG-AlexaFluor488⁴ 1:200

Deckgläser

Die Schnitte wurden zunächst für zwei Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und danach für zehn Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie 15 Minuten lang in PBS pH7,2 rehydriert. Zur Reduktion unspezifischer Färbung (Blockierung) wurden die Schnitte komplett mit Ziegenserum bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Blockier-Lösung abgekippt. Die Schnitte wurden mit der Primär-Antikörperlösung (anti-chCXCR4 2,5µg/ml) bedeckt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Schnitte dreimalig für fünf Minuten mit PBS pH7,2 gewaschen bevor die Sekundär-Antikörperlösung zugegeben wurde. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation ohne Lichtzufuhr wurden die Schnitte dreimalig für fünf Minuten gewaschen. Danach wurden einige Tropfen *Vectashield Hard&Set Mounting Medium* auf das Objekt gegeben. Hiernach wurden die histologischen Präparate eingedeckelt und waren bereit zur Betrachtung mittels Fluoreszenz-Mikroskop.

4.19 CXCR4-Bindungs-Assays

Es wurden verschiedene potentielle chCXCR4-Liganden zu chCXCR4-positiven DT40-Zellen oder Milzzellen gegeben. Hierdurch wurde untersucht, inwieweit die Detektionsfähigkeit des oberflächlich exprimierten chCXCR4-Proteins durch den anti-chCXCR4-Antikörper nach der Bindung anderer potentieller chCXCR4-Liganden beeinflusst wird.

4.19.1 AMD3100 und huCXCL12a

Material:

AMD3100⁹ als 40µM-Lösung in DT40-Medium

huCXCL12a²² gelöst für DT40-Zellen in DT40-Medium (100ng/ml) oder für primäre Zellen in Chemotaxis-Medium (100ng/ml)

2µg Lyophilisat in 10µl Aqua dest. (endotoxinfrei) gelöst. Lagerung der Lösung bei -20°C. Nach Auftauen Lagerung für 2 längstens 2 Tage bei 4°C, kein erneutes Einfrieren ohne Verlust der biologischen Aktivität möglich.

1x 10⁶ DT40-Zellen oder Milzzellen wurden in 1ml der 40µM AMD3100-Lösung beziehungsweise huCXCL12a-Lösung für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Parallel dazu wurden als Kontrolle 1x 10⁶ Zellen gleichen Ursprungs in Medium ohne AMD3100 oder huSDF-1a inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Fluo-Puffer gewaschen und eine indirekte Einfach-FACS-Färbung gegen chCXCR4 durchgeführt. Die Anfärbbarkeit der Zellen durch den anti-chCXCR4-Antikörper wurde durchflusszytometrisch untersucht.

4.20 Calciumflux-Assays

Material:

DT40 Zellen

Pluronic F-127⁴

Fluo-4-AM⁴ 2,5mM

Lyophilisat in 10µl DMSO lösen lassen, 10µl Pluronic F-127 zugeben und gut mischen. Lagerung gelöst bei -20°C für einen Zeitraum von bis zu einer Woche möglich.

Calcium-Signalling Medium

46,75ml RPMI 1640 with Glutamax⁴

2,5ml FBS²

0,75ml 1M HEPES buffer solution⁴

Beladungsmedium mit 2,5µM Fluo-4-AM

Zu 1ml Calcium-Signalling Medium wurde 1µl 2,5mM Fluo-4-AM gegeben.

Waschlösung

47,4ml PBS pH7,2

2,5ml FBS²

50µl 1M CaCl₂-Lösung¹

50µl 1M MgCl₂-Lösung¹

Ionomycin (0,5µg/ml Endkonzentration)**anti-chIgM (M1, 10µg/ml)**

Der grün fluoreszierende Kalzium-Indikator Fluo-4 ist eine Weiterentwicklung des Calcium-Indikators Fluo-3. Fluo-4 wurde in dieser Arbeit als Acetoxymethylester verwendet (Fluo-4-AM), dessen Lipophilie eine Permeierung von Zellmembranen zulässt. Im Zytoplasma angelangt werden durch unspezifische zelluläre Esterasen die Fluo-4-AM-Moleküle zur polaren Fluo-4-Form umgewandelt, die das Zytoplasma nicht mehr ungehindert verlassen können. Nach Calcium-Influx ins Zytoplasma einer mit Fluo-4 beladenen Zelle zeigt diese Zelle bei Anregung durch einen 488nm-Argonlaser grüne Fluoreszenz, welche durchflusszytometrisch erfasst werden kann. Mit dieser Technik lassen sich ein zytosolischer Calciumkonzentrations-Anstieg nach Bindung verschiedener Liganden und ein nachfolgender Konzentrationsabfall als zellulärer Kompensationsmechanismus im zeitlichen Verlauf verfolgen.

Durchführung

Vor Beginn der Experimente wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht. Alle Schritte vom Beladen der DT40-Zellen bis zum Ende der Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine möglichst geringe Hintergrund-Fluoreszenz und nachfolgend eine gute Diskriminierung zwischen Basalfluoreszenz der beladenen Zellen und Fluoreszenz-Signal nach Ligandenbindung zu erzielen.

Am Vorabend der Versuche wurden die zu verwendenden DT40-Zellen mit frischem DT40-Medium versorgt. Die Qualität und Quantität der DT40-Zellen wurden mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Nur wenn hierbei die Zellen einen Lebend-Anteil von mindestens 80% aufwiesen, wurden diese verwendet. Zum Einsatz kamen pro Färbung und Messung 1×10^6 lebende DT40-Zellen, welche in ein 5ml-Messröhrchen gegeben wurden und eine Minute lang bei 700xg und Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Zellpellet in 1ml des Beladungsmediums mit 2,5µM

Fluo-4-AM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten lang lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden die Zellen zweimalig mittels 1ml Waschlösung gewaschen und waren schließlich bereit für die durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Während der durchflusszytometrischen Messung wurde die Fluoreszenz der Zellen im zeitlichen Verlauf bestimmt. Zuerst wurde für etwa 30 bis 60 Sekunden die Basalfluoreszenz der Zellen ohne Ligandenbindung bestimmt. Danach wurde ein potentieller Ligand zugegeben und sofort für 10 Minuten ohne Unterbrechungen weitergemessen. Führt die Zugabe eines potentiellen Liganden zu einem Calcium-Influx in die Zellen, so war dies als Anstieg der Fluoreszenz sichtbar. Eine Liste der untersuchten Substanzen ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mittels der Software *FlowJo Version 7.6.1* von Tree Star, Inc., Ashland, USA.

Tabelle 10: Im Calciumflux-Assays eingesetzte potentielle chCXCR4-Liganden

Potentielle chCXCR4-Liganden	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
chCXCL12a (Zellkulturüberstand)	1:10, 1:5 und 1:2	selbst
huCXCL12a	100ng/ml	22
rtCXCL12a	100ng/ml	22
muCXCL12a	100ng/ml	22
AMD3100	40µM	9
anti-chCXCR4 (9D9)	10µg/ml	selbst

4.21 Chemotaxis-Assays

Material:

Zellen, während des gesamten Experimentes in mindestens 21°C-warmen Medien

Chemotaxis-Medium

48,75ml RPMI 1640 with Glutamax⁴

1,25ml 20%iges BSA⁹ (endotoxinfrei, gelöst in RPMI1640, Lagerung als Aliquots bei -20°C)

Bovines Fibronectin⁴ (10µg/ml gelöst in endotoxinfreiem Aqua dest.⁹)

24-well-Transwell-Platten²³ (6,5mm Diameter, 5,0µm Porengröße)

Chemokine (humanes SDF-1a²² oder serumfrei hergestelltes chSDF-1a; gelöst in Chemotaxis-Medium)

*BD FACSTrucount Tubes*²⁴

Chemotaxis-Versuche wurden mit der Zelllinie DT40 sowie mit primären Hühnerleukozyten durchgeführt. Primäre Hühnerleukozyten wurden aus Bursa und Milz mittels Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von *Biocoll Separating Solution* gewonnen. Hühnerleukozyten aus dem Blut wurden durch Slow-Speed-Zentrifugation gewonnen (siehe Kapitel 4.2).

Um die Integrität des Zytoskeletts der Zellen zu wahren, wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Zellen während des gesamten Experiments nicht unter 21°C fällt. Zellen, deren Zytoskelett rigide ist, zeigen ein verändertes Migrationsverhalten, wodurch die Ergebnisse dieses Assays beeinträchtigt werden. Außerdem wurde der Einsatz von FBS vermieden, da undefinierte, hierin enthaltene Substanzen ebenfalls das Migrationsverhalten von Zellen beeinflussen können. Berührungen der Böden der Transwell-Einsätze mit Arbeitsmaterialien durften nicht stattfinden, um die Intaktheit der Porenmembran zu gewährleisten. Zur Vermeidung von LPS-Kontaminationen wurden während aller Arbeitsschritte LPS-freie Einmal-Plastikwaren verwendet.

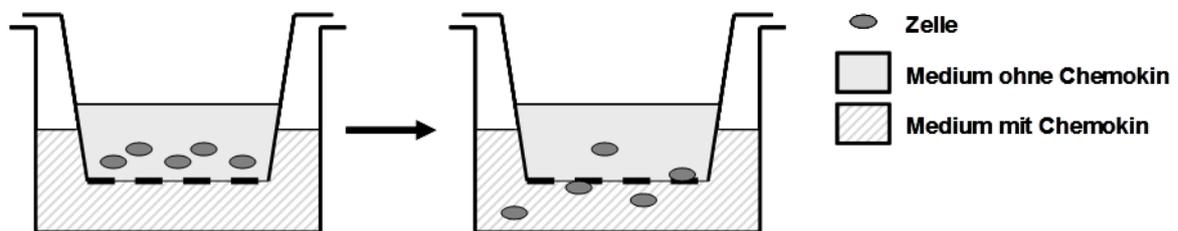


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Transwell-Migrations-Assays

Die Dellen einer Transwell-Platte bestehen aus zwei Kompartimenten. Im oberen Kompartiment sind Zellen in einer Chemokin-freien Lösung. Diese Zellen migrieren durch eine porenhaltige Membran ins untere Kompartiment, welches mit Chemokin-haltiger Lösung befüllt ist.

Zur späteren Auswertung der Experimente wurde bei jedem Experiment eine 100%-Kontrolle mitgeführt, bei der die unten beschriebenen 100µl Zellsuspension direkt ins untere Kompartiment zu 500µl vorgelegtem Chemotaxis-Medium gegeben wurde. Außerdem wurde jeweils eine Chemokinesiskontrolle angesetzt, bei der pures Chemotaxismedium ohne Zusatz eines Chemokins ins untere Kompartiment gegeben wurde, um die Grundmigration der Zellen ohne besonderen Stimulus zu bestimmen. Alle Experimente wurden in Dreifach-Ansätzen durchgeführt.

Zunächst wurden die Böden der Transwell-Einsätze mit 50µl der Fibronectin-Lösung benetzt. Diese wurden für eine Stunde bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Danach wurden die Fibronectin-Lösungen vorsichtig abgenommen und die Einsätze zwei Stunden lang bei 37°C getrocknet.

Kurz vor Beginn der Experimente wurden die Zellsuspensionen in Chemotaxis-Medium hergestellt. Zuvor wurden die Zellen zum Entfernen von Serumresten zweimalig in RPMI 1640 gewaschen, um möglicherweise noch anhaftende Serumreste sorgfältig zu entfernen. Die Zellsuspensionen wurden auf eine Zellzahl von 5x10⁶ Zellen/ml eingestellt. 100µl dieser Zellsuspensionen (entsprechend 5x10⁵ Zellen) wurden pro Delle eingesetzt.

Die eingesetzten Chemokine wurden ebenfalls in Chemotaxis-Medium verdünnt. Zuerst wurden 600µl dieser Chemokin-Verdünnungen ins untere Kompartiment der Delle und anschließend 100µl der vorbereiteten Zellsuspensionen ins obere Kompartiment gegeben.

Die Transwell-Platten wurden nun für 90 Minuten bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Danach wurde die Unterseite der Einsätze vorsichtig zweimalig mit Flüssigkeit aus dem unteren Kompartiment der Delle abgespült, damit auch die dort noch anhaftenden, aber schon durch die Porenmembran migrierten Zellen erfasst wurden. Die Flüssigkeit im unteren Kompartiment wurde gründlich aufsuspendiert und jeweils 500µl davon zur Quantifizierung der darin enthaltenen Zellen entnommen.

Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mittels *BD FACSTrucount Tubes*. Migrierte primäre Zellen wurden vor der Quantifizierung mittels Standard-FACS-Färbung durch anti-chB6-AlexaFluor647- und anti-chCD3-FITC-Antikörper angefärbt, um die Migrationsraten von B- und T-Zellen getrennt voneinander bestimmen zu können. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm *FlowJo Version 7.6.1* von Tree Star, Ashland, USA verwendet.

Angegeben wird die Migrationsrate als der prozentuale Anteil der jeweils migrierten Zellen beziehend auf die 100%-Kontrolle oder der Chemokinesis-Index, welcher errechnet wurde als Quotient aus der Anzahl migrierter Zellen bei Zusatz des Chemokins und der Anzahl migrierter Zellen in den Chemokinesis-Kontrollen ohne Chemokineinsatz.

4.22 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels *Microsoft® Excel 2010* für Windows. Wurde nach Durchführung eines Student's T-Tests kein p-value angegeben, so lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben vor. Grafiken wurden mittels

GraphPad Prism® von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA oder mittels *Microsoft*® *Power Point 2010* angefertigt.

5 ERGEBNISSE

5.1 chCXCR4

5.1.1 Expression von chCXCR4 und chCXCL12 im Verlauf der Ontogenese

Für eine erste Untersuchung, ab welchem Zeitpunkt der Individualentwicklung chCXCR4 und chCXCL12 in Milz und Bursa exprimiert werden, wurden bei Hühnerembryonen an ET14 und ET18 sowie Küken an Tag zwei nach dem Schlupf Milz und Bursa entnommen. Anschließend wurde die mRNA dieser Organe mittels qRT-PCR auf die Expression des Chemokinrezeptors chCXCR4 sowie seines Liganden chCXCL12 untersucht.

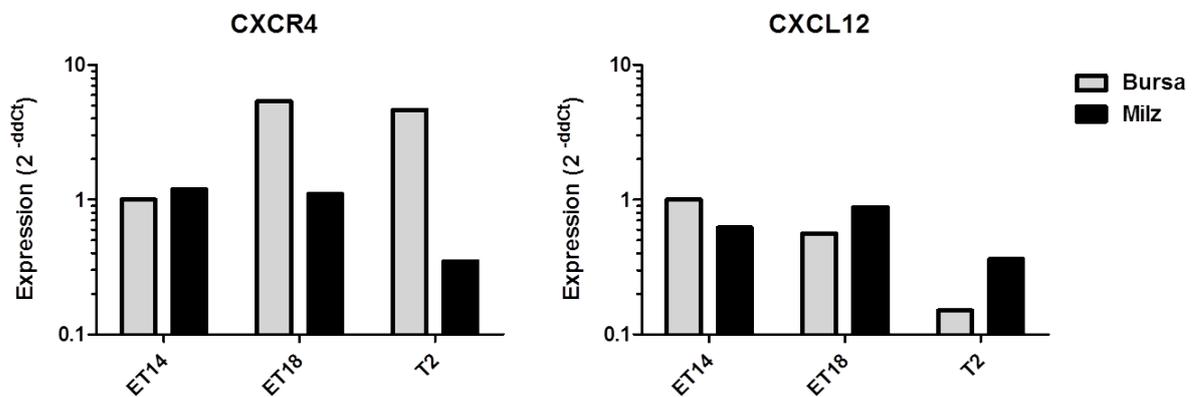


Abbildung 6: Untersuchung der Expression von chCXCR4 und chCXCL12 in Milz und Bursa zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus Milz und Bursa isoliert und die Expression von chCXCR4 und chCXCL12 mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die Expression (2^{-ddCt}) bezogen auf den Wert der Bursa an ET14 (=1). Zur mRNA-Isolation wurde an ET14 ein Pool aus jeweils drei Organen, an ET18 und T2 jeweils ein Organ eingesetzt.

Wie in Abbildung 6 zu sehen, konnte bereits an ET14 die höchste Expression von chCXCL12 in der Bursa verglichen mit nachfolgenden Zeitpunkten nachgewiesen werden. Der Expressionswert in der Bursa zu diesem Zeitpunkt wurde als 1 gewichtet und alle anderen Expressionswerte auf diesen Wert bezogen. So war in der Bursa an ET18 verglichen mit ET14 eine nur etwa halb so hohe Expression zu finden, an Tag 2 nach dem Schlupf verringerte sich die Expression sogar um das Siebenfache. In der Milz war verglichen mit der Bursa an ET14 eine nur leicht geringere chCXCL12-Expression zu finden. An ET18 stieg die Expression in der Milz bis etwa auf das Expressionsniveau in der Bursa an ET14 an. An Tag 2 nach dem Schlupf war ein Expressionsabfall in der Milz

zu verzeichnen, die Expression zu diesem Zeitpunkt war um das Dreifache geringer als die Expression in der Bursa an ET14. Die Expression von chCXCL12 unterlag also sowohl in der Bursa als auch in der Milz zwischen den Bebrütungstagen 14 und 18 nur geringfügigen Schwankungen, während es in beiden Organen an Tag 2 nach dem Schlupf zu einem Expressionsabfall kam. Dieser Abfall in der Expression war in der Bursa stärker ausgeprägt als in der Milz.

Bei der Betrachtung der chCXCR4-Expression konnte man an ET14 keinen Unterschied zwischen der Expression in Bursa- und Milzgewebe feststellen. An ET18 konnte man eine fünffache Zunahme der chCXCR4-Expression in der Bursa beobachten. Dieses erhöhte Expressionsniveau der chCXCR4-mRNA blieb in der Bursa auch an Tag 2 nach dem Schlupf nahezu konstant. Die chCXCR4-Expression war in der Milz an ET14 verglichen mit der Bursa zum gleichen Zeitpunkt auf einem geringfügig höheren Niveau und zeigte an ET18 kaum eine Veränderung. An Tag 2 nach dem Schlupf hingegen kam es zu einem Abfall der chCXCR4-Expression um das Dreifache, sodass die chCXCR4-Expression an Tag 2 nach dem Schlupf in der Bursa etwa acht Mal höher war als in der Milz.

5.1.2 Erzeugung eines monoklonalen anti-chCXCR4-Antikörpers

Für die Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors chCXCR4 auf Proteinebene wurde ein monoklonaler anti-chCXCR4-Antikörper hergestellt. Zur Generierung dieses Antikörpers wurde chCXCR4 zunächst in Vektoren zur eukaryotischen Expression kloniert. Mit diesen Vektoren wurden HEK-293-T-Zellen transfiziert, die zur Immunisierung einer Balb/c-Maus verwendet wurden. Die Milzzellen dieser immunisierten Maus dienten dann der Fusion mit SP2/0-Zellen.

5.1.3 Transfektion von HEK-293-T-Zellen mit chCXCR4

Zur Transfektion von HEK-293-T-Zellen wurden zwei chCXCR4-enthaltende Konstrukte hergestellt. ChCXCR4 in pcDNA3.1-CT-GFP-TOPO lieferte nach Transfektion ein membranständiges chCXCR4, an dessen zytoplasmatisch liegenden C-Terminus ein GFP angefügt war. ChCXCR4 in PCR3-HA-FLAG führte hingegen zur Expression eines membranständigen chCXCR4-Proteins, an dessen extrazellulärem N-Terminus sich ein FLAG-Tag befand. Mithilfe der Detektion dieses FLAG-Tags durch einen anti-FLAG-Antikörper konnte die Expression von FLAG-chCXCR4 durchflusszytometrisch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

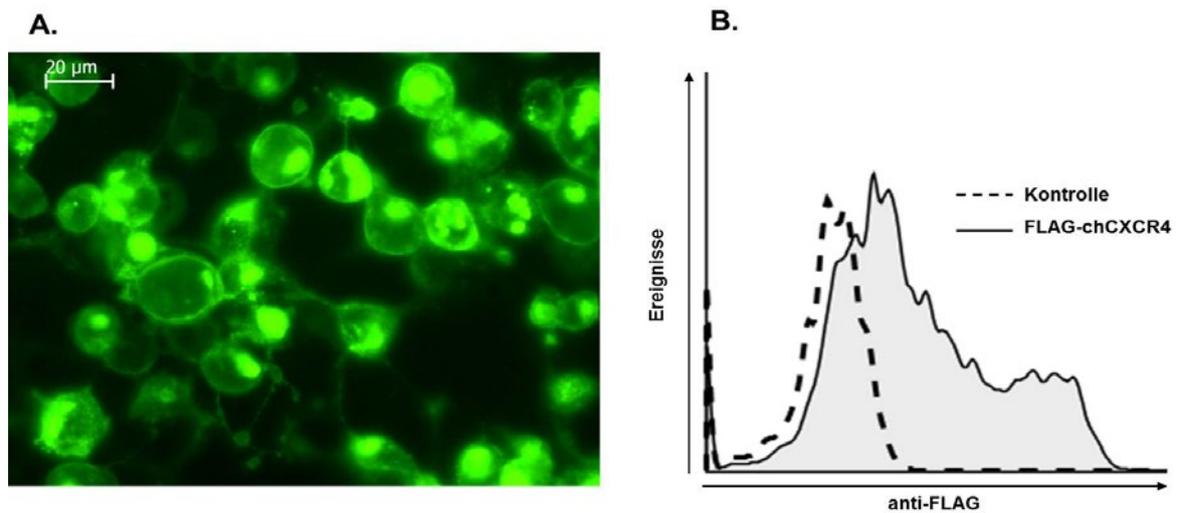


Abbildung 7: Expression von chCXCR4-GFP und FLAG-chCXCR4 in HEK-293-T

A: HEK-293-T-Zellen wurden mit chCXCR4 in pcDNA3.1-CT-GFP-TOPO transfiziert und nach einer 48-stündigen Kultivierung fluoreszenzmikroskopisch untersucht (20-fache Vergrößerung).

B: HEK-293-T Zellen wurden mit chCXCR4 in PCR3-HA-FLAG transfiziert und nach 48h mittels anti-Flag M2-Antikörper und anti-muIgG1-FITC-Antikörper angefärbt. Als Kontrolle wurden parallel dazu nicht transfizierte HEK-293-T Zellen mit den gleichen Antikörpern behandelt.

Die HEK-293-T-Zellen zeigten nach der Transfektion mit chCXCR4 in pcDNA3.1-CT-GFP-TOPO eine deutliche grüne Fluoreszenz (Abbildung 7A). Diese Fluoreszenz war nicht zweifelsfrei als Oberflächen-Fluoreszenz zu erkennen, da viele Zellen auch im Zytoplasma grün fluoreszierende Stellen zeigten.

Bei HEK-293-T-Zellen, die mit chCXCR4 in PCR3-HA-FLAG transfiziert wurden, konnte hingegen durchflusszytometrisch die Expression des FLAG-chCXCR4-Proteins an der Oberfläche mittels anti-FLAG M2-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 7B). Daher wurden diese Zellen verwendet, um eine Balb/c-Maus dreimalig intraperitoneal mit 1×10^8 Zellen zu immunisieren.

5.1.4 Zellfusion und Test der Hybridom-Überstände

Elf Tage nach der Zellfusion wurden die Überstände der entstandenen Hybridom-Klone zum durchflusszytometrischen Screening auf Bursazellen eines fünfwöchigen Huhnes verwendet.

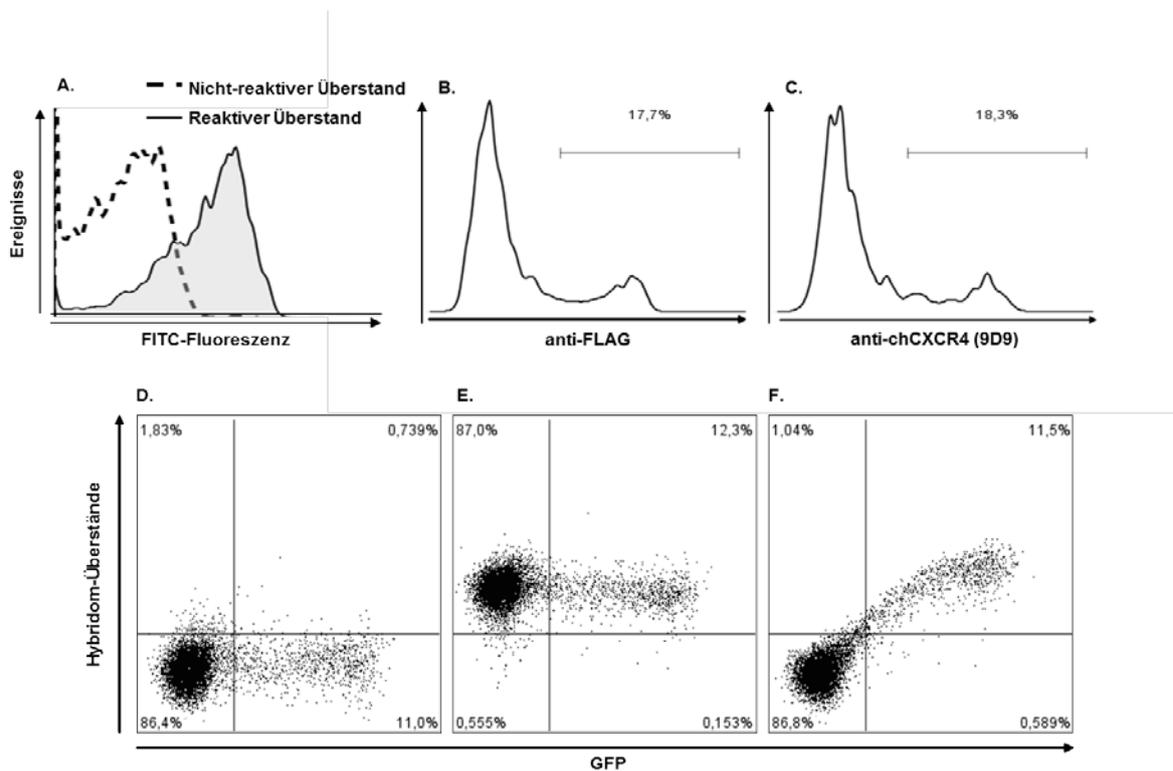


Abbildung 8: Screening und Nachweis der Spezifität der chCXCR4-Hybridom-Überstände

A. Bursazellen wurden zur durchflusszytometrischen Messung mit Zellkulturüberständen der Hybridome als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein anti-muIgG-FITC-Antikörper. Dargestellt ist eine Färbung der Zellen mit chCXCR4-detectierendem Hybridoma-Überstand sowie eine Färbung von Zellen mit nicht-chCXCR4-detectierendem Überstand.

B.-C. Ein Gemisch von nicht transfizierten HEK-293-T-Zellen mit FLAG-chCXCR4-transfizierten HEK-293-T Zellen wurde mittels anti-FLAG-Antikörper (B) sowie mittels chCXCR4-detectierenden Hybridom-Überstand (C) und anti-muIgG-FITC-Antikörper gefärbt.

D.-F. Ein Gemisch aus nicht transfizierten HEK-293-T-Zellen und chCXCR4-GFP-transfizierten Zellen wurden mit verschiedenen Hybridom-Überständen und nachfolgend einem anti-muIgG-PE-Antikörper angefärbt. Dargestellt sind Zellen nach Färbung mit Hybridomüberständen, die kein Antigen dieser Zellen erkannten (D), an unspezifische HEK-293-T-Antigene banden (E) und ausschließlich chCXCR4-GFP-positive Zellen spezifisch detektierten (F).

Dabei wurden mehrere Hybridome identifiziert, welche Antigene auf Bursazellen erkannten. Die Überstände dieser Hybridome wurden auf eine Mischung aus nicht transfizierten HEK-293-T-Zellen und chCXCR4-transfizierte Zellen gegeben. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Überstände einiger Klone nicht an HEK-293-T-Zellen banden. Außerdem wurden auch Klone gefunden, deren Antikörper ein unspezifisches Antigen auf HEK-293-T-Zellen detektierten sowie Klone, die nur die transfizierten Zellen erkannten. Von diesen spezifisch reagierenden anti-chCXCR4-Hybridomen wurden zwei ausgewählt und zum Ausschluss einer potentiellen Polyklonalität subkloniert. Der ausgewählte Hauptklon wird im Folgenden 9D9 genannt. Eine Isotyp-Bestimmung des Antikörpers ergab, dass es sich um einen Antikörper vom

IgG2a-Isotyp handelt. Alle nachfolgend beschriebenen chCXCR4-Untersuchungen wurden mit Überständen dieses Klons durchgeführt.

5.1.5 chCXCR4 Expression auf B-Zellen während der Ontogenese

Wie in 5.1.1 dargestellt, war chCXCR4-mRNA bereits an ET14 sowohl in der Milz als auch in der Bursa nachzuweisen. Mithilfe des neuen anti-chCXCR4-Antikörpers konnte nun die Expression in Milz und Bursa während der Individualentwicklung auch auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu wurden an ED14 und ED18 sowie an Tag 2 nach dem Schlupf Leukozyten aus Bursa und Milz isoliert und durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer chCXCR4-Expression untersucht.

Die Färbung auf B-Zellen in diesen Organen (Abbildung 9A) zeigte, dass die B Zell-Frequenzen in der Milz an ET14 noch recht hoch waren. Zu ET18 und Tag 2 nach dem Schlupf nahmen die B-Zell-Frequenzen in diesem Organ drastisch ab. In der Bursa waren an ET14 hingegen nur wenige B-Zellen vorhanden. Dort nahmen die B-Zell-Zahlen zwischen ET14 und ET18 aber drastisch zu und blieben auch nach dem Schlupf hoch.

Betrachtete man die in Abbildung 9B dargestellte chCXCR4-Expression der B-Zellen an ET14, so fiel auf, dass die B-Zellen der Milz chCXCR4 in stärkerem Maße exprimierten als die B-Zellen in der Bursa zum gleichen Zeitpunkt. Dieses Verhältnis kehrte sich an ET18 um: Auf bursalen B-Zellen war die chCXCR4-Expression höher als in der Milz. Die Expression von chCXCR4 war an ET14 und ET18 innerhalb der B-Zell-Populationen der beiden Organe zu den jeweiligen Zeitpunkten noch einheitlich ausgeprägt. An Tag 2 nach dem Schlupf wurde in der Bursa eine beginnende Aufspaltung der B-Zell-Population in zwei Subpopulationen augenscheinlich. Es war nun deutlich eine Population mit hoher chCXCR4-Expression von einer zweiten Population mit niedrigerer chCXCR4-Expression abzugrenzen.

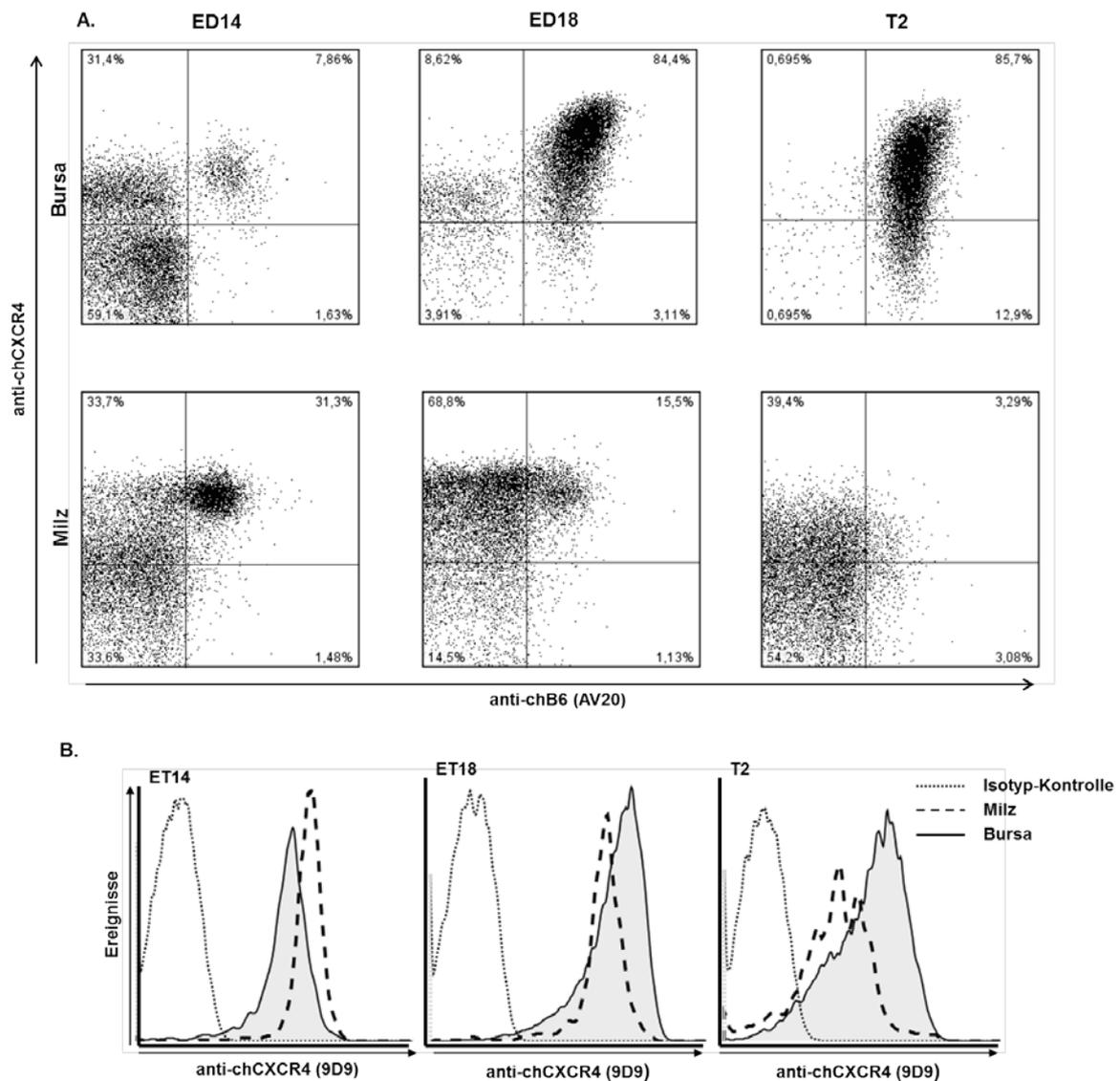


Abbildung 9: chCXCR4-Expression auf B-Zellen während der Ontogenese

A: In drei unabhängigen Experimenten wurden B-Zellen aus Bursa (oben) sowie Milz (unten) an ET14, an ET18 und zwei Tage nach dem Schlupf nach Mehrfachfärbungen mittels anti-chB6-AlexaFluor647- sowie anti-chCXCR4-/anti-muIgG2a-PE-Antikörper durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle wurde ein muIgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper mit gleichem Sekundärantikörper verwendet.

B: Histogramme zum Vergleich der chCXCR4-Expression auf B-Zellen in Milz und Bursa zu den gegebenen Zeitpunkten. Dargestellt sind die Daten der chB6-Positiven Zellen einer repräsentativen Untersuchung aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

5.1.6 chCXCR4-Expression auf B-Zellen von Hühnern mit ausgereiftem Immunsystem

Zur weiteren Untersuchung der chCXCR4-Expression auf B-Zellen wurden Bursa, Milz, Blut, Caecaltonsillen, Knochenmark und Thymus von drei vierwöchigen Hühnern isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt, um die chCXCR4-Expression verschiedener Zellpopulationen einzeln betrachten zu können.

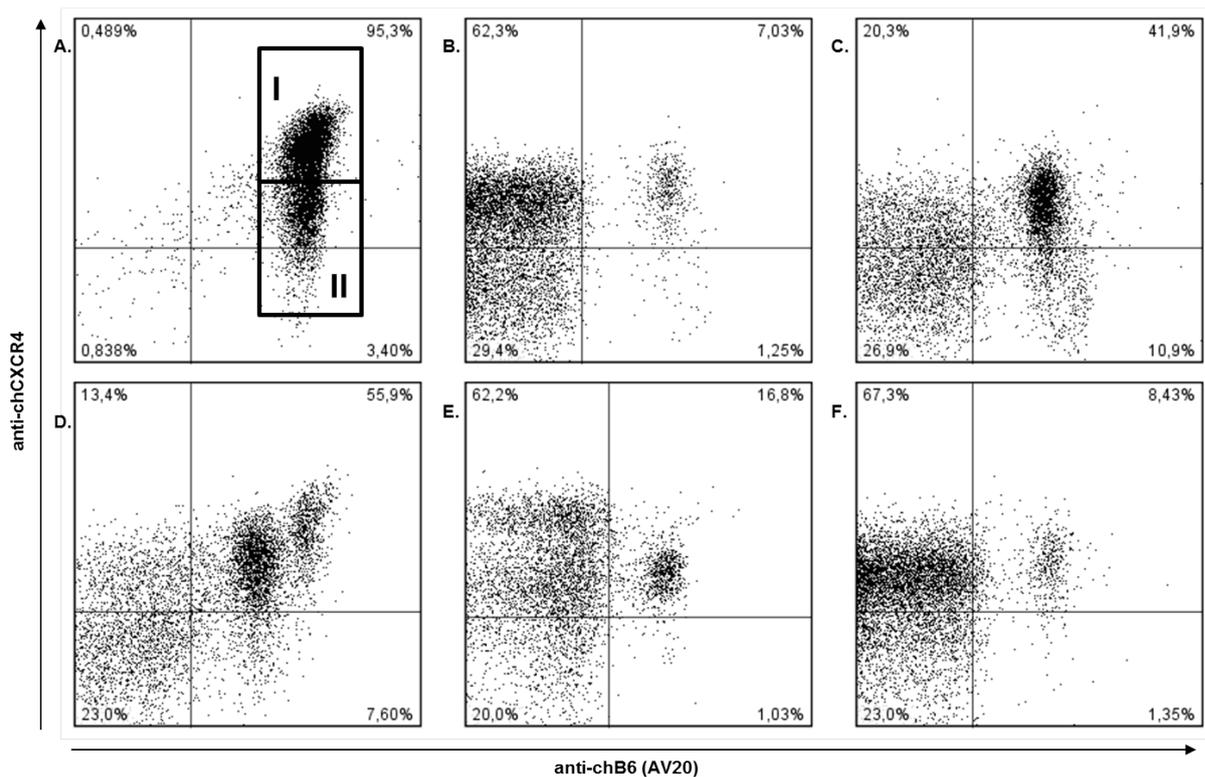


Abbildung 10: chCXCR4-Expression auf B-Zellen unterschiedlicher lymphatischer Gewebe

Leukozyten unterschiedlicher Organe wurden durchflusszytometrisch mittels anti-chCXCR4-Antikörper und anti-muIgG2a-PE sowie anti-chB6-AlexaFluor647 untersucht. Knochenmarks-Leukozyten wurden außerdem mittels anti-chCD45-FITC-Antikörper angefärbt, um die Leukozyten eindeutig von noch verbliebenen Erythrozyten unterscheiden zu können.

Dargestellt sind Leukozyten aus A. Bursa (I chCXCR4^{high}; II chCXCR4^{low}); B. Blut; C. Milz; D. Caecaltonsille; E. Knochenmark und F. Thymus. In E. sind ausschließlich die chCD45-positiven Zellen abgebildet. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Untersuchungen.

Wie Abbildung 10 zeigt, wiesen die B-Zellen in verschiedenen Organen eine deutlich unterschiedliche Oberflächen-Expression von chCXCR4 auf. So fanden sich in der Bursa zwei Populationen von B-Zellen, von denen eine eine hohe chCXCR4-Expression zeigte (mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI)=4800), während bei der zweiten Population eine niedrigere Oberflächen-Expression dieses Proteins zu beobachten war (MFI=700). Die erste dieser beiden Populationen wird im Folgenden als chCXCR4^{high}, die zweite als chCXCR4^{low} bezeichnet (Abbildung 10A, I und II). Aus Blut isolierte Hühner-B-Zellen (MFI=2500) zeigten wie auch die B-Zellen aus Milz (MFI=1300), Thymus (MFI=1100) und Knochenmark (MFI=1550) eine vergleichsweise niedrige chCXCR4-Expression. In den Caecaltonsillen waren stets zwei B-Zell-Populationen zu unterscheiden. Die chB6-Expression der einen B-Zell-Population entsprach derjenigen von B-Zellen aus dem Blut, während die andere B-Zell-Population eine höhere chB6-Expression zeigte. Die Zellen mit niedrigerer chB6-Expression werden nachfolgend als chB6^{med} bezeichnet, diejenigen mit

höherer Expression als $\text{chB6}^{\text{high}}$. Die chCXCR4 -Expression auf der $\text{chB6}^{\text{high}}$ Population (MFI=4450) war höher als diejenige der chB6^{med} Population (MFI=2500). Undeutlicher abgrenzbare B-Zell-Populationen unterschiedlicher chB6 -Expression waren auch regelmäßig in den Milzen und unregelmäßig im Blut der untersuchten Tiere vorzufinden (siehe auch Abbildungen 16 und 35). Im Gegensatz zu den $\text{chB6}^{\text{high}}$ B-Zellen der Caecaltonsillen zeigten die $\text{chB6}^{\text{high}}$ B-Zellen in der Milz (MFI=200) und im Blut (MFI=150) ein niedrigeres Expressionsniveau von chCXCR4 als die chB6^{med} B-Zellen derselben Herkunft.

5.1.6.1 Phänotypisierung der B-Zellen aus der Bursa

Zur näheren Phänotypisierung der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen in der Bursa wurden diese Zellen durchflusszytometrisch neben ihrer Expression von chCXCR4 und chB6 auch auf die Expression weiterer B-Zell-Marker untersucht. Diese waren die leichte Kette des Immunglobulin-Moleküls (L-Kette), chMHCII und das OV-Antigen (chL12). Außerdem wurde die Zellgröße der jeweiligen Populationen in die Betrachtung mit einbezogen.

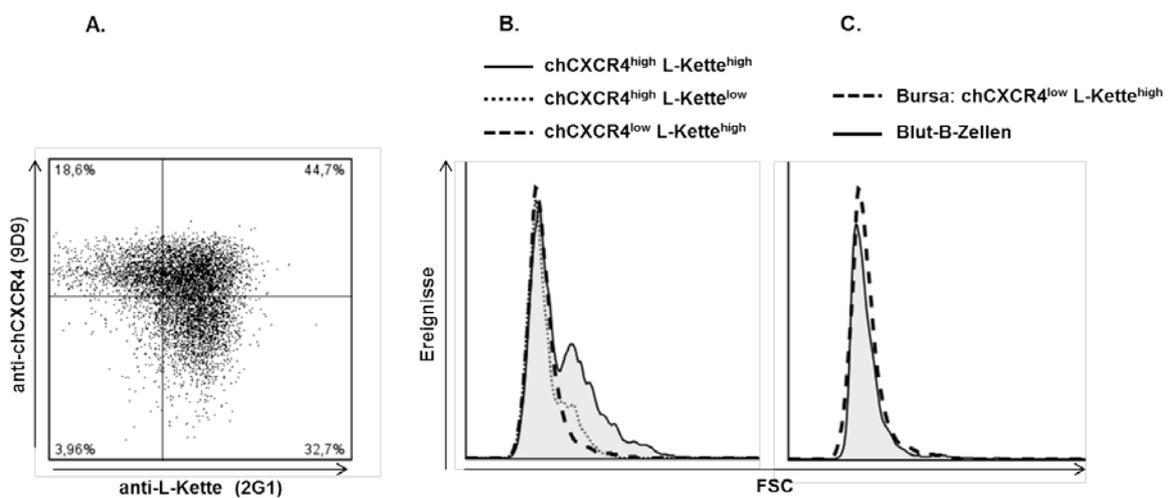


Abbildung 11: B-Zell-Rezeptor- und chCXCR4 -Expression auf bursalen B-Zellen

Leukozyten aus der Bursa und aus dem Blut eines vierwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbung mittels anti- chB6 - und anti- chCXCR4 -Antikörper sowie Antikörpern gegen die L-Kette (2G1) durchflusszytometrisch untersucht (A). Gezeigt ist die Zellgröße der jeweiligen Population (B) sowie ein Vergleich der Größe bursaler B-Zellen mit B-Zellen aus dem Blut. In den Abbildungen sind jeweils nur die Ergebnisse der chB6 -positiven Zellen dargestellt.

Bei der Analyse der Mehrfachfärbung chB6 gegen chCXCR4 und L-Kette in Abbildung 11A konnten drei Populationen bursaler B-Zellen unterschieden werden; zum einen zwei $\text{chCXCR4}^{\text{high}}$ Populationen, von der eine nur wenig Immunglobulin auf der Oberfläche

trug ($\text{CXCR4}^{\text{high}}/\text{L-Kette}^{\text{low}}$) und die andere deutlich positiv für die L-Kette war ($\text{CXCR4}^{\text{high}}/\text{L-Kette}^{\text{high}}$), zum anderen eine $\text{chCXCR4}^{\text{low}}$ Population, welche nur L-Kette-positive Zellen beherbergte ($\text{CXCR4}^{\text{low}}/\text{L-Kette}^{\text{high}}$). Bei den beiden $\text{chCXCR4}^{\text{high}}$ Populationen waren jeweils eine Population größerer Zellen von einer Population kleinerer Zellen zu unterscheiden (Abbildung 11B). Der Durchmesser der großen B-Zellen in der Bursa entsprach etwa dem Durchmesser von mitotisch aktiven Blasten, während ein kleinerer Zelldurchmesser eher ein Indiz dafür war, dass bei den betroffenen Zellen aktuell keine mitotische Aktivität vorlag. Die Population größerer Zellen fehlte bei den $\text{chCXCR4}^{\text{low}}$ B-Zellen der Bursa. Die Zellen dieses Phänotyps sind etwa so groß wie die B-Zellen, die im Blut vorkommen (Abbildung 11C).

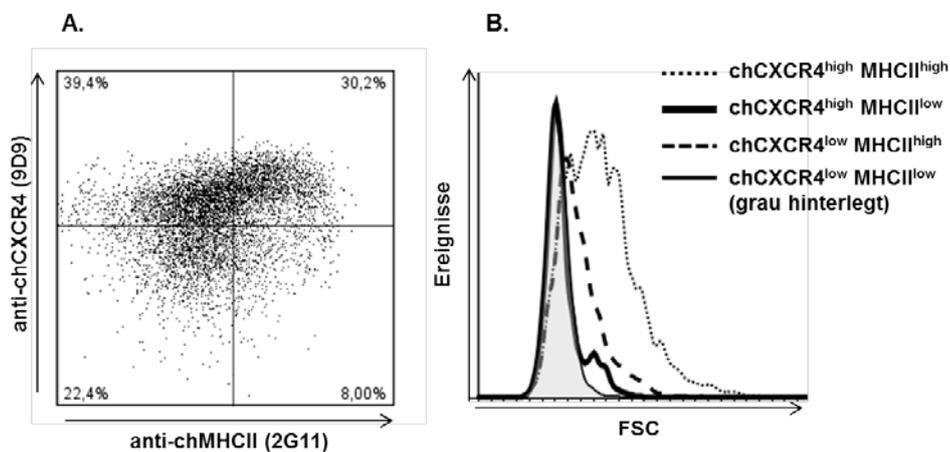


Abbildung 12: MHCII- und chCXCR4-Expression auf bursalen B-Zellen

Leukozyten aus der Bursa eines vierwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbung mittels anti-chB6- und anti-chCXCR4-Antikörper sowie Antikörpern gegen chMHCII durchflusszytometrisch untersucht (A). Gezeigt ist die Zellgröße der jeweiligen Population (B). In den Abbildungen sind jeweils nur die Ergebnisse der chB6-positiven Zellen dargestellt.

Die meisten $\text{chCXCR4}^{\text{low}}$ B-Zellen in der Bursa (22% aller B-Zellen) zeigten eine geringe chMHCII-Expression, während ein geringerer Anteil (8% aller B-Zellen) dieser Zellpopulation $\text{chMHCII}^{\text{high}}$ war (Abbildung 12A). Die $\text{chCXCR4}^{\text{high}} \text{MHCII}^{\text{high}}$ Population bestand aus großen Zellen, während die $\text{chCXCR4}^{\text{high}} \text{MHCII}^{\text{low}}$ Population kleine und große Zellen enthielt (Abbildung 12B). Die $\text{chCXCR4}^{\text{low}} \text{MHCII}^{\text{high}}$ B-Zellen der Bursa waren etwas größer als die $\text{chCXCR4}^{\text{low}} \text{MHCII}^{\text{low}}$ B-Zellen.

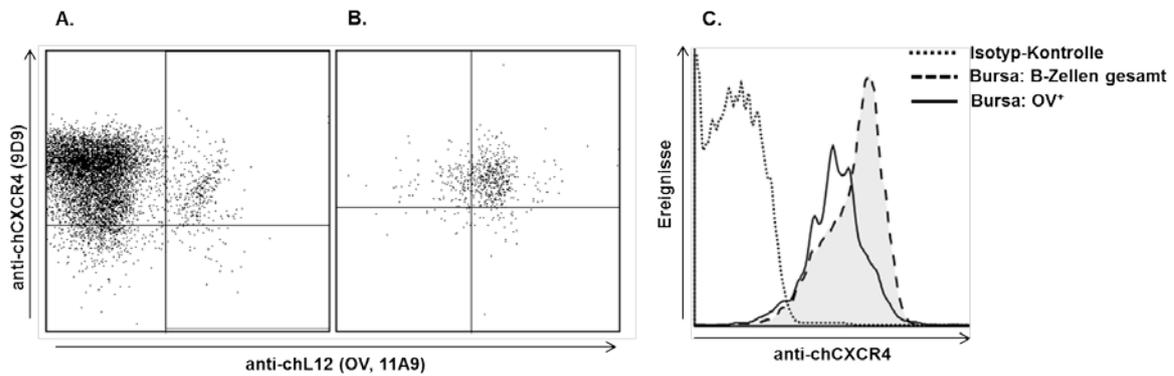


Abbildung 13: chL12 (OV)- und chCXCR4-Expression auf B-Zellen aus Bursa und Blut

Leukozyten aus der Bursa (A) und aus dem Blut (B) eines vierwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbung mittels anti-chB6- und anti-chCXCR4-Antikörper sowie Antikörpern gegen chL12 (OV) durchflusszytometrisch untersucht. In den Abbildungen sind jeweils nur die Ergebnisse der chB6-positiven Zellen dargestellt. Die OV^+ Zellen der Bursa sind $chCXCR4^{low}$ (C).

Das chL12 (OV)-Antigen gilt als Marker für reife B-Zellen. Postbursale B-Zellen aus dem Blut exprimieren dieses Antigen auf ihrer Oberfläche (Abbildung 13B), während es in der Bursa nur auf einer kleinen B-Zell-Population von etwa vier bis fünf Prozent nachzuweisen ist (Abbildung 13A). OV^+ bursale B-Zellen sind in der Lage die Bursa zu verlassen, während die OV^- Zellen nicht zur Auswanderung aus der Bursa fähig sind. Abbildung 11C zeigt, dass diese OV^+ bursalen B-Zellen einer kleinen Subpopulation der $chCXCR4^{low}$ Population angehören.

In der Bursa waren also B-Zellen zu finden, die $chCXCR4^{high}$ waren, während andere B-Zellen in diesem Organ $chCXCR4^{low}$ waren. Die $chCXCR4^{high}$ B-Zellen zeigten unterschiedliche Populationen mit unterschiedlicher Expression bezüglich L-Kette und MHCII. Allerdings waren alle $chCXCR4^{high}$ B-Zellen stets OV^- . Hingegen zeigten die $chCXCR4^{low}$ B-Zellen der Bursa eine einheitlich hohe Oberflächen-Immunglobulin-Expression und eine meist verhältnismäßig niedrige MHCII-Expression. Allerdings exprimierte nur ein Teil der $chCXCR4^{low}$ -Population das OV -Antigen (5% aller B-Zellen). Somit zeigte die Subpopulation emigrationsbereiter bursaler B-Zellen eine nur noch geringe $chCXCR4$ -Expression.

5.1.6.2 Die Expression von chCXCR4 in kryo-histologischen Bursa-Präparaten

Um die chCXCR4-Expression auf B-Zellen in der Bursa genauer zu lokalisieren, wurden kryohistologische Präparate dieses Organes bezüglich ihrer chCXCR4-Expression untersucht.

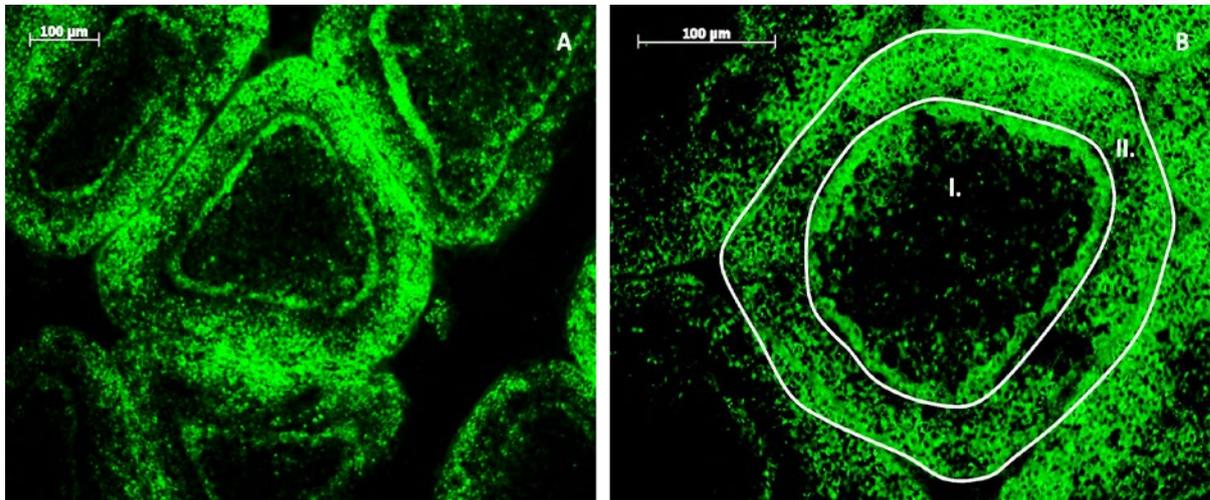


Abbildung 14: Die Lokalisation der chCXCR4-Expression in der Bursa

Kryo-histologische Präparate wurden mittels anti-chCXCR4-Antikörper und anti-muIgG-AlexaFluor488 gefärbt. A: Übersichtsaufnahme über mehrere Bursa-Follikel (Vergrößerung 10x). B: Bursa-follikel (Vergrößerung 20x); I = Medulla, II = Cortex

Die histologischen Untersuchungen ergaben, dass die Expression von chCXCR4 in der Follikel-Rinde stärker war als im Mark. Im zentralen Bereich des Follikel-Marks konnten die bursalen Zellen fast nicht angefärbt werden, am Rand dieser Struktur direkt unterhalb der cortico-medullären Grenze hingegen war ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen.

5.1.6.3 Phänotypisierung der B-Zellen aus den Caecaltonsillen

Wie bereits in Abbildung 10 ersichtlich, waren in den Caecaltonsillen stets zwei B-Zell-Populationen mit unterschiedlicher chB6-Expression zu finden, die auch unterschiedliche Expressionen von chCXCR4 aufwiesen: chB6^{med} und chB6^{high}. Um diese beiden Populationen phänotypisch besser zu charakterisieren wurden zusätzliche durchflusszytometrische Untersuchungen nach Mehrfachfärbungen gegen MHCII und L-Kette durchgeführt.

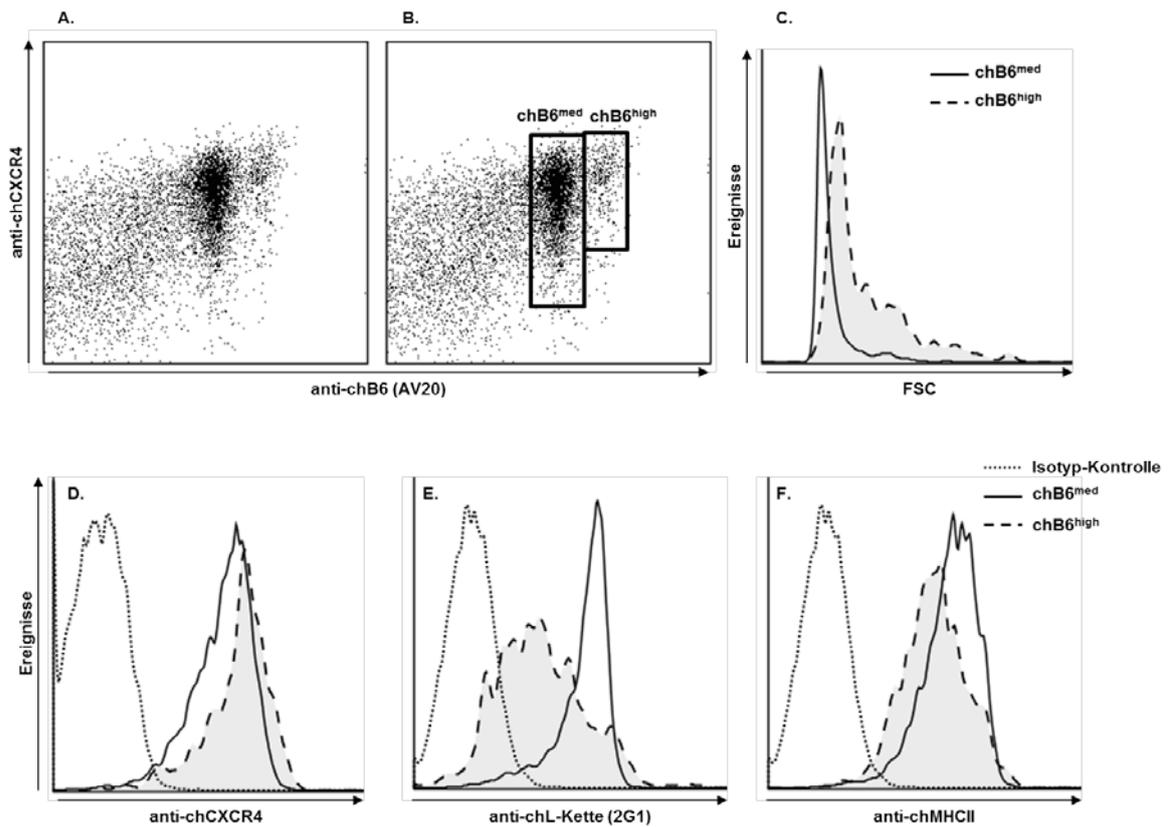


Abbildung 15: Phänotypisierung von B-Zellen aus Caecaltonsillen

Leukozyten aus den Caecaltonsillen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die in A. ohne Messfenster und in B. mit Messfenstern gezeigten B-Zell-Subpopulationen unterschiedlicher chB6-Expression ($chB6^{high}/chB6^{med}$) sind in C.-F. phänotypisch näher charakterisiert. Als Kontrolle dienten Färbungen, bei denen die jeweiligen Antikörper durch einen Isotyp-spezifischen Kontroll-Antikörper ersetzt wurden.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, hatten die $chB6^{high}$ Zellen in der Caecaltonsille einen größeren Zelldurchmesser als die $chB6^{med}$ Zellen. Außerdem exprimierten die $chB6^{high}$ Zellen chCXCR4 in höherem Ausmaß als $chB6^{med}$ Zellen, dagegen aber L-Kette und auch chMHCII auf niedrigerem Niveau.

5.1.6.4 Phänotypisierung der B-Zellen aus der Milz

Auch in der Milz waren regelmäßig zwei Populationen von B-Zellen mit unterschiedlicher chB6-Expression zu finden, welche zur besseren phänotypischen Charakterisierung ebenfalls mithilfe verschiedener zusätzlicher Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht wurden.

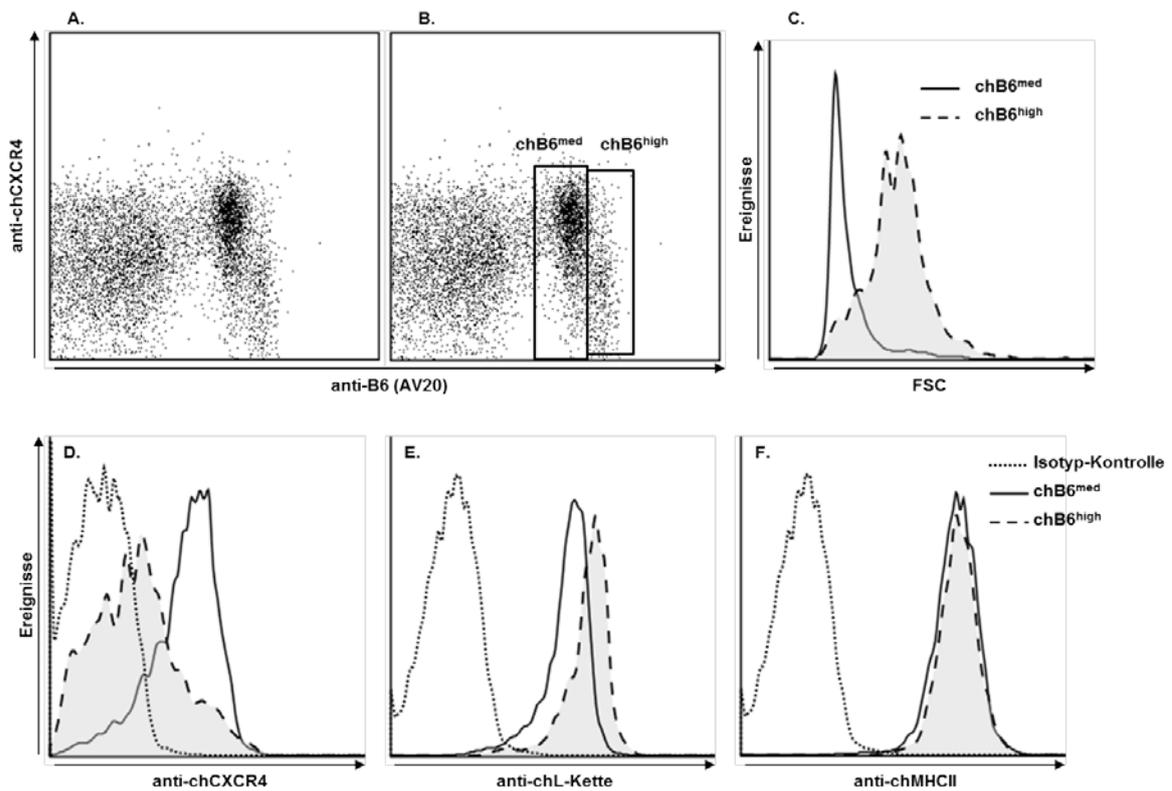


Abbildung 16: Phänotypisierung von B-Zellen aus der Milz

Leukozyten aus der Milz wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die in A. und B. gezeigten B-Zell-Subpopulationen sind in C.-F. phänotypisch näher charakterisiert.

Abbildung 16 zeigt, dass die $chB6^{high}$ Zellen in der Milz größer waren als die $chB6^{med}$ Zellen. Außerdem exprimierten die $chB6^{high}$ Zellen $chCXCR4$ auf einem deutlich geringeren Niveau als die $chB6^{med}$ Zellen, im Gegensatz dazu allerdings mehr Immunglobulin. Bei Betrachtung der $chMHCII$ -Expression waren keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

Eine Phänotypisierung der im Blut aufzufindenden B-Zell-Populationen wird in Kapitel 5.3.5.2 gezeigt. Außerdem ist eine Zusammenstellung der phänotypischen Eigenschaften der verschiedenen B-Zell-Populationen der verschiedenen Organe in Tabelle 11 (Seite 106) zu finden.

5.1.6.5 chCXCR4-Expression auf chCD40L-stimulierten primären Hühnerleukozyten

Zur Untersuchung, ob sich der chCXCR4-Phänotyp in aktivierten Kulturen primärer Hühnerlymphozyten im Vergleich zum Phänotyp vor Kultivierung ändert, wurden Leukozyten aus Bursa und Milz dreier vierwöchiger Hühner isoliert und durch Zugabe von chCD40L (1µg/ml) zur Proliferation angeregt. Direkt vor der Kultivierung sowie 24 Stunden nach Zugabe von chCD40L wurden die Zellen mithilfe verschiedener Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht.

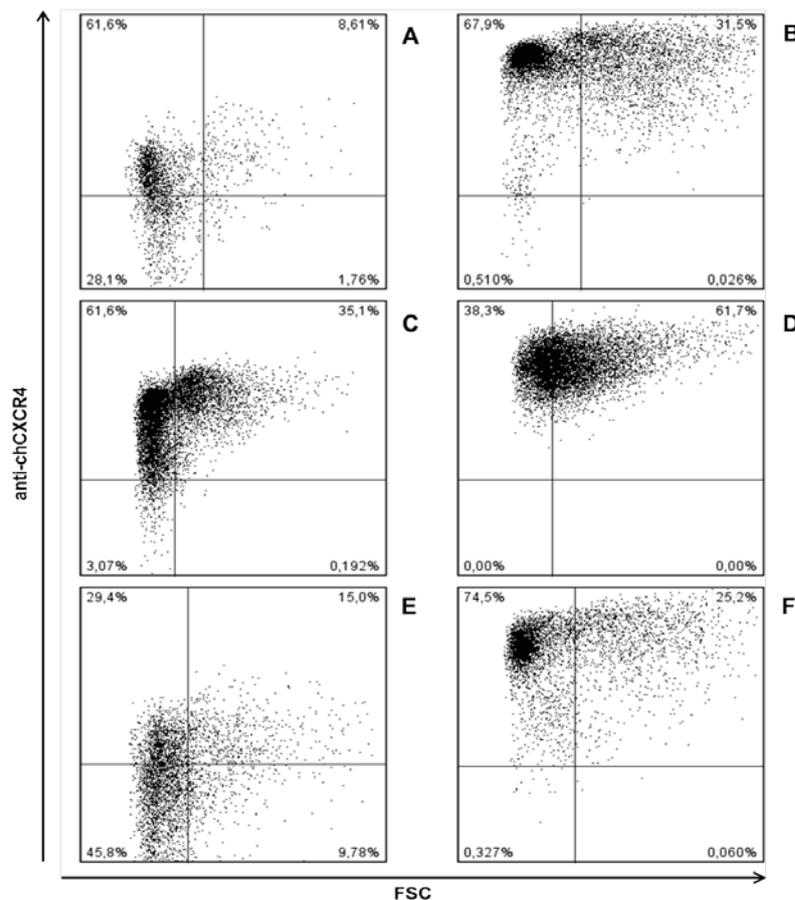


Abbildung 17: chCXCR4-Phänotyp von Hühnerlymphozyten in chCD40L-stimulierten Kurzzeitkulturen

Hühnerleukozyten aus Bursa (A, B) und Milz (C-F) wurden nach Zugabe von chCD40L (1µg/ml) für 24 Stunden kultiviert. Die chCXCR4-Expression sowie die Größe der Zellen wurden durchflusszytometrisch in A; C; E vor der Kultivierung sowie in B; D; F nach 24-stündiger Kultivierung bestimmt. B-Zellen wurden mittels anti-chB6-AlexaFluor647-Antikörper und T-Zellen mittels anti-chCD3-FITC-Antikörper identifiziert. In A und B sind die B-Zellen einer Bursa dargestellt, C und D zeigen die B-Zellen einer Milz und in E und F sind die CD3⁺ Zellen einer Milz zu sehen. Dargestellt sind die Ergebnisse einer repräsentativen Untersuchung von insgesamt drei Experimenten.

Die Hühnerzellen zeigten vor Beginn der Kultivierung die jeweils organ- und zelltypspezifische chCXCR4-Expression. So wiesen die B-Zellen der Milz, wie in Abbildung 17 dargestellt, vor der Kultivierung eine insgesamt niedrigere chCXCR4-Expression auf als die B-Zellen aus der Bursa. Die T-Zellen der Milz zeigten als 0-Stunden-Wert ebenfalls eine niedrige chCXCR4-Expression. Nach 24-stündiger Kultivierung in Anwesenheit von chCD40L zeigte sich bei allen Zellpopulationen eine deutliche Zunahme der mitotisch aktiven Blasten mit größerem Zelldurchmesser. Sowohl auf den zu diesem Zeitpunkt vorhandenen kleineren Lymphozyten als auch auf den Blasten

war stets ein massiver Anstieg der chCXCR4-Expression im Vergleich zum 0h-Wert zu beobachten. Die Kultivierung primärer Hühnerleukozyten in Anwesenheit von CD40L führt also zu einer drastischen Zunahme der chCXCR4-Expression.

5.1.7 chCXCR4-Expression auf weiteren Zellen des Hühner-Immunsystems

Da CXCR4 beim Säuger nicht nur durch seine Expression auf B-Zellen eine Rolle bei der Leukozytenmigration spielt, wurde auch die chCXCR4-Expression anderer Zellen des Hühner-Immunsystems durchflusszytometrisch bestimmt.

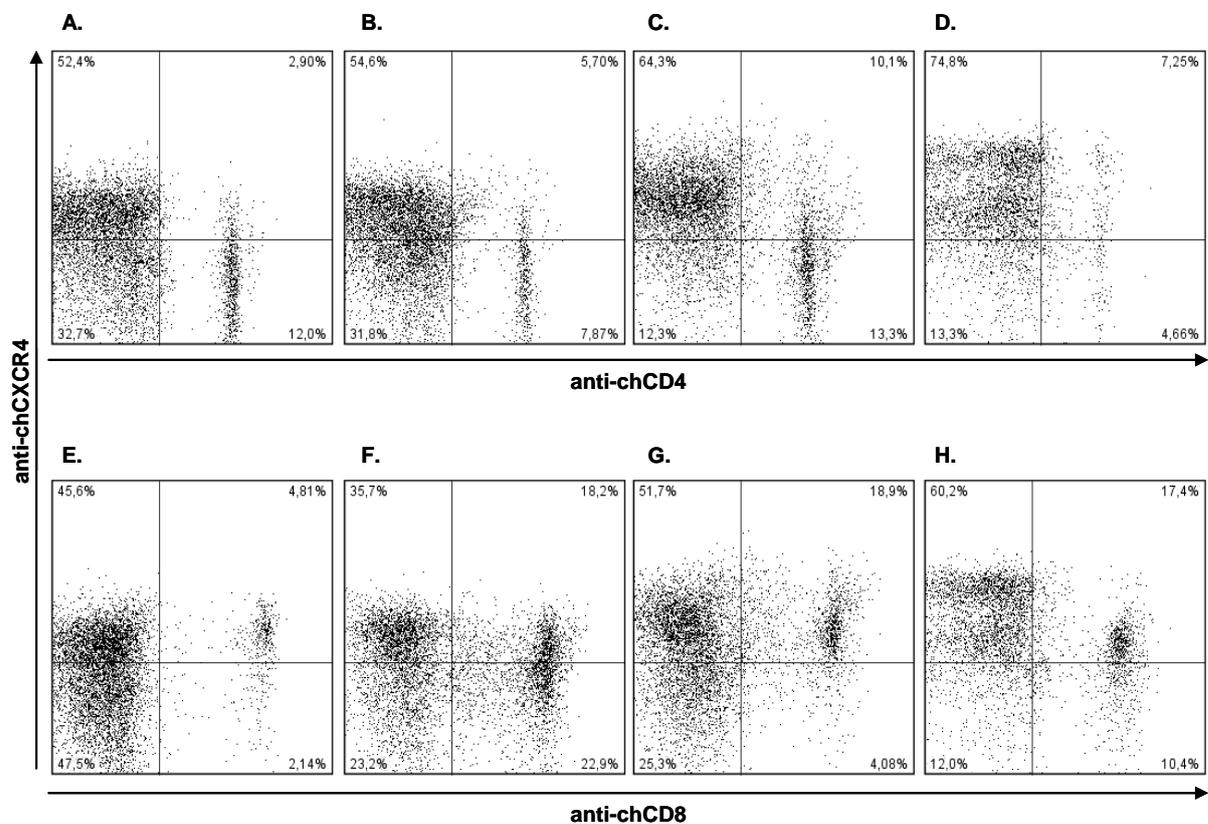


Abbildung 18: chCXCR4-Expression auf T-Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe

Die Expression von chCXCR4 verschiedener Leukozytenpopulationen wurde durchflusszytometrisch untersucht. A.-D. zeigen die chCXCR4-Expression auf CD4⁺ Zellen; E.-H. zeigen die chCXCR4-Expression auf CD8⁺ Zellen. Dargestellt sind Zellen aus A. und E. Blut; B. und F. Milz; C. und G. Caecaltonsille; D. und H. Knochenmark (hier sind ausschließlich die chCD45⁺ Zellen zu sehen).

Die CD4⁺ Zellen aus dem Blut und der Milz zeigten eine geringe chCXCR4-Expression (Abbildung 18 A, B). In der Milz konnten regelmäßig zwei undeutlich voneinander abgrenzbare Populationen CD4⁺ Zellen unterschiedlicher chCXCR4-Expression gefunden

werden (Abbildung 18B). Im Knochenmark konnten sogar drei verschiedene Populationen $CD4^+$ Zellen anhand der chCXCR4-Expression voneinander unterschieden werden: Eine Population mit niedriger, eine weitere mit mittlerer und eine dritte mit hoher chCXCR4-Expression (Abbildung 18D).

Auf den $CD8^+$ Zellen war die chCXCR4-Expression insgesamt höher als die Expressionen auf $CD4^+$ Zellen der gleichen Organe (mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) im Blut: $CD8^+=950$, $CD4^+=500$). Die $CD8^+$ Zellen der Milz zeigten hier das niedrigste Expressionsniveau (Abbildung 18F). Im Knochenmark fand sich ebenfalls eine niedrigere chCXCR4-Expression als in Blut und Caecaltonsille (Abbildung 18H). Allerdings war im Knochenmark eine winzige, stets anzutreffende Population von $CD8^+$ Zellen mit hoher chCXCR4-Expression vorhanden. Generell erschien die chCXCR4-Expression auf $CD4^+$ Zellen der verschiedenen Organe mit Ausnahme des Knochenmarkes nicht nur niedriger, sondern auch einheitlicher als die chCXCR4-Expression auf den $CD8^+$ Zellen.

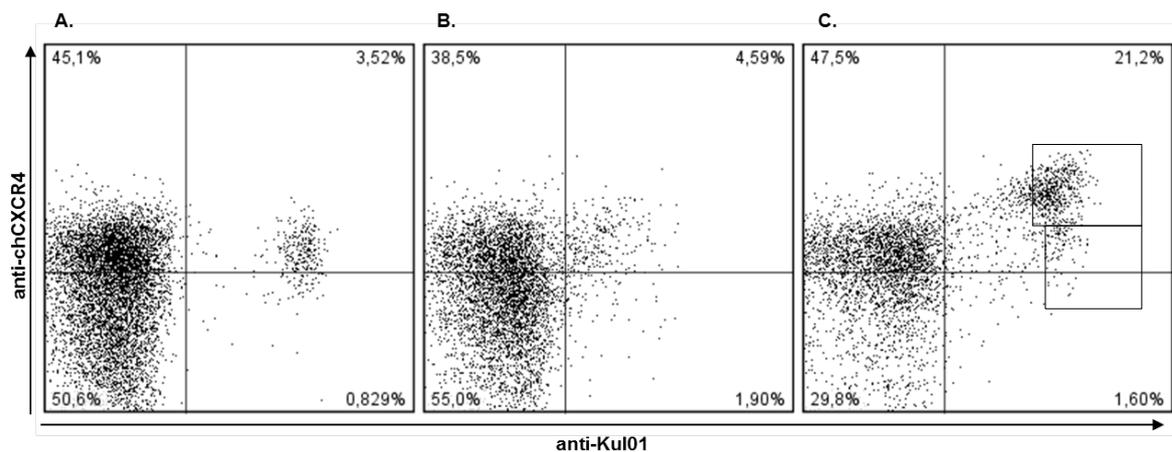


Abbildung 19: chCXCR4-Expression auf $Kul01^+$ Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Untersuchung der chCXCR4-Expression von $Kul01^+$ Zellen aus A. Blut; B. Milz; C. Knochenmark (hier ausschließlich $chCD45^+$ Zellen zu sehen). Gezeigt sind die Daten einer repräsentativen Untersuchung aus insgesamt drei Experimenten.

$Kul01$ ist ein Marker für myeloide Zellen wie beispielsweise Blut-Monozyten oder Populationen residenter Gewebsmakrophagen. Abbildung 19 zeigt, dass nahezu alle $Kul01^+$ Zellen aus Milz, Blut und Knochenmark chCXCR4-positiv waren. Im Knochenmark waren bei allen untersuchten Hühnern zwei Populationen zu unterscheiden: Eine größere Population mit sehr hohem chCXCR4-Expressionslevel und eine kleinere zweite Population mit niedrigerer Expression von chCXCR4. Die $Kul01^+$ Zellen in Milz

und Blut zeigten insgesamt eine niedrigere chCXCR4-Expression als diejenigen im Knochenmark.

5.1.8 chCXCR4-Expression auf Thymozyten

Wie in Abbildung 20 dargestellt, existieren im Thymus neben den CD4⁺ und CD8⁺ Zellen auch doppelt-negative und doppelt-positive Thymozyten. Das chCXCR4-Expressionsniveau der verschiedenen Thymozyten-Populationen aus den Organen dreier erwachsener Hühner wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

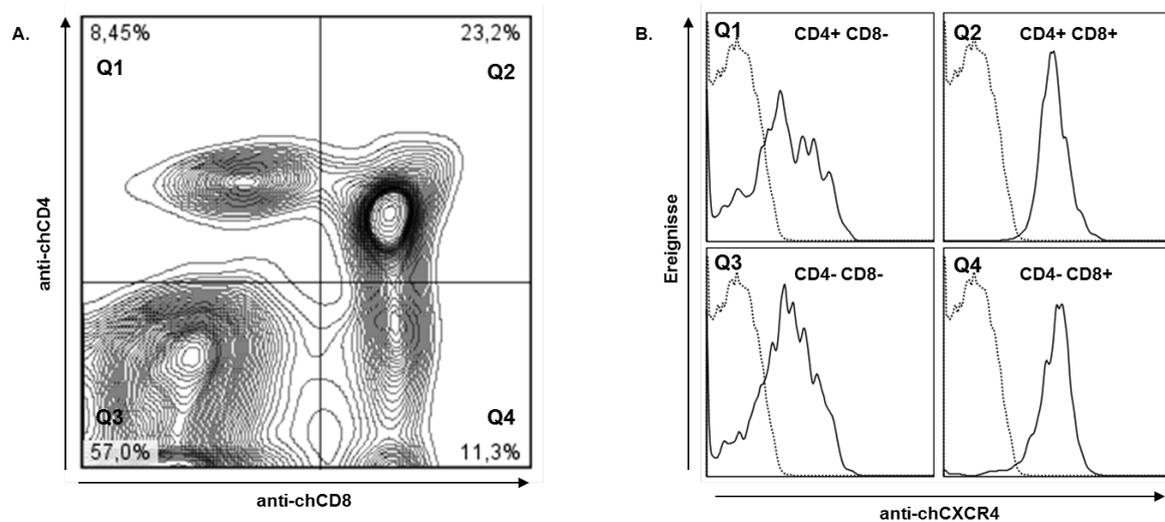


Abbildung 20: chCXCR4-Expression auf Thymozyten

Die verschiedenen Thymozyten wurden durchflusszytometrisch mittels Dreifach-Färbung durch einen anti-chCD8-FITC-, einen anti-chCD4- und einen chCXCR4-Antikörper untersucht. Als Sekundäntikörper wurde im Falle von chCD4 ein anti-muIgG1-PerCP- und für chCXCR4 ein anti-muIgG2a-PE-Antikörper verwendet.

A: Färbung zur Identifizierung der CD4⁺, CD8⁺, doppelt-positiven und doppelt-negativen Thymozyten aus einer repräsentativen Untersuchung von insgesamt drei Experimenten.

B: chCXCR4-Expressionen auf den verschiedenen in A. markierten Subpopulationen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (gepunktete Linien).

Die chCXCR4-Expression der doppelt-positiven (MFI=1600) und der CD8⁺ Zellen (MFI=1450) war höher und auch einheitlicher als die der CD4⁺ CD8⁻ (MFI=700) und der doppel-negativen Thymozyten (MFI=650). Es kommt während der Reifung von der doppelt-negativen Zelle über doppelt-positive Zwischenstadien zu einfach-positiven Thymozyten also zuerst zu einer Hochregulation von chCXCR4 und nachfolgend vor allem bei den CD4⁺ Zellen zu einer Herunterregulation dieses Chemokinrezeptors. In der Peripherie findet sich passend zu diesen Beobachtungen ebenfalls regelmäßig eine höhere

Expression auf CD8⁺ Zellen verglichen mit der Expression auf CD4⁺ Zellen (siehe Abbildung 18).

5.1.9 chCXCR4-Expression auf Zelllinien

Für Tests der Rezeptor-Ligand-Interaktion zwischen chCXCR4 und verschiedenen potentiellen Liganden sollte eine natürlicherweise chCXCR4-exprimierende Hühner-Zelllinie gefunden werden. Da bei der Untersuchung primärer Hühnerzellen eine starke Expression von chCXCR4 auf B-Zellen und Makrophagen nachweisbar war, wurden die B-Zelllinien 2D8 und DT40 sowie die Makrophagen-Linie HD11 durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer chCXCR4-Expression untersucht.

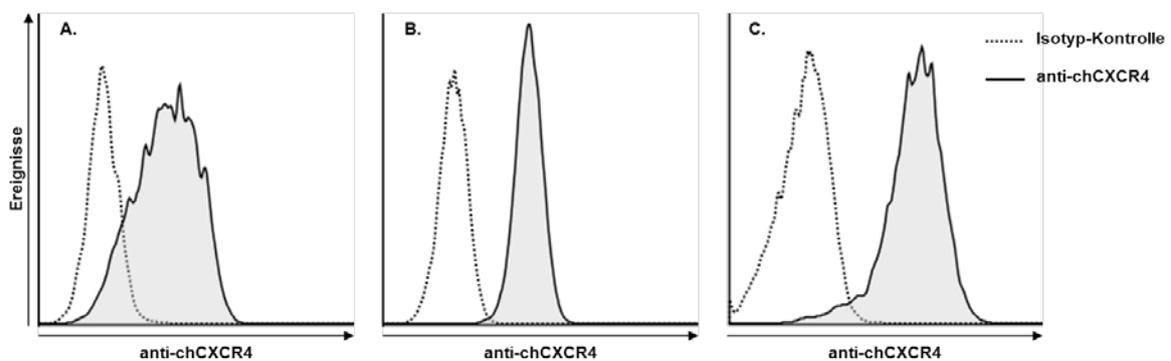


Abbildung 21: chCXCR4-Expression auf Hühner-Leukozyten-Linien

Durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Zelllinien nach Färbung mittels anti-chCXCR4-Antikörper und anti-muIgG2a-FITC-Antikörper. Zu sehen ist außerdem die jeweils dazugehörige Isotyp-Kontrollfärbung. A. HD11; B. 2D8; C. DT40

Wie Abbildung 21 zeigt, wiesen alle untersuchten Zelllinien eine Oberflächen-Expression von chCXCR4 auf. Die aus bursalen Hühnerzellen entstandene Zelllinie DT40 wurde aufgrund ihrer hohen chCXCR4-Expression und ihres primären Hühner-B-Zellen noch recht ähnlichen Phänotyps für erste Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Interaktion ausgewählt.

5.2 Rezeptor/Ligand-Interaktion zwischen chCXCR4 und CXCL12

Allein die Tatsache, dass chCXCR4 auf der Oberfläche einiger Hühnerleukozyten exprimiert wird, sagt für sich betrachtet noch nichts über einen funktionellen Zusammenhang zwischen Chemokinrezeptor-Expression und den möglichen Effekten nach der Bindung potentieller Liganden aus. Zur Untersuchung möglicher Einflüsse auf Zellen

nach Bindung potentieller Liganden an chCXCR4 wurden verschiedene Ansätze gewählt. Da Chemokinrezeptoren wie chCXCR4 typische Vertreter der G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind, kommt es nach Bindung von Rezeptor-Agonisten an den Rezeptor zu einem durch verschiedene Mittel nachweisbaren Calcium-Anstieg im Zytosol. Dieses Phänomen wurde zum Nachweis benutzt, ob CXCL12 agonistisch an chCXCR4 bindet. Außerdem wurde untersucht, ob es nach einer Bindung von Liganden zu einer Expressionsänderung von chCXCR4 auf der Zelloberfläche kommt. Überdies wurden Transwell-Chemotaxis-Assays durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine agonistische Bindung von CXCL12 an chCXCR4 eine gerichtete Migration von Hühner-Leukozyten auslöst.

5.2.1 Messung des Calciumeinstroms nach Bindung potentieller chCXCR4-Liganden

5.2.1.1 Messung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration nach Ligandenbindung

Zur Untersuchung des Einflusses potentieller chCXCR4-Liganden auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurden Zellen der Linie DT40 zunächst mit Fluo-4 beladen. Danach wurde die Fluoreszenz der Zellen vor und nach Zugabe eines potentiell agonistischen chCXCR4-Liganden durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle einer erfolgreichen Beladung der DT40-Zellen mit Fluo-4 wurde ein anti-chIgM-Antikörper (M1, 10µg/ml) verwendet, dessen Bindung an die Zellen nach Quervernetzung der membranständigen chIgM-Moleküle zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration und folglich zu einem Fluoreszenzanstieg führen sollte. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Calciumfluxes nach Bindung verschiedener potentieller Liganden sind in Abbildung 22 gezeigt. Bei den verschiedenen Darstellungen sind die jeweils unterschiedlichen Achsenskalierungsbereiche der Fluo-4-Fluoreszenz zu beachten. Wie zu erwarten, führte eine Quervernetzung von membranständigem IgM zu einem Calciumflux ins Zytoplasma und folglich zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz (Abbildung 22A). Die Zugabe serumfreier, chCXCL12a-haltiger Zellkulturüberstände von transfizierten HEK-293-T-Zellen löste einen Calciumanstieg als Signal der Ligandenbindung an die DT40-Zellen aus (Abbildung 22B), während die Zugabe serumfreier Zellkulturüberstände aus Kontrolltransfektionen von HEK-293-T-Zellen ohne chCXCL12a keinen Anstieg der Fluoreszenz bedingte (Abbildung 22C). Der Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von chCXCL12a war allerdings verglichen mit dem

Fluoreszenzanstieg nach Quervernetzung der Oberflächen-Immunglobuline wesentlich geringer.

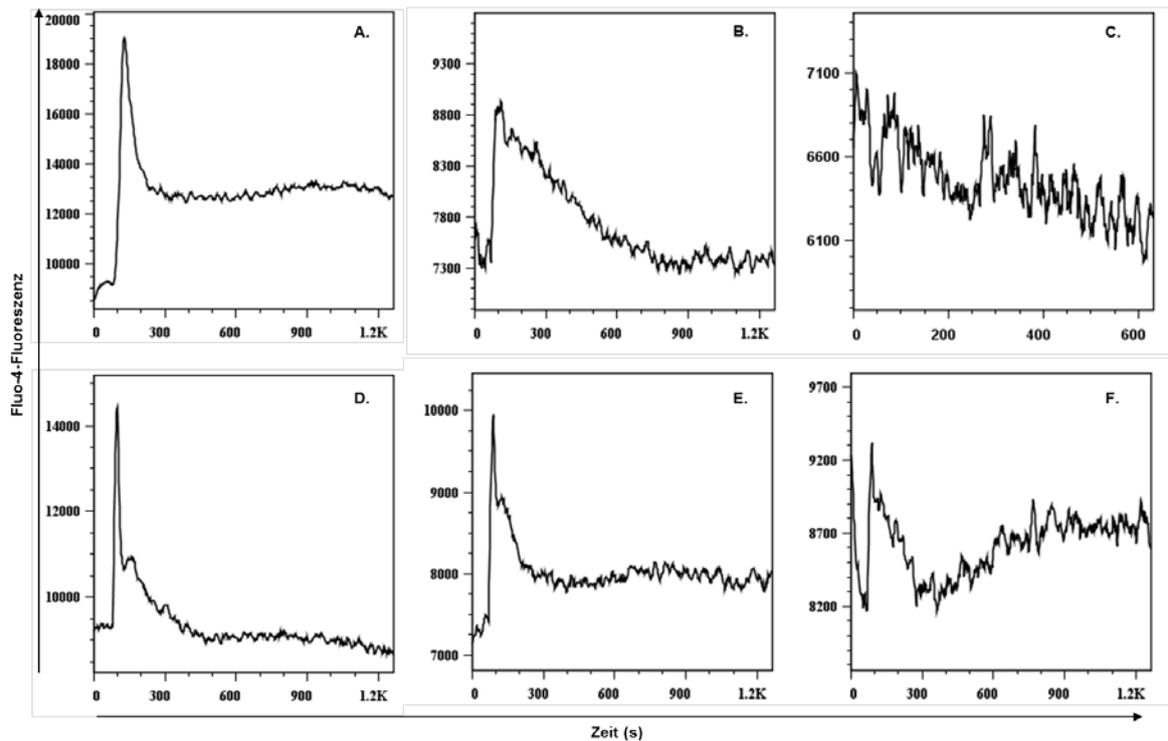


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Untersuchung des Calcium-Einstroms in DT40-Zellen nach Bindung verschiedener Liganden

DT40-Zellen wurden mit Fluo-4 beladen und mit den angegebenen potentiellen chCXCR4-Liganden inkubiert. Nach einer 60-sekündigen Messung der Basalfluoreszenz wurde der jeweilige Ligand zugegeben und der Verlauf der Fluoreszenz sofort für mehrere Minuten gemessen.

A. anti-chIgM (M1, 10 μ g/ml);

B. chCXCL12a (serumfreier Zellkulturüberstand transient transfizierter HEK-293-T-Zellen, Verdünnung 1:2);

C. Kontroll-Zellkulturüberstand (serumfreier Zellkulturüberstand von transient mit einem Kontroll-Vektor transfizierten HEK-293-T-Zellen, Verdünnung 1:2);

D. humanCXCL12a (100ng/ml);

E. ratCXCL12a (100ng/ml);

F. mouseCXCL12a (100ng/ml).

Bei der Untersuchung von rekombinant hergestellten, kommerziell erhältlichen CXCL12a-Proteinen verschiedener Säuger-Spezies auf DT40-Zellen lösten huCXCL12a und rt-CXCL12a jeweils einen Calciumflux ins Zytoplasma von DT40-Zellen aus (Abbildung 22D und E). Der Calciumflux nach Zugabe von huCXCL12a war kurzzeitig stärker als der nach Zugabe von chCXCL12a und rtCXCL12a, allerdings fiel das Fluoreszenzsignal nach huCXCL12a-Zugabe auch schneller wieder auf das Basalniveau verglichen mit der Zugabe von chCXCL12a oder rtCXCL12a. Die Zugabe von muCXCL12a führte zu einem

vergleichsweise geringen Calciumeinstrom ins Zytoplasma der DT40-Zellen (Abbildung 22F).

Für die meisten weiterführenden funktionellen Untersuchungen wurde huCXCL12a (huSDF-1a) als potentieller chCXCR4-Ligand verwendet. Dies erfolgte aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit und der oben nachgewiesenen Kreuzreaktivität mit chCXCR4, vor allem aber aufgrund der besseren Standardisierbarkeit der Versuche bei Verwendung gereinigter Proteine im Vergleich zur Verwendung unstandardisierter Zellkulturüberstände, die unter Standard-Lagerungsbedingungen nur kurzzeitig haltbares chCXCL12a enthielten.

5.2.1.2 Hemmung der CXCL12a/chCXCR4-Interaktion

Die Bindung verschiedener CXCL12-Proteine an DT40-Zellen führte zu einem messbaren Calciumflux. Dieser Calciumflux musste jedoch nicht unbedingt eine spezifische Folge der CXCL12/chCXCR4-Interaktion darstellen, er könnte auch eine unspezifische Folge der Interaktion zwischen CXCL12 und anderen Oberflächenmolekülen auf DT40-Zellen sein. Um die Spezifität der CXCL12-Interaktion mit chCXCR4 zu prüfen, wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen chCXCR4 durch spezifische CXCR4-Antagonisten gehemmt wurde.

Eine Blockierung der CXCR4-Funktion ist durch die Anwendung verschiedener spezifischer CXCR4-Antagonisten möglich. Beispiele hierfür sind diverse peptidartige Polyphemusin II-Derivate sowie einige Bicyclame. T140 ist ein Beispiel der CXCR4-antagonisierender Polyphemusine, während AMD3100 als Bicyclam bereits aufgrund seiner CXCR4-antagonistischer Wirkung im klinischen Einsatz ist. Um herauszufinden, ob AMD3100 auch die Wirkung von chCXCR4 blockieren könnte, wurde zu Fluo-4-beladenen DT40-Zellen AMD3100 gegeben und danach versucht durch huCXCL12a-Zugabe einen Calciumflux auszulösen. Als Vergleich wurde ein Calcium-Einstrom in die DT40-Zellen durch huCXCL12a ohne vorherige Zugabe anderer Stoffe gemessen.

Ebenso wurde untersucht, ob der anti-chCXCR4-Antikörper (9D9) einen agonistischen oder antagonistischen Effekt hat, nachdem er sich an chCXCR4 auf der Oberfläche von DT40-Zellen angelagert hat.

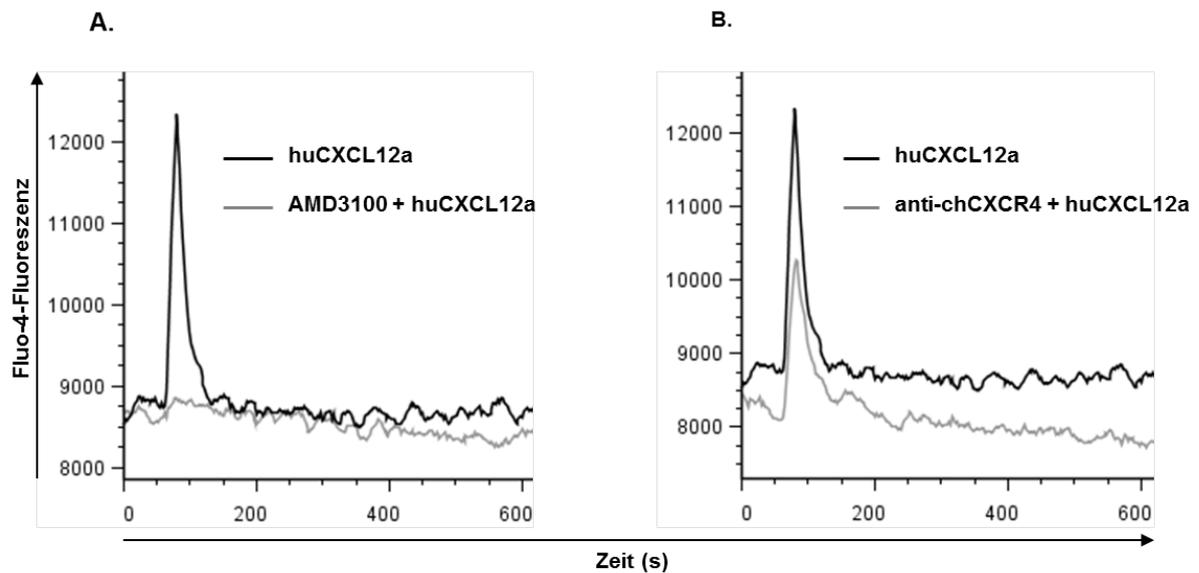


Abbildung 23: Calciumflux-Hemmung durch AMD3100 und anti-chCXCR4

DT40-Zellen wurden mit Fluo-4 beladen und die Reaktion der Zellen nach Zugabe von huCXCL12a beobachtet. Nach Bestimmung der Basalfluoreszenz der Zellen wurde zuerst AMD3100 (A) oder anti-chCXCR4 (9D9) (B) und nach einer weiteren 30-sekündigen Messung huCXCL12a zu den DT40-Zellen gegeben. Als Vergleich diente eine Probe, zu der nur huCXCL12a zugegeben wurde.

Abbildung 23A zeigt, dass die Zugabe von AMD3100 einen Calciumflux vollständig verhinderte und dadurch die huCXCL12a/chCXCR4-Interaktion inhibiert. Die nach 30-sekündiger Bestimmung der Basalfluoreszenz erfolgte Zugabe von AMD3100 führte nicht zu einem Calciumflux. Auch die nachfolgende Zugabe von huCXCL12a führte in dieser Probe nicht zu einem messbaren Calciumflux. AMD3100 wirkt also nicht agonistisch und hierdurch chCXCR4-desensitivierend, sondern blockiert die Aktivierbarkeit des Rezeptors vollständig durch die Anlagerung an chCXCR4. AMD3100 ist also ein effektiver, spezifischer Inhibitor der huCXCL12a/chCXCR4-Interaktion. Durch die spezifische Hemmbarkeit dieser Interaktion konnte nachgewiesen werden, dass huCXCL12a tatsächlich an chCXCR4 bindet und hierdurch ein Signal in der Zelle auslöst.

Die Zugabe des anti-chCXCR4-Antikörpers 30 Sekunden nach Beginn der Messung führte nicht zu einem Calciumflux (Abbildung 23B). Dieser Antikörper wirkt also nicht agonistisch. Allerdings war der Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe von huCXCL12a in der Antikörper-haltigen Probe deutlich geringer als in der Vergleichsprobe ohne Antikörper. Da die Bindung des Antikörpers den Calcium-Einstrom allerdings nicht völlig verhindern konnte, hat der anti-chCXCR4-Antikörper (9D9) bezüglich des Calciumfluxes eine partiell antagonistische Eigenschaft.

5.2.2 Effekt der CXCL12/chCXCR4-Interaktion auf die chCXCR4-Expression

In 5.2.1 wurde gezeigt, dass die Bindung von CXCL12a an chCXCR4 zu einem Signal in der Zelle führt. Der Effekt der Bindung von CXCL12a an chCXCR4 auf die Oberflächenexpression von chCXCR4 sollte im Folgenden untersucht werden.

5.2.2.1 huCXCL12a-Bindung führt zu einer Internalisierung von chCXCR4

DT40-Zellen und Bursazellen wurden für 90 Minuten bei 37°C und 5%CO₂ mit kommerziell erhältlichem huCXCL12a (100ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden parallel dazu Zellen in Medium ohne huCXCL12a inkubiert. Das Bindungsvermögen des anti-chCXCR4-Antikörpers an die jeweiligen Zellen wurde nach der Inkubation mit und ohne huCXCL12a durchflusszytometrisch bestimmt.

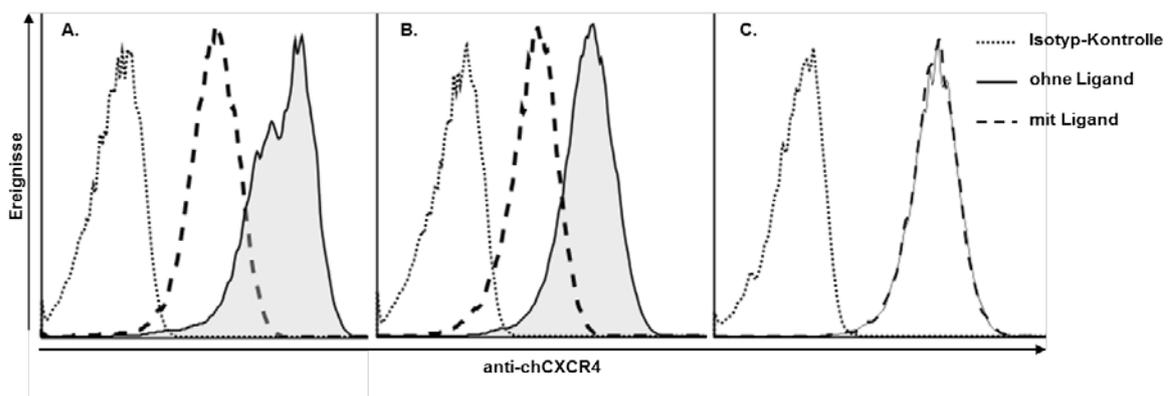


Abbildung 24: Bindungsvermögen eines anti-chCXCR4-Antikörpers nach Inkubation mit potentiellen chCXCR4-Liganden

Gezeigt ist die chCXCR4-Expression von: A. Bursazellen und B. DT40-Zellen nach 90-minütiger Inkubation in identischem Medium mit und ohne Zugabe von huCXCL12a (100ng/ml); C. Zellen der Linie DT40 nach Inkubation in identischem Medium mit und ohne Zugabe von AMD3100 (40µM)

Nach einer 90-minütigen Inkubation mit huCXCL12a war das Bindungsvermögen des anti-chCXCR4-Antikörpers sowohl auf Bursazellen (Abbildung 24A; $MFI^{ohne\ huCXCL12a}=17100$, $MFI^{mit\ huCXCL12a}=2119$) als auch auf Zellen der Linie DT40 (Abbildung 24B; $MFI^{ohne\ huCXCL12a}=7050$, $MFI^{mit\ huCXCL12a}=1316$) in signifikanter Weise herabgesetzt. Auf Zellen, welche unter gleichen Konditionen in identischem Medium ohne huCXCL12a inkubiert wurden, war die Bindungsfähigkeit des anti-chCXCR4-Antikörpers dagegen unverändert hoch (Bursazellen: $MFI^{vor\ Inkubation}=16900$; DT40-Zellen: $MFI^{vor\ Inkubation}=7150$).

Die Anlagerung von AMD3100 an chCXCR4 führt nicht zu einer herabgesetzten Bindungsfähigkeit des anti-chCXCR4-Antikörpers ($MFI^{ohne\ AMD3100}=7200$, $MFI^{mit\ AMD3100}=7300$). Es kommt also nicht zur Internalisierung von chCXCR4 nach Anlagerung von AMD3100 und auch nicht zu einer Konformationsänderung des Chemokinrezeptors, die die Bindungsfähigkeit des Antikörpers an ein bestimmtes Epitop herabsetzt (Abbildung 24C.).

5.2.3 Chemotaxis-Assays

Eine CXCL12a/chCXCR4-Interaktion auf DT40-Zellen führt wie oben beschrieben zur Auslösung einer Signalkaskade in der Zelle. Die Effekte dieser Signalkaskade können mannigfaltig sein. Diese können beispielsweise eine veränderte Viabilität der Zellen oder Proliferationsstimulation sein, aber auch das Migrationsverhalten der Zelle beeinflussen. Das Migrationsverhalten von Zellen als Antwort auf CXCL12a-Stimulation wurde mittels Transwell-Chemotaxis-Assays mit DT40-Zellen und mit primären Hühnerleukozyten untersucht.

5.2.3.1 Chemotaxis von DT40-Zellen mit huCXCL12a und chCXCL12a

Für die Chemotaxis-Assays mit DT40-Zellen wurde als Migrationsstimulus für diese chCXCR4-exprimierenden Zellen huCXCL12a sowie serumfrei exprimiertes chCXCL12a in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als Chemokinesiskontrolle zur Bestimmung der Basalmigration der Zellen wurden die unteren Kammern der jeweiligen Transwell-Platten mit purem Chemotaxis-Medium ohne Chemokinzusatz befüllt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurden die Zellen aus der unteren Kammer der Transwell-Platte entnommen und die Migrationsraten durchflusszytometrisch mittels *BD FACS-TruCount-Tubes* quantifiziert.

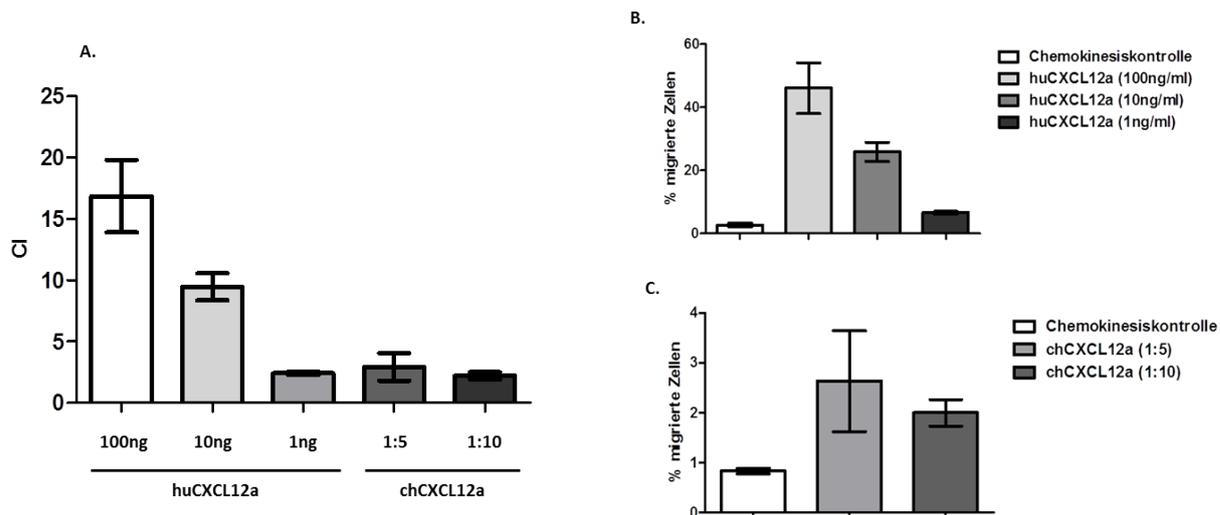


Abbildung 25: Chemotaxis von DT40-Zellen in Richtung verschiedener Konzentrationen von huCXCL12a und chCXCL12a

DT40-Zellen wurden in die obere Kammer einer Transwell-Platte gegeben. Die unteren Kammern dieser Platten wurden mit Chemokin-Lösungen in den genannten Konzentrationen befüllt. Die Platten wurden für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde in drei unabhängigen Versuchen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Chemokinesis-Index (A) (CI = Anzahl migrierter Zellen in der jeweiligen Probe geteilt durch die Anzahl migrierter Zellen in der Chemokinesis-Kontrolle ohne Chemokin) sowie die % migrierter Zellen im Falle von huCXCL12a (B) und chCXCL12a (C).

Die in Abbildung 25 gezeigten DT40-Zellen weisen eine nur geringe Grundmotilität auf. Dargestellt sind hier die Chemokinesis-Indizes, da ein Vergleich der Migrationsraten von DT40-Zellen nach Zugabe von huCXCL12a und chCXCL12a aufgrund verschiedenartiger Chemokinesiskontrollen erst durch die Errechnung dieses Wertes ermöglicht wird. In der Chemokinesiskontrolle ohne Chemokin migrierten im Falle von huCXCL12a innerhalb von 90 Minuten lediglich 2,7% der eingesetzten 5×10^5 Zellen. Die stärkste Migration von DT40-Zellen war mit 46% der eingesetzten Zellen bei huCXCL12a in einer Konzentration von 100ng/ml zu beobachten. Die Migrationsrate nahm mit fallender huCXCL12a-Konzentration ab. Bei einer Konzentration von 10ng/ml migrierten 26%, bei einer Konzentration von 1ng/ml immerhin noch 7% der eingesetzten Zellen in die untere Kammer der Transwell-Platten. Die Migration als Antwort auf huCXCL12a ist also eindeutig dosisabhängig.

Bei chCXCL12a war ebenfalls eine deutliche Migration der DT40-Zellen festzustellen. Diese war aber wesentlich schwächer ausgeprägt und lag mit einer Migrationsrate bei einer Verdünnung der Chemokin-haltigen Überstände von 1:5 von 3% und bei einem Einsatz von 1:10 von 2% sogar noch unter der Migrationsrate von huCXCL12a beim Einsatz in einer Konzentration von 1ng/ml. Bei der Chemokinesiskontrolle, die im Falle von

chCXCL12a ein Zellkulturüberstand aus HEK-293-T-Kontrolltransfektionen darstellte, migrierten lediglich 0,8% der eingesetzten DT40-Zellen.

Zur besseren Standardisierung der Versuche wurde für die weiteren Chemotaxis-Assays huCXCL12a in einer Konzentration von 100ng/ml eingesetzt.

5.2.3.2 Chemotaxis primärer Hühnerleukozyten

Für Chemotaxis-Assays mit primären Hühner-Leukozyten wurden Zellen aus Bursa, Milz und Blut eingesetzt. Die Leukozyten aus dem Blut wurden mittels Slow-Speed-Zentrifugation präpariert, während die Leukozyten aus Milz und Bursa durch Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen wurden. Als Migrationsanreiz wurden in die untere Kammer der Transwell-Platten 100ng/ml huCXCL12a gegeben. Der jeweilige Anteil der B- und T-Zellen an den migrierten Zellen wurde, wie auch der Anteil der B- bzw. T-Zellen aller eingesetzten Zellen in der 100%-Kontrolle, durchflusszytometrisch nach Färbung mittels anti-chB6-AlexaFluor647- und anti-CD3-FITC-Antikörper bestimmt.

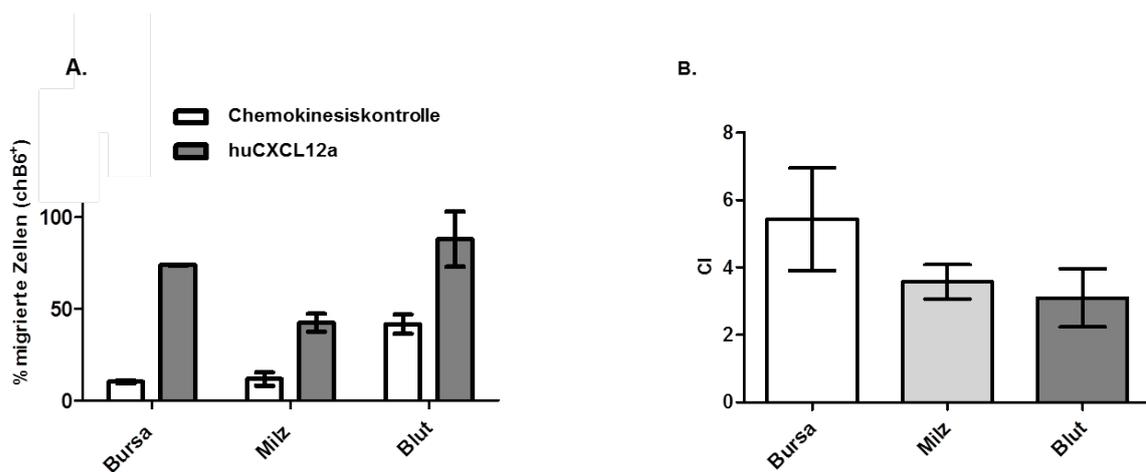


Abbildung 26: Chemotaxis-Verhalten primärer B-Zellen aus unterschiedlichen lymphatischen Organen

Leukozyten aus Blut, Milz und Bursa von drei Hühnern wurden in die obere Kammer einer Transwell-Platte gegeben, deren untere Kammer mit einer huCXCL12a-Lösung (100ng/ml) befüllt war. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Anzahl der migrierten B-Zellen durchflusszytometrisch nach Färbung der Zellen mittels anti-chB6-AlexaFluor647-Antikörper bestimmt. Diese Zahl wurde mit der Anzahl migrierter B-Zellen in der Chemokinesiskontrolle ohne Chemokinzusatz verglichen. A. zeigt den prozentualen Anteil der migrierten B-Zellen an den jeweils in den Ursprungsproben enthaltenen B-Zellen mit und ohne Zusatz von huCXCL12a; B. zeigt Mittelwert sowie Standardabweichungen der Chemokinesis-Indizes der B-Zellen aus den angegebenen Organen.

Abbildung 26A zeigt die Migrationsraten in Chemokinesiskontrollen und als Antwort auf huCXCL12a-Zugabe. Während die basale Migrationsrate ohne Chemokinstimulus bei B-Zellen aus Bursa (10,3%) und Milz (11,8%) recht niedrig war, zeigten die B-Zellen aus dem Blut mit 41,7% bereits in der Chemokinesiskontrolle eine hohe Grundmotilität. Die

Migrationsraten in den Chemokinesiskontrollen waren bei primären Zellen verglichen mit den Grundmigrationsraten von DT40-Zellen (2,7%) verhältnismäßig hoch, was für eine generell recht hohe Motilität primärer Zellen spricht. Die Migrationsraten als Antwort auf huCXCL12a-Stimulation waren bei den B-Zellen aus Bursa (74%) und Blut (88%) am höchsten, während sie bei B-Zellen aus der Milz mit durchschnittlich 43% stets niedriger waren. Die Streuung der Migrationsraten in verschiedenen Dellen war bei den bursalen Zellen in allen Fällen am niedrigsten, was für die hohe Homogenität bursaler B-Zellen spricht. Die B-Zellen aus dem Blut zeigten hingegen die insgesamt höchste Chemotaxis in Richtung huCXCL12a. Betrachtet man sich allerdings den Chemokinesis-Index der B-Zellen aller drei Hühner, so findet man den höchsten Chemokinesis-Index bei den bursalen B-Zellen, den zweithöchsten bei den B-Zellen aus der Milz und den niedrigsten Wert bei den B-Zellen aus dem Blut. Grund hierfür ist die sehr hohe ungerichtete Chemokinese-Aktivität dieser Blut-B-Zellen.

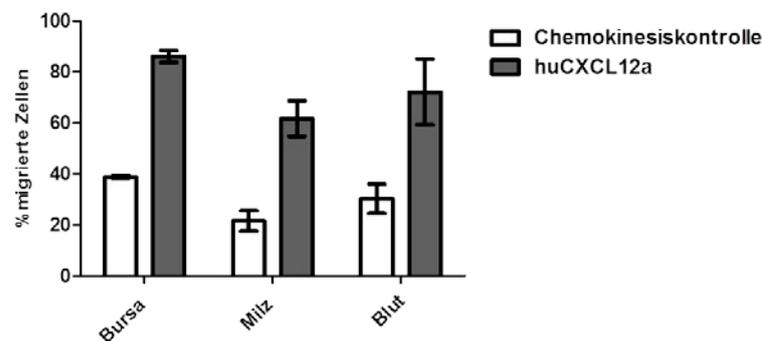


Abbildung 27: Chemotaxis von T-Zellen aus Bursa, Milz und Blut

Die T-Zellen der Proben aus Abbildung 26 wurden mittels anti-chCD3-FITC-Antikörper angefärbt und die Migrationsrate durchflusszytometrisch quantifiziert.

Auch T-Zellen in den oben gezeigten Proben primärer Hühnerleukozyten migrierten (Abbildung 27). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass lediglich etwa 0,5-2% der bursalen Zellen T-Zellen sind. Die spezifische Chemotaxis war bei T-Zellen aus der Milz (CI=2,9) höher als bei T-Zellen aus Bursa (CI=2,2) und Blut (CI=2,4). Dies ist das Resultat einer höheren unspezifischen Grundmigrationsrate von T-Zellen aus Bursa und Blut.

5.2.3.3 Inhibition der CXCL12-bedingten Migration

Im Folgenden wurde eine funktionelle Hemmung der chCXCR4-huCXCL12a-Interaktion auf DT40-Zellen durch AMD3100 und anti-chCXCR4-Antikörper untersucht. Hierzu

wurde zu den DT40-Zellen in die obere Kammer der Transwell-Platten eine 40µM AMD3100-Lösung beziehungsweise der anti-chCXCR4-Antikörper (9D9, 10µg/ml) gegeben, wodurch die Migration in Richtung huCXCL12a in der unteren Kammer blockiert werden sollte. Die Transwell-Platten wurden 90 Minuten lang inkubiert und die Anzahl migrierter Zellen danach durchflusszytometrisch bestimmt.

Abbildung 28 zeigt, dass AMD3100 die chCXCR4/huCXCL12a-Interaktion signifikant inhibiert. Während ohne Hemmstoff nach 90 Minuten etwa 23% der eingesetzten DT40-Zellen in der unteren Kammer angekommen waren, migrierten in Anwesenheit von AMD3100 nur etwa 5% der eingesetzten Zellen. Im Vergleich hierzu wanderten bei der Chemokinesis-Kontrolle ohne Chemokineinsatz knapp 2% der eingesetzten Zellen. Wurde der anti-chCXCR4-Antikörper in die obere Kammer zu den DT40-Zellen gegeben, so migrierten noch etwa 7% der eingesetzten Zellen in die untere, huCXCL12a-haltige Kammer. Die Migrationshemmung durch den anti-chCXCR4-Antikörper war also nahezu so stark ausgeprägt wie die Inhibition durch den spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD3100.

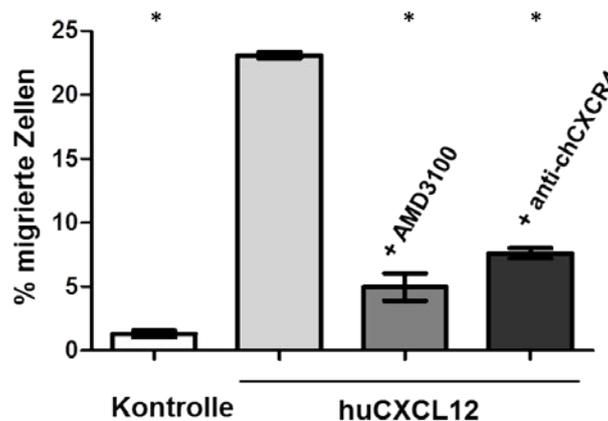


Abbildung 28: Hemmung der huCXCL12a-bedingten Migration von DT40-Zellen mittels AMD3100 und anti-chCXCR4-Antikörper

Die Migration von DT40-Zellen in Richtung huCXCL12a wurde mittels Chemotaxis-Assays untersucht. Die Chemokinesis-Kontrolle (weiß) zeigt die Migration von DT40-Zellen ohne Zugabe eines Chemokins. Dargestellt sind die Migration der Zellen in Richtung huCXCL12a ohne Hemmung durch andere Stoffe in der oberen Kammer (hellgrau), die Migration der Zellen in Anwesenheit von AMD3100 (mittelgrau) sowie die Anzahl migrierter Zellen nach Zugabe des anti-chCXCR4-Antikörpers zu (dunkelgrau). Gezeigt werden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen. (* = signifikanter Unterschied zu huCXCL12a ohne Hemmung, $p < 0,5$)

5.3 chCXCR5

5.3.1 Expression von chCXCR5 und der chCXCL13-Isoformen während der Ontogenese

CXCR5 und CXCL13 spielen bei der Besiedlung bestimmter Areale innerhalb lymphatischer Organe mit B-Zellen während der Ontogenese beim Säugetier eine essentielle Rolle. Auch im Genom von Vögeln wurde dieses Chemokin/Chemokinrezeptor-Paar nachgewiesen. Bekannt ist auch, dass die embryonale Milz bei Vögeln ein Ort der präbursalen B-Zellentwicklung ist. Diese präbursalen Zellen besiedeln die Bursa und werden zu bursalen B-Zellen. Um zu untersuchen, ob chCXCR5 und die drei bekannten chCXCL13-Isoformen während der Ontogenese in Bursa und Milz exprimiert werden, wurde die mRNA aus Milz und Bursa an ET14, ET18 und an Tag 2 nach dem Schlupf mittels qRT-PCR auf die Expression dieser Gene hin untersucht.

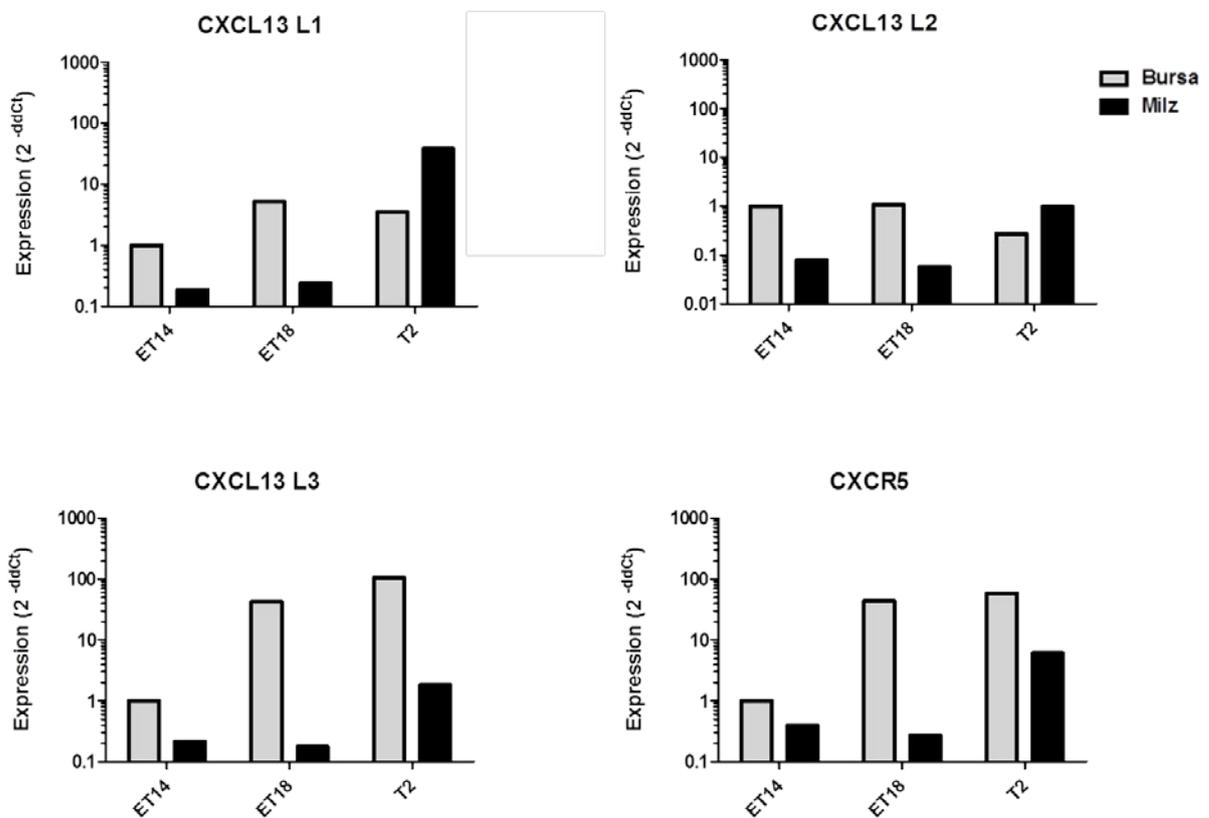
Dabei zeigten die verschiedenen chCXCL13-Isoformen (Abbildung 29) jeweils unterschiedliche Expressionsprofile. Der chCXCL13 L1-mRNA-Gehalt war an ET14 in der Bursa fünffach höher als in der Milz. In der Bursa kam es an ET18 zu einer fünffachen Zunahme der Expression, an Tag 2 nach dem Schlupf verglichen mit ET18 zu einer leichten Abnahme. In der Milz war die Expression an ET18 verglichen mit ET14 nur leicht höher. Allerdings stieg die Expression von chCXCL13 L1 an Tag 2 nach dem Schlupf auf das fast 200-fache des Ursprungswertes an, wodurch die Expression nach dem Schlupf in der Milz höher war als in der Bursa.

Die chCXCL13 L2-Expression in der Bursa blieb zwischen ET14 und ET18 nahezu unverändert, an Tag 2 nach dem Schlupf kam es zu einem 3,5-fachen Expressions-Abfall in der Bursa. In der Milz war die chCXCL13 L2-Expression an ET14 um das 13-Fache geringer als in der Bursa. An ET18 war ein leichter Abfall der Expression festzustellen, während sich die Expression von chCXCL13 L2 an Tag 2 nach dem Schlupf um das 15-Fache steigerte. Zu diesem Zeitpunkt war somit mehr chCXCL13 L2-mRNA in der Milz vorhanden als in der Bursa.

Bei chCXCL13 L3 dominierte zu allen Zeitpunkten die Expression in der Bursa. Hier war ein massiver Expressions-Anstieg zwischen ET14 und 18 (43-fach) und nochmals zu T2 (105-fach verglichen mit Bursa an ET14) zu verzeichnen. In der Milz hingegen war die Expression an ET14 um das 4,5-Fache geringer als in der Bursa. An ET18 kam es zu einer leichten Abnahme der Expression. Erst an Tag 2 nach dem Schlupf fand ein Expressions-Anstieg auf das Achtfache des Ausgangswertes statt.

In Abbildung 29B ist die Höhe der Expression der verschiedenen chCXCL13 L3-Isoformen als 40-dCT-Wert in der Bursa an ET14 dargestellt. Anhand dieser Ausgangswerte ist zu erkennen, dass chCXCL13 L2 zu diesem Zeitpunkt die höchste Expression aufwies, während die Isoformen chCXCL13 L1 nur etwa ein Viertel und chCXCL13 L3 nur ein Zehntel dieser Expression zeigten. Der nachfolgende Anstieg der chCXCL13 L2-Expression fiel allerdings sehr viel geringer aus als bei chCXCL13 L1 und chCXCL13 L3.

A.



B.

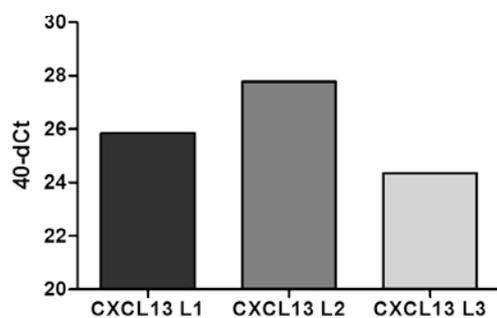


Abbildung 29: Expression von chCXCR5, chCXCL13 L1, chCXCL13 L2 und chCXCL13 L3 während der Ontogenese

Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus Milz und Bursa mittels qRT-PCR hinsichtlich der Expression von chCXCR5 und der chCXCL13-Isoformen untersucht. Dargestellt ist in A. die Expression (2^{-ddCt}) bezogen auf den Wert der Bursa an ET14, in B. der 40-dCt-Wert der chCXCL13-Isoformen in der Bursa an ET14. Zur mRNA-Isolation wurde an ET14 ein Pool aus jeweils drei Organen, an ET18 und T2 jeweils ein Organ eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der erhobenen Daten sagen, dass alle drei chCXCL13-Isoformen in der Milz an ET14 und ET18 nahezu konstant exprimiert wurden. Hier fand an Tag 2 nach dem Schlupf ein deutlicher Anstieg der Expression aller chCXCL3-Isoformen statt. In der Bursa ist der Verlauf der Expression der drei Isoformen hingegen jeweils unterschiedlich: Für chCXCL13 L1 findet man allgemein einen leichten Expressionsanstieg zwischen ET14 und Tag 2 nach dem Schlupf, für chCXCL13 L3 einen leichten Abfall der Expression und im Falle von chCXCL13 L3 einen starken Anstieg der Expression.

Die Expression von chCXCR5 war in der Bursa zu allen Zeitpunkten höher als in der Milz. An ET18 war in der Bursa verglichen mit ET14 in diesem Organ parallel zur Zunahme der B-Zell-Zahlen im Gewebe ein Expressionsanstieg um das 44-Fache, an Tag 2 nach dem Schlupf um das 59-fache zu beobachten. Die Expression in der Milz war an ET14 um das 2,5-fache niedriger als in der Bursa und fiel an ET18 sogar leicht ab. An Tag 2 nach dem Schlupf war ein Anstieg der chCXCR5-Expression um etwa das 15-Fache zu sehen.

5.3.2 Erstellung einer stabil chCXCR5-exprimierenden Zelllinie

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die zellspezifische Expression von CXCR5 auf Proteinebene zu untersuchen. Hierfür wurde zur Generierung eines monoklonalen anti-chCXCR5-Antikörpers eine stabile chCXCR5-HEK-293-Linie erstellt, bei der das chCXCR5-Protein am N-terminalen Ende durch ein FLAG-Tag markiert ist. Mithilfe dieses FLAG-Tags konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass annähernd alle transfizierte HEK-293-Zellen ein membrangebundenes chCXCR5 exprimierten (Abbildung 30).

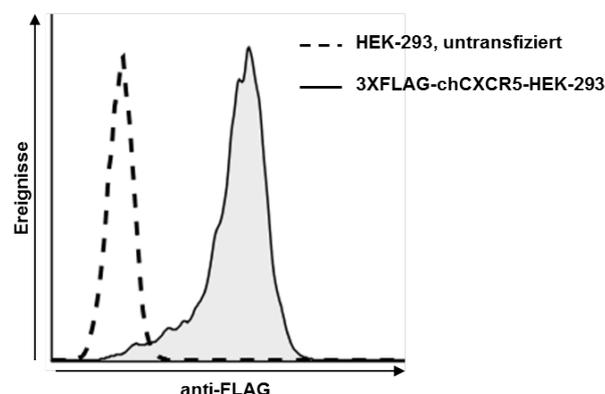


Abbildung 30: Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen mit 3XFLAG-chCXCR5

3XFLAG-chCXCR5-transfizierte HEK-293-Zellen wurden mittels anti-FLAG M2-Antikörper und anti-muIgG1-FITC-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen parallel dazu gleichzeitig behandelt.

5.3.3 Zellfusion und Test der Hybridomüberstände

Die in 5.3.2 beschriebene 3XFLAG-chCXCR5-exprimierende Zelllinie wurde verwendet, um eine Balb/c-Maus dreimalig im Abstand von vier Wochen zu immunisieren. Die Milzzellen dieser Balb/c-Maus wurden drei Tage nach der letzten Immunisierung mit SP2/0-Zellen fusioniert. Die Überstände der entstandenen Hybridome wurden durchflusszytometrisch mittels Färbung von primären Hühner-Milzzellen untersucht (Abbildung 31A). Die positiven Überstände wurden weiter charakterisiert, indem chCXCR5-transfizierte und untransfizierte HEK-293-T-Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung angefärbt wurden (Abbildung 31B). Überstände des Klons 6A9 erkannten nur ein Antigen auf chCXCR5-transfizierten Zellen, während untransfizierte Zellen nicht gebunden wurden. Somit erkennt der Antikörper spezifisch chCXCR5. Um eine definitive Monoklonalität dieses Hybridoms zu gewährleisten, wurde eine Subklonierung durchgeführt. Eine Isotyp-Bestimmung ergab, dass der Klon 6A9 einen Antikörper vom IgG1-Isotyp produziert. Alle weiteren Untersuchungen bezüglich der chCXCR5-Expression wurden mittels dieses monoklonalen Antikörpers des Klons 6A9 durchgeführt.

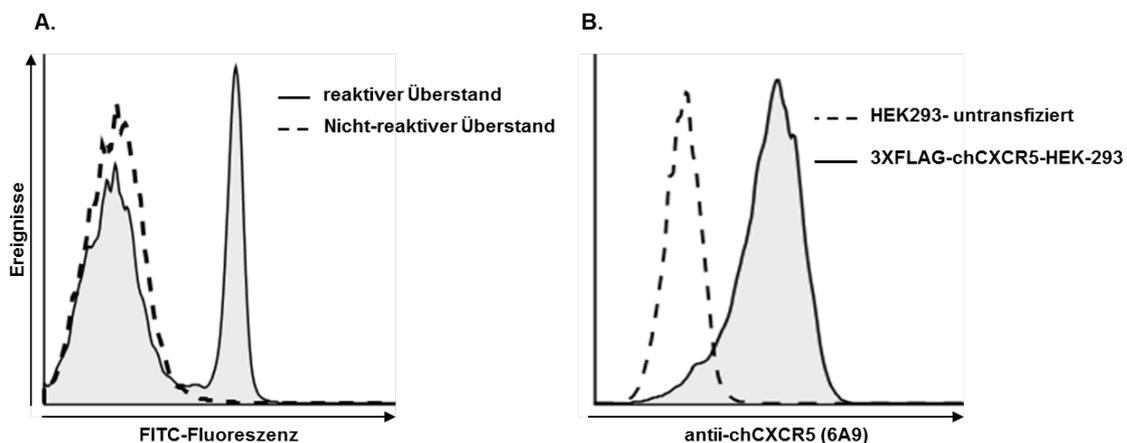


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Untersuchung der Hybridom-Überstände aus der chCXCR5-Fusion

A. Milzzellen wurden mittels purer Hybridom-Überstände als Primäntikörper und eines anti-muIgG-FITC-Antikörpers als Sekundäntikörper gefärbt. Dargestellt ist die Färbung von Milzzellen mit einem Überstand, dessen Antikörper einen Teil der Milzzellen erkannten (reaktiver Überstand) und die Färbung eines Überstandes, der keine Milzzellen-erkennende Antikörper enthielt (nicht reaktiver Überstand).

B. HEK-293-Zellen und 3XFLAG-chCXCR5-HEK-293-Zellen wurden mit dem reinen Überstand des Klons 6A9 gefärbt. Als Sekundäntikörper diente ein anti-muIgG-FITC-Antikörper.

5.3.4 chCXCR5-Expression auf B-Zellen in Milz und Bursa während der Ontogenese

Wie in 5.3.1 beschrieben wurde, werden chCXCR5 und seine drei bekannten potentiellen Liganden auf mRNA-Ebene schon früh während der Individualentwicklung in Milz und Bursa exprimiert. Zum Test der Expression auf Proteinebene wurden Leukozyten aus Milz und Bursa von Embryonen an ET14 und ET18 sowie eines zehn Wochen alten Huhnes nach Mehrfachfärbung mittels anti-chB6-AlexaFluo647-Antikörper und anti-chCXCR5-Antikörper durchflusszytometrisch untersucht.

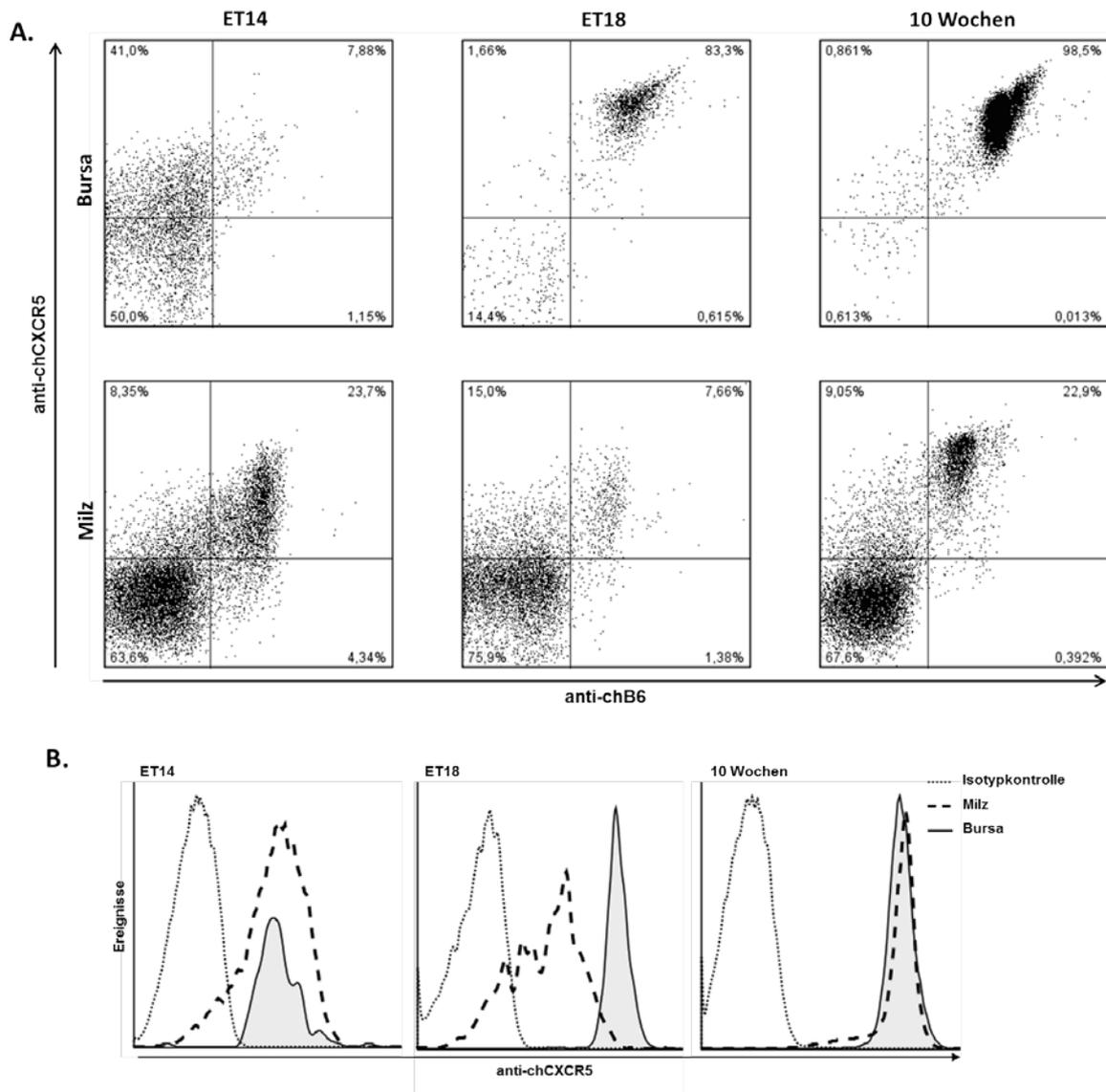


Abbildung 32: Untersuchung der chCXCR5-Expression auf B-Zellen während der Ontogenese

Milzzellen und Bursazellen von 14- und 18-Tage alten Embryonen sowie eines zehnwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbung mittels anti-chB6-AlexaFluo647-Antikörper und anti-chCXCR5-Antikörper durchflusszytometrisch untersucht. Als Sekundärantikörper für chCXCR5 wurde ein anti-muIgG1-FITC-Antikörper verwendet.

A: Dot blots von Bursa (oben) und Milz (unten) zu den angegebenen Zeitpunkten

B: Overlay-Histogramme zum direkten Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten in Milz und Bursa zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die chCXCR5-Expression der chB6-positiven Zellen.

An ET14 zeigten die B-Zellen in Milz und Bursa in Abbildung 32 ein verhältnismäßig niedriges chCXCR5-Expressionsniveau. An ET18 war ein deutlicher Anstieg der chCXCR5-Expression auf den chB6-positiven Zellen der Bursa festzustellen. Die Expression auf den B-Zellen der Milz blieb verhältnismäßig niedrig. Allerdings wurde die Expression in der Milz zu diesem Zeitpunkt recht uneinheitlich. In den ausgereiften Organen zeigte sich nach dem Schlupf eine mehrheitlich hohe Expression auf den B-Zellen in Milz und Bursa. In der Milz und in anderen lymphatischen Organen waren nach dem Schlupf allerdings auch B-Zellen niedrigerer chCXCR5-Expression zu finden (Kapitel 5.3.5 und Tabelle 11, Seite 106).

Festzuhalten ist, dass präbursale B-Zellen in der Milz und frühe bursale B-Zellstadien eine noch niedrige chCXCR5-Expression zeigten, während die Expression auf reiferen Stadien bursaler und postbursaler B-Zellen deutlich zunahm. Es findet also eine Hochregulation von chCXCR5 auf B-Zellen während des Reifungsprozesses in der Bursa statt.

5.3.5 chCXCR5-Expression auf B-Zellen im Gewebe adulter Hühner

Zur Untersuchung der chCXCR5-Expression von B-Zellen aus unterschiedlichen lymphatischen Geweben wurden Leukozyten aus Blut, Bursa, Milz, Caecaltonsillen, Knochenmark und Thymus dreier zehnwöchiger Tiere entnommen und mithilfe verschiedener Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht.

Abbildung 33 zeigt, dass auf nahezu allen B-Zellen der zehnwöchigen Hühner eine hohe chCXCR5-Expression zu finden war. Die Expression auf bursalen B-Zellen und den B-Zellen in Knochenmark und Thymus war weitgehend uniform. In der Milz, der Caecaltonsille und im Blut hingegen waren jeweils verschiedene B-Zell-Populationen zu differenzieren, welche nachfolgend charakterisiert wurden. Eine Zusammenfassung der Eigenschaften sowie der prozentuale Anteil der jeweiligen Population an den vorhandenen B-Zellen sind in Tabelle 11 (Seite 106) aufgeführt.

Abbildung 33B, D, E und F verdeutlichen, dass auch Leukozyten, die chB6-negativ sind chCXCR5 exprimieren. Welche Zelltypen hierunter zu finden sind wird in 5.3.6 gezeigt.

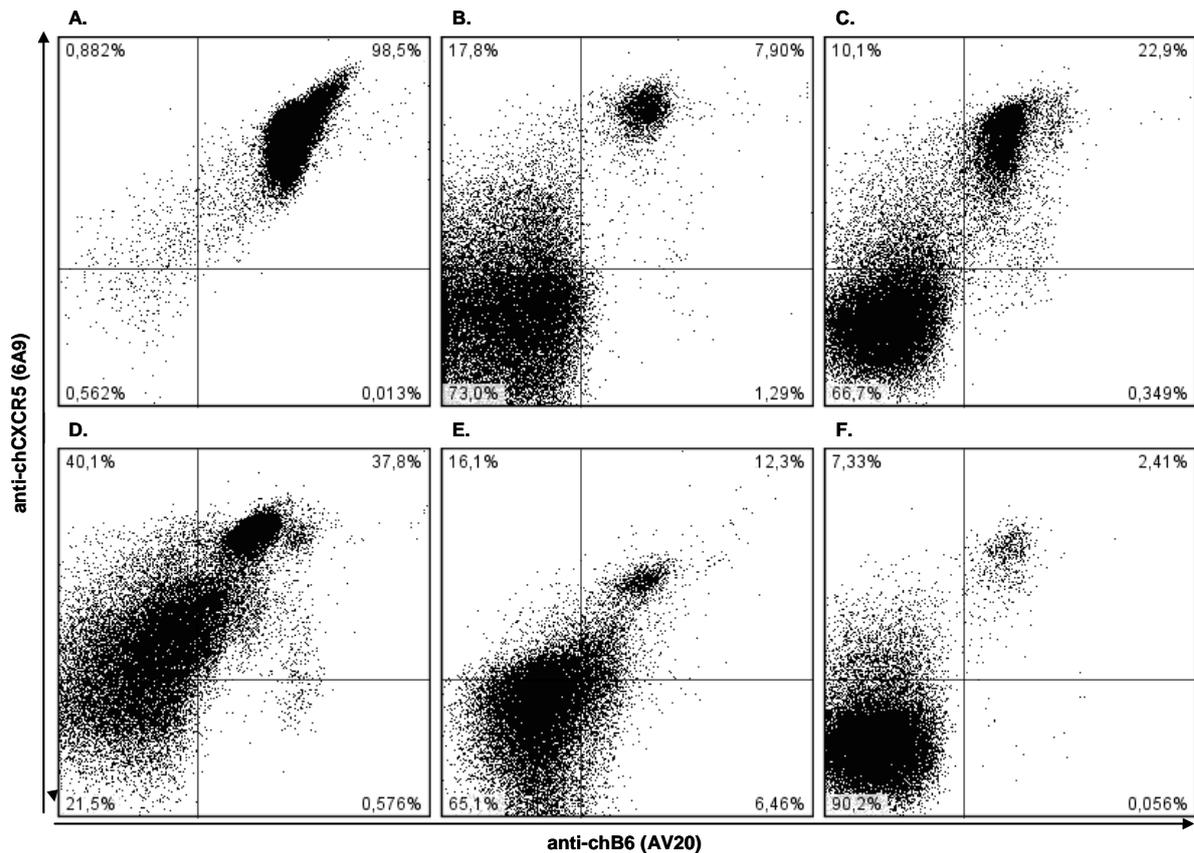


Abbildung 33: chCXCR5-Expression auf B-Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe

Leukozyten verschiedener Organe wurden durchflusszytometrisch untersucht. Als Antikörper wurden verwendet: anti-chCXCR5/ anti-muIgG1-PerCP und anti-chB6-AlexaFluor647; im Falle des Knochenmarks wurde der anti-chB6-AlexaFluor647-Antikörper durch einen anti-chB6-PerCP-Antikörper ersetzt und zusätzlich ein anti-chCD45-FITC-Antikörper verwendet. Dargestellt sind Zellen der folgenden Organe: A. Bursa; B. Blut; C. Milz; D. Caecaltonsillen; E. Knochenmark (hier ausschließlich chCD45-positive Zellen gezeigt); F. Thymus. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

5.3.5.1 Bursa

In der Bursa konnten zwei verschiedene B-Zell-Populationen voneinander unterschieden werden: eine chB6^{high} chCXCR5^{high} sowie eine chB6^{very high} chCXCR5^{very high} Population. Diese wurden bezüglich ihrer Expression der in Abbildung 34 gezeigten Oberflächen-Proteine untersucht.

Die beiden B-Zell-Populationen in der Bursa unterschieden sich sowohl in ihrer Größe als auch in der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle. So waren die Zellen der chB6^{very high} chCXCR5^{very high} Population wesentlich größer als die Zellen der chB6^{high} chCXCR5^{high} Population. Ebenso wiesen diese größeren Zellen eine erhöhte Expression von Oberflächen-Immunglobulin, BAFF-R, MHCII und chCXCR4 auf.

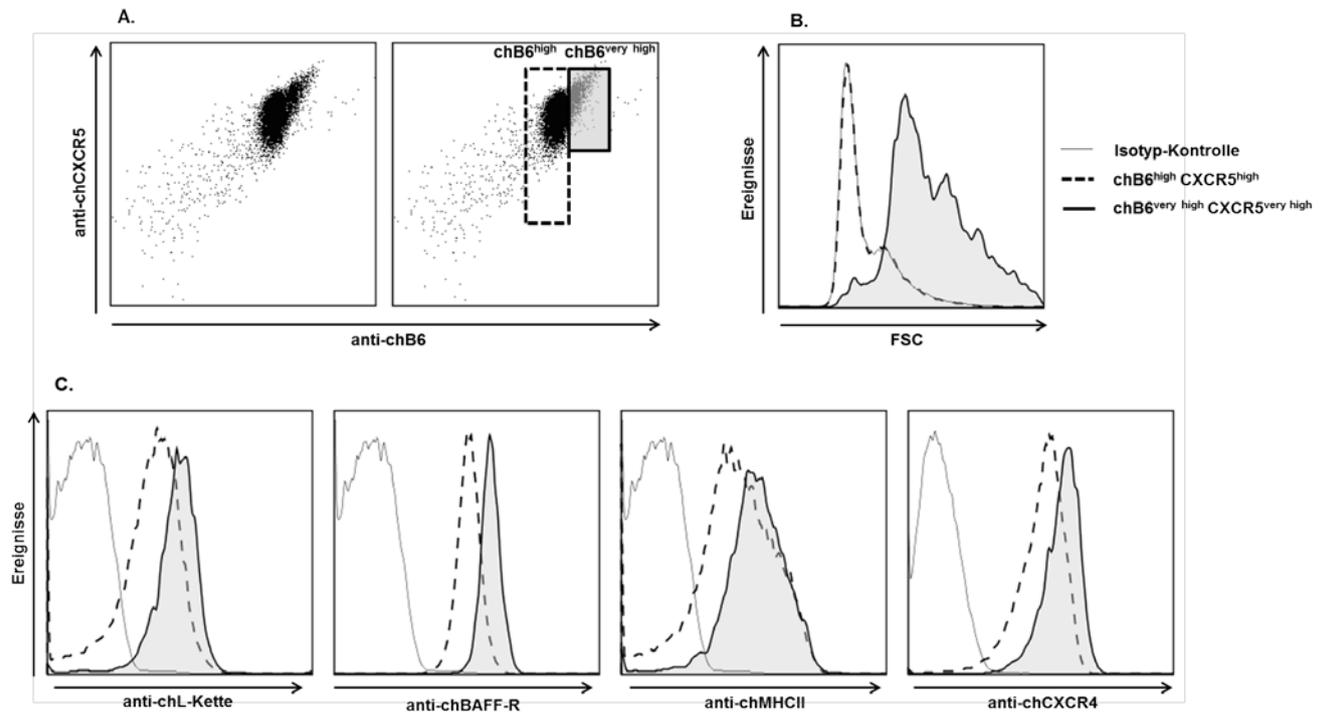


Abbildung 34: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in der Bursa

Die Leukozyten aus der Bursa eines zehnwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Färbung chB6 gegen chCXCR5 (A, links ohne, rechts mit Messfenster). Die Histogramme zeigen jeweils die Größe (B) und die Expressionen verschiedener Oberflächenmarker (C) der $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ B-Zellen sowie der $\text{chB6}^{\text{very high}} \text{chCXCR5}^{\text{very high}}$ B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

5.3.5.2 Blut

Auch im Blut konnten regelmäßig zwei verschiedene B-Zell-Populationen differenziert werden. So war eindeutig eine große $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Hauptpopulation von einer zahlenmäßig sehr kleinen $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Population zu unterscheiden, welche stets weniger als 2% aller B-Zellen ausmachte. Die Untersuchung dieser verschiedenen B-Zell-Populationen hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächen-Immunglobulin (L-Kette), chBAFF-R, chMHCII und chCXCR4 ergab, dass die chB6^{med} B-Zellen im Blut etwas kleiner waren als die $\text{chB6}^{\text{high}}$ Zellen (Abbildung 35). Zudem trugen die $\text{chB6}^{\text{high}}$ B-Zellen mehr Immunglobulin (L-Kette-Färbung), aber weniger chBAFF-R sowie auch weniger chCXCR4 auf ihrer Oberfläche als die chB6^{med} B-Zellen. Hingegen zeigte sich die chMHCII-Expression der $\text{chB6}^{\text{high}}$ Zellen verglichen mit der chB6^{med} -Population nur leicht herabgesetzt.

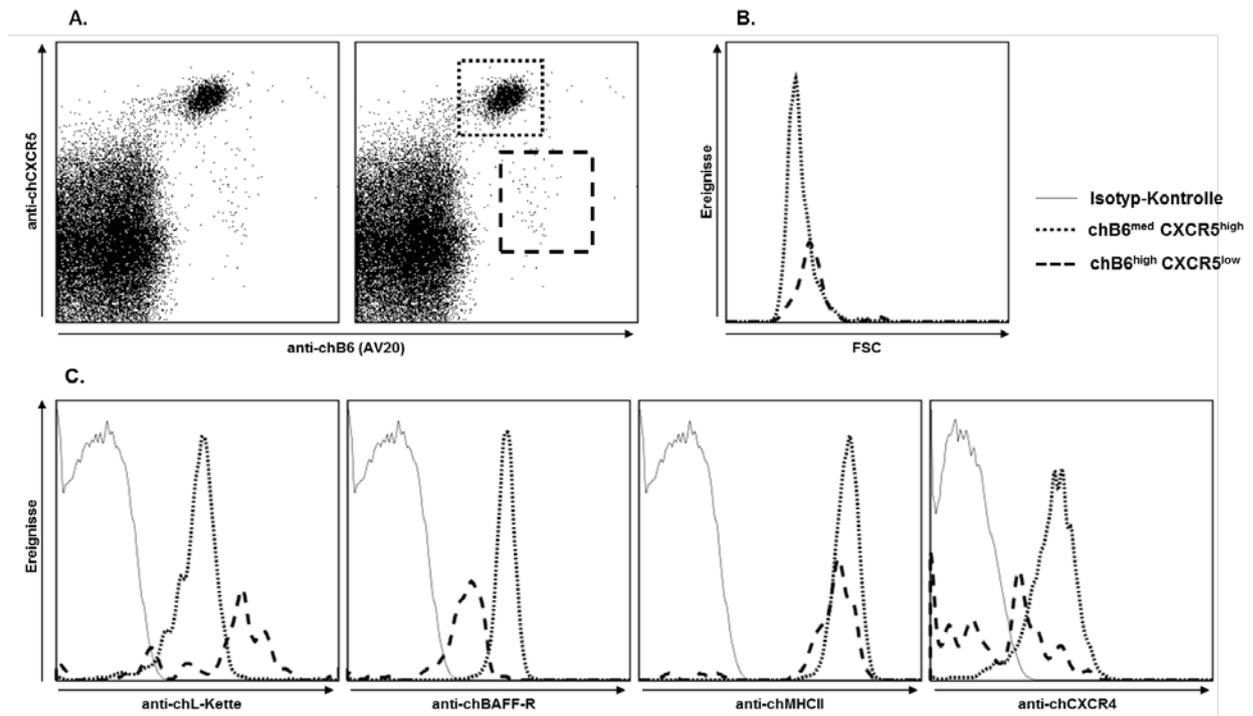


Abbildung 35: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen im Blut

Die Leukozyten aus dem Blut eines zehnwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Färbung chB6 gegen chCXCR5 (A, links ohne, rechts mit Messfenster). Die Histogramme zeigen jeweils die Größe (B) und die Expressionen verschiedener Oberflächenmarker (C) der $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ B-Zellen sowie der $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

5.3.5.3 Milz

Auch in der Milz konnten in Färbungen gegen chB6 und chCXCR5 verschiedene B-Zell-Populationen identifiziert werden. Neben einer $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Population war eine $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Population von einer $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Population zu unterscheiden. Auch diese B-Zell-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Expression der in 5.3.5.1 genannten Oberflächenmoleküle untersucht.

Die $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Zellen aus der Milz zeigten einen recht homogenen Phänotyp. Diese Population bestand aus kleinen Zellen, auf deren Oberflächen Immunglobulin, chBAFF-R, chMHCII und chCXCR4 in einheitlichem Maße zu finden waren. Die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Zellen der Milz waren verglichen mit den $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Zellen größer, trugen mehr Immunglobulin und mehr chBAFF-R auf ihrer Oberfläche. Die chCXCR4-Expression war verglichen mit der Expression auf chB6^{med} Zellen geringfügig herabgesetzt. Die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Zellen waren noch größer als die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{CXCR5}^{\text{high}}$ Zellen. Diese zeigten allerdings eine wesentlich geringere Oberflächen-

Immunglobulin-Expression sowie auch eine verringerte chMHCII-Expression. Interessanterweise konnte bei dieser Population eine Aufspaltung in Zellen höherer und Zellen niedrigerer chBAFF-R-Expression festgestellt werden. Die chCXCR4-Expression erschien im Vergleich zur chB6^{med} Population unverändert. Beim Vergleich der drei in der Milz vorkommenden B-Zell-Populationen mit den beiden im Blut konnte man erkennen, dass sich die chB6^{med} chCXCR5^{high} Populationen in Milz und Blut kaum voneinander unterschieden. Anders verhielt es sich mit den chB6^{high} chCXCR5^{low} Population aus Blut und Milz: Im Blut trugen diese Zellen viel Immunglobulin und recht viel chMHCII auf der Zelloberfläche, während diese Moleküle auf chB6^{high} chCXCR5^{low} Zellen aus der Milz vermindert exprimiert wurden. Eine chB6^{high} chCXCR5^{high}-Population war im Blut nie zu finden.

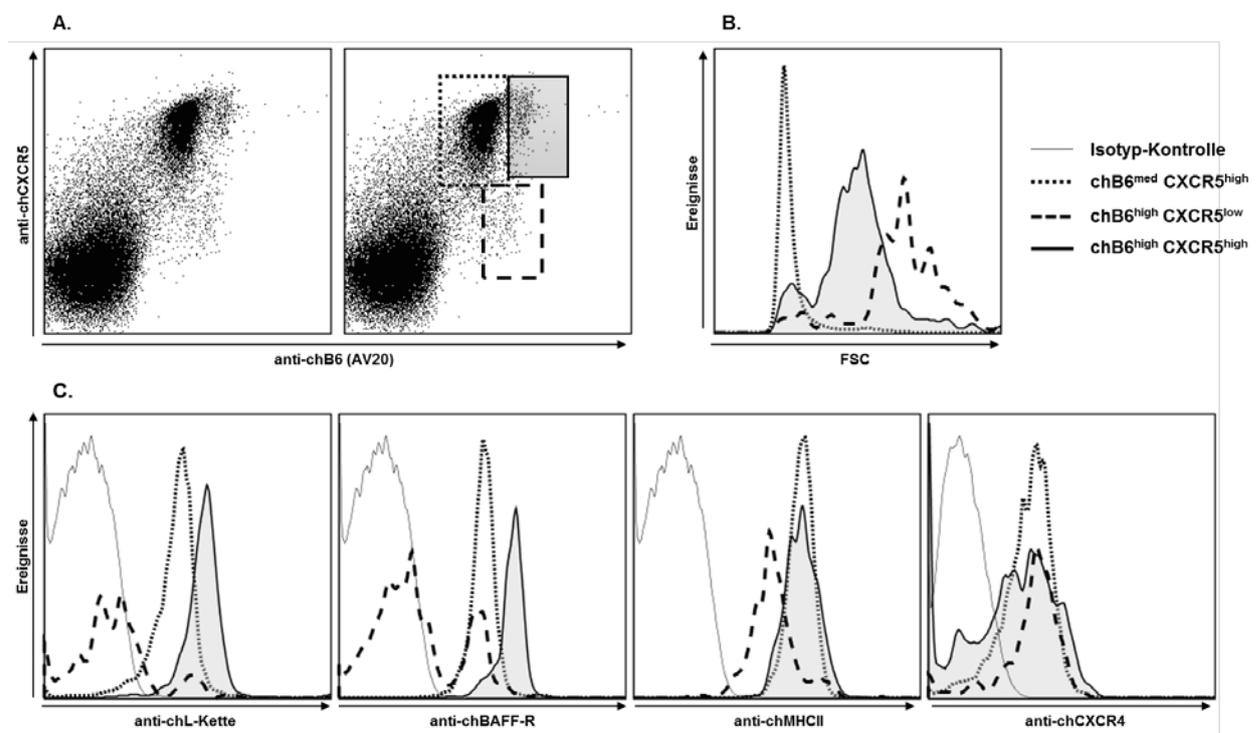


Abbildung 36: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in der Milz

Die Leukozyten aus der Milz eines zehnwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Färbung chB6 gegen chCXCR5 (A, links ohne, rechts mit Messfenster). Die Histogramme zeigen jeweils die Größe (B) und die Expressionen verschiedener Oberflächenmarker (C) der AV20^{med} chCXCR5^{high} B-Zellen, der AV20^{high} chCXCR5^{high} B-Zellen sowie der AV20^{high} chCXCR5^{low} B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

5.3.5.4 chCXCR5-Expression auf B-Zellen der Caecaltonsillen

In den Caecaltonsillen konnten wie schon in der Milz drei verschiedene B-Zell-Populationen identifiziert werden: chB6^{med} chCXCR5^{high}, chB6^{high} chCXCR5^{high} und

chB6^{high}chCXCR5^{low}. Auch diese wurden bezüglich ihrer Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht.

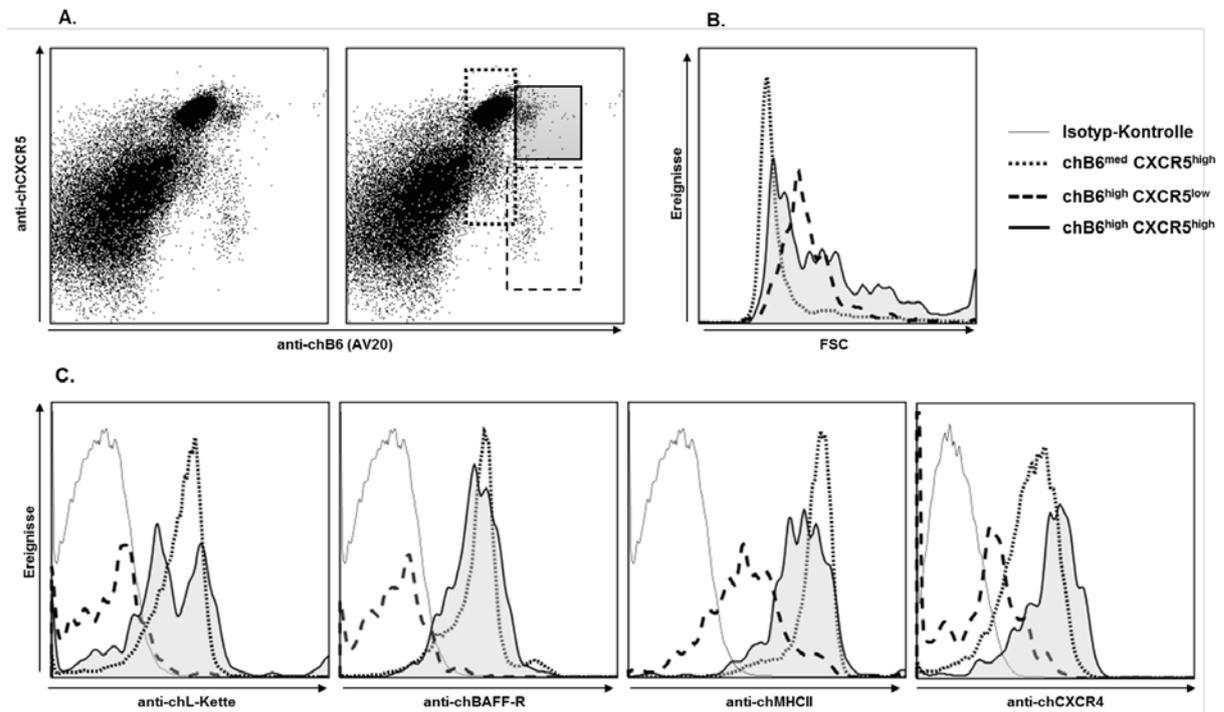


Abbildung 37: Charakterisierung der verschiedenen B-Zell-Populationen in den Caecaltonsillen

Die Leukozyten aus den Caecaltonsillen eines zehnwöchigen Huhnes wurden nach Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Färbung chB6 gegen chCXCR5 (A, links ohne, rechts mit Messfenster). Die Histogramme zeigen jeweils die Größe (B) und die Expressionen verschiedener Oberflächenmarker (C) der chB6^{med} chCXCR5^{high} B-Zellen, der chB6^{high} chCXCR5^{high} B-Zellen sowie der chB6^{high} chCXCR5^{low} B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Die chB6^{med} chCXCR5^{high} B-Zellen in der Caecaltonsille hatten einen recht einheitlichen Phänotyp (Abbildung 37). Diese Zellen waren klein, sie trugen Immunglobulin, chBAFF-R, chMHCII und chCXCR4 auf ihrer Oberfläche. Die chB6^{high} B-Zellen der Caecaltonsillen zeigten ein heterogenes Bild. Diese Population spaltete sich, wie schon in der Milz beschrieben, in eine Subpopulation mit hoher chCXCR5-Expression und eine weitere mit deutlich niedrigerer chCXCR5-Expression auf. Die chB6^{high} chCXCR5^{high} Zellen waren wie schon die in Blut und Milz etwas größer als die chB6^{med} Zellen. Außerdem zeigten sie verglichen mit der chB6^{med} chCXCR5^{high} Population eine uneinheitlichere Immunglobulin-Expression, eine leicht geringere chMHCII-Expression und eine höhere chCXCR4-Expression. Die kleine Population der chB6^{high} chCXCR5^{low} Zellen beinhaltete größere Zellen als die chB6^{med} chCXCR5^{high} Population. Diese Zellen trugen allerdings bedeutend weniger Immunglobulin, weniger BAFF-R, wesentlich

weniger chMHCII und ebenfalls weniger chCXCR4 auf ihrer Oberfläche als die vorgenannten B-Zell-Populationen in der Caecaltonsille.

Tabelle 11: Übersicht über Phänotypen der B-Zellen verschiedener lymphatischer Organe

	Bursa	Blut	Milz	Caecaltonsillen
chB6^{med} CXCR5^{high}				
% der B-Zellen	/	98-100	88-91	90-94
Zellgröße	/	klein	klein	klein
L-Kette	/	++	++	++
MHCII	/	+++	+++	++
BAFF-R	/	++	++	++
chCXCR4	/	++	++	++
chB6^{high} CXCR5^{high}				
% der B-Zellen	85-90	/	8-10	4-6
Zellgröße	klein und groß	/	groß	groß
L-Kette	uneinheitlich	/	+++	uneinheitlich
MHCII	++	/	+++	++
BAFF-R	+++	/	+++	+++
chCXCR4	+++	/	+/-	+++
chB6^{high} CXCR5^{low}				
% der B-Zellen	/	0-2	1-2	2-4
Zellgröße	/	groß	sehr groß	groß
L-Kette	/	+++	+	+
MHCII	/	++	++	++
BAFF-R	/	+	uneinheitlich	+
chCXCR4	/	+	+	++
chB6^{very high} CXCR5^{very high}				
% der B-Zellen	10-15	/	/	/
Zellgröße	sehr groß	/	/	/
L-Kette	+++	/	/	/
MHCII	+++	/	/	/
BAFF-R	+++	/	/	/
chCXCR4	++++	/	/	/

Eine Übersicht aller in Bursa, Blut, Milz und Caecaltonsillen gefundenen B-Zell-Typen ist in Tabelle 11 zu finden. Hier wird deutlich, dass die chB6^{med} chCXCR5^{high} B-Zellen in Blut, Milz und Caecaltonsillen eine einheitliche, kaum voneinander zu unterscheidende Populationen darstellen. Während die im Blut nicht zu findenden chB6^{high} chCXCR5^{high} B-

Zellen in Milz und Caecaltonsille sich ebenfalls durch eine unterschiedliche chCXCR4- und Oberflächen-Immunglobulin-Expression nur leicht voneinander unterschieden, zeigten die $chB6^{high} chCXCR5^{low}$ B Zellen einen jeweils organspezifischen Phänotyp. Die $chB6^{very high} CXCR5^{very high}$ Population trat dagegen ausschließlich in der Bursa auf.

5.3.6 chCXCR5-Expression auf anderen Zellen des Immunsystems des Huhnes

Da die ersten Färbungen gezeigt hatten, dass chCXCR5 ähnlich wie auch chCXCR4 nicht ausschließlich auf B-Zellen vorkommt, wurde die Expression von chCXCR5 auch auf anderen immunologisch relevanten Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe untersucht.

5.3.6.1 Expression von chCXCR5 auf $chCD4^{+}$ und $chCD8^{+}$ Zellen

Zur Bestimmung der chCXCR5-Expression auf $chCD4^{+}$, $chCD8^{+}$ sowie $Kul01^{+}$ Zellen wurden diese Zellen nach Mehrfachfärbungen durchflusszytometrisch untersucht.

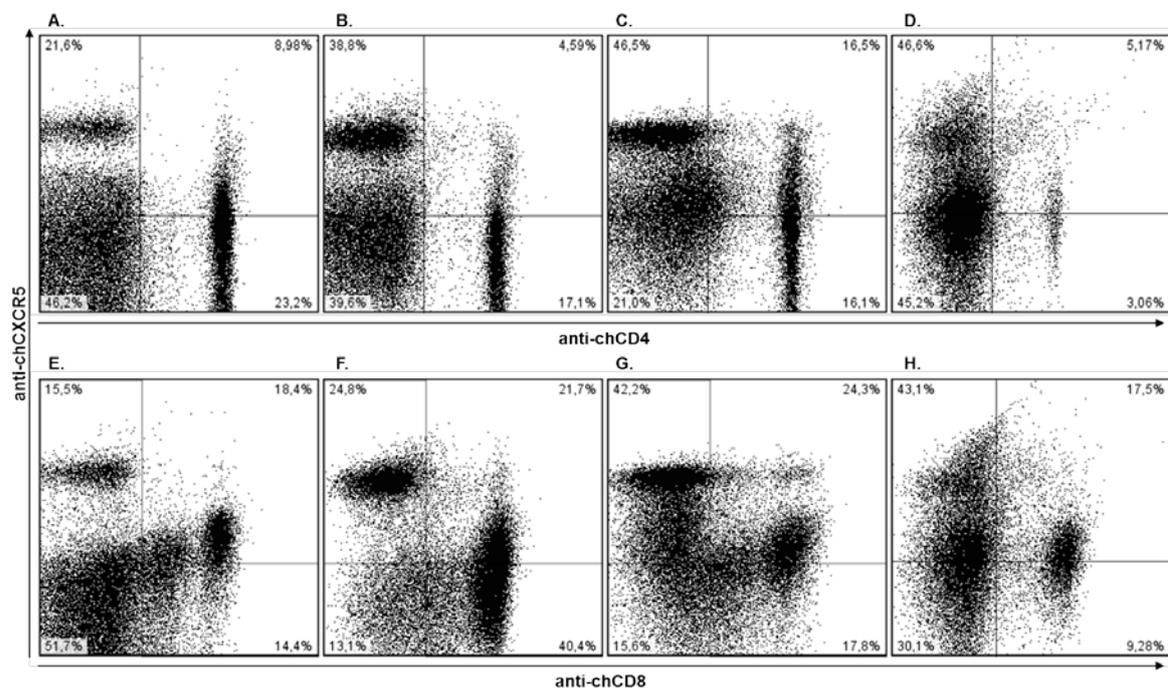


Abbildung 38: chCXCR5-Expression auf $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ Zellen.

Dargestellt sind in A.-D. die Färbungen chCXCR5 gegen chCD4, in E.-F. die Färbungen chCXCR5 gegen chCD8. Gezeigt werden Leukozyten aus dem Blut (A, E), der Milz (B, F), den Caecaltonsillen (C, G) und dem Knochenmark (D, H). Bei den Darstellungen der Knochenmarksleukozyten sind ausschließlich chCD45-positive Zellen zu sehen. Gezeigt ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 38 zeigt, dass die Expression von chCXCR5 auf dem Großteil der $CD4^{+}$ Zellen im Blut höher war als auf denen der Milz, wo es allerdings auch eine undeutlich

abgrenzbare Population von CD4⁺ Zellen mit deutlich höherer chCXCR5-Expression gab. In den Caecaltonsillen sowie auch im Knochenmark schien die chCXCR5-Expression auf CD4⁺ Zellen höher zu sein als in der Milz. Vor allem in den Caecaltonsillen trat eine deutlichere Population von CD4⁺ chCXCR5^{high} Zellen auf (siehe Abbildung 38C). Die CD8⁺ Zellen spalteten sich vor allem im Blut und in den Caecaltonsillen in zwei Populationen auf. Die $\alpha\alpha$ -CD8⁺ Zellen waren mittels des verwendeten anti-chCD8-Antikörpers etwas schwächer anzufärben verglichen mit den $\alpha\beta$ -CD8⁺ Zellen. Die $\alpha\alpha$ -CD8⁺ Zellen dieser Organe zeigten eine niedrigere chCXCR5-Expression als die $\alpha\beta$ -CD8⁺ Zellen. Außerdem war in den Caecaltonsillen stets eine $\alpha\beta$ -CD8⁺ chCXCR5^{high} Population vorhanden.

5.3.6.2 Thymozyten

Wie bereits für die chCXCR4-Expressions-Analysen in 5.1.8 wurde auch die Expression von chCXCR5 auf den verschiedenen Thymozyten-Populationen untersucht.

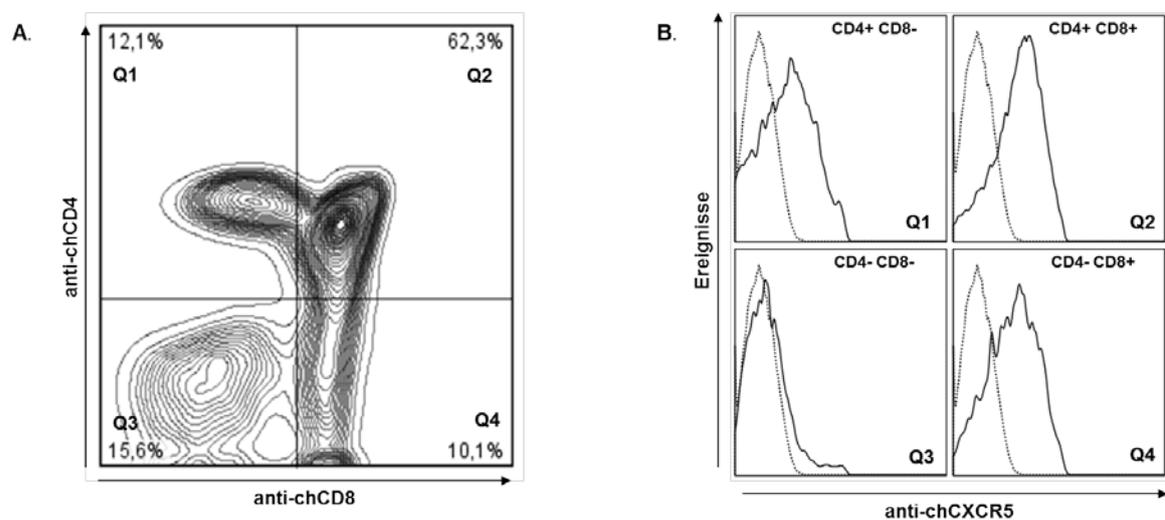


Abbildung 39: chCXCR5-Expression auf Thymozyten

Die verschiedenen Thymozyten wurden durchflusszytometrisch mittels Dreifach-Färbung durch einen anti-chCD8-FITC-, einen anti-chCD4-PE und einen chCXCR5-Antikörper untersucht. Als Sekundäntikörper wurde für chCXCR5 ein anti-muIgG1-PerCP-Antikörper verwendet.

A. zeigt die Färbung zur Identifizierung der CD4⁺, CD8⁺, doppelt-positiven und doppelt-negativen Thymozyten aus einer repräsentativen Untersuchung von insgesamt drei Experimenten.

B. zeigt die chCXCR5-Expressionen auf den verschiedenen Thymozyten-Populationen aus diesem Experiment im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (gepunktete Linie).

Doppelt-negative Thymozyten zeigten in den Untersuchungen keine oder eine nur sehr geringe Expression von chCXCR5 (MFI=100). Doppelt-positive Thymozyten hingegen

zeigten eine deutliche Zunahme der Expression (MFI=450). Auf den CD8⁺ Zellen war die Expression von chCXCR5 geringer als auf den doppelt-positiven (MFI=350), während die Expression auf CD4⁺ Zellen nochmals etwas geringer war als auf CD8⁺ Thymozyten (MFI=250). Dies entspricht der Beobachtung, dass die chCXCR5-Expression auf CD8⁺ Zellen in den übrigen peripheren Organen verglichen mit der auf CD4⁺ Zellen regelmäßig höher war.

5.3.6.3 Expression von chCXCR5 auf Kul01⁺ Zellen

Zur Untersuchung der chCXCR5-Expression auf myeloiden Zellen verschiedener Organe wurden Doppelfärbungen von chCXCR5 und Kul01 durchgeführt.

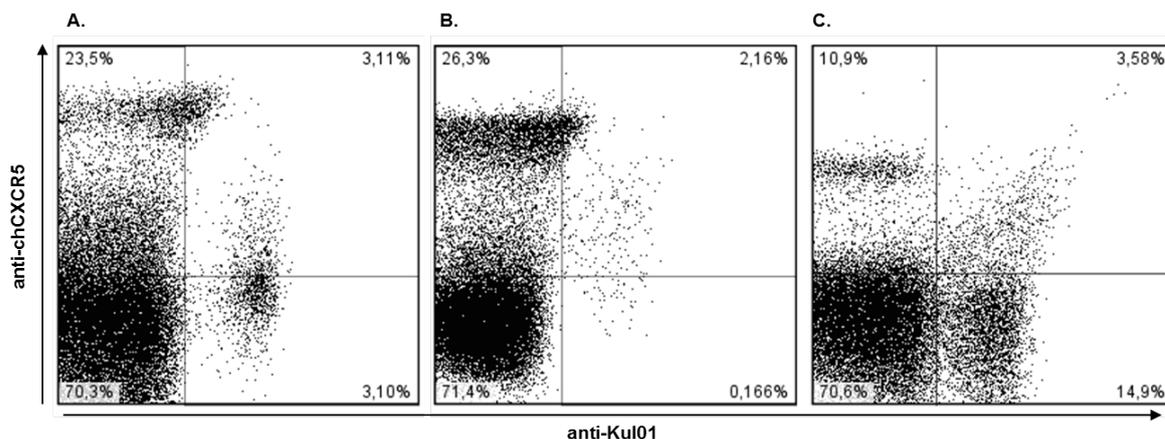


Abbildung 40: chCXCR5-Expression auf Kul01⁺ Zellen

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Untersuchung von Leukozyten nach einer Mehrfachfärbung von chCXCR5 gegen Kul01. Gezeigt werden die Untersuchungen von Leukozyten aus Blut (A); Milz(B) und Knochenmark (C: nur die chCD45⁺ Zellen dargestellt). Zu sehen ist eine repräsentative Untersuchung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Auf monozytären Zellen aus dem Blut konnte ein nur niedriges chCXCR5-Expressionsniveau festgestellt werden, die Blut-Monozyten zeigten folglich einen chCXCR5^{low} Phänotyp. Die höchste chCXCR5-Expression fand sich auf Milzmakrophagen. Die myeloiden Zellen im Knochenmark zeigten eine uneinheitliche Expression von chCXCR5, wobei die Mehrzahl der Zellen ein niedriges Expressionsniveau aufwies.

6 DISKUSSION

Die B-Zellen von Vögeln müssen, wie auch die der Säugetiere, während ihrer Entwicklung und zur Erfüllung ihrer Effektor-Funktionen zwischen verschiedenen Lokalisationen des Organismus umherwandern. Während der Ontogenese wandern die B-Zell-Vorläufer der Säugetiere von der para-aortikalen Splanchnopleura [19] zur fetalen Leber und von hier aus ins Knochenmark [23], dem späteren Hauptsitz der B-Zell-Reifung bei dieser Tiergruppe [25]. Erreichen sie das Stadium der immaturren B-Zelle, wandern diese aus dem Knochenmark aus und besiedeln die Peripherie, wo sie ihren Beitrag zur humoralen Immunität des Individuums während immunologischer Reaktionen leisten. Die B-Zell-Vorläufer der Vögel entstehen während der Ontogenese ebenfalls in der para-aortikalen Splanchnopleura und migrieren dann zur fetalen Milz sowie ins Knochenmark [87]. Von hier aus besiedeln sie im Falle des Haushuhns in der mittleren Brutwoche die Bursa Fabricii. Hier finden weite Teile der Differenzierung zur reifen aviären B-Zelle statt. Erst zum Zeitpunkt des Schlupfes beginnen die bursalen B-Zellen aus dem Organ zu emigrieren und besiedeln die Peripherie als postbursale B-Zellen [63].

Beim Säuger werden die oben beschriebenen Migrationsprozesse durch verschiedene homöostatische Chemokine und andere chemotaktisch wirksame Faktoren gesteuert [134]. Bei der Wanderung von B-Zellen sind vor allem CXCL12 mit seinem Rezeptor CXCR4 und CXCL13 mit dem Rezeptor CXCR5 von Bedeutung. Obwohl die Wanderungswege bei aviären B-Zellen verglichen mit denen der Säuger andere sind, liegt es nahe, dass diese Vorgänge beispielsweise beim Huhn durch ähnliche Mechanismen und orthologe Faktoren gelenkt werden. Da CXCR4 und CXCR5 sowie ihre zugehörigen Chemokine auch im Hühnergenom codiert werden [247], sind diese möglicherweise an der Wanderung der B-Zellen des Huhnes beteiligt. Dies betrifft wahrscheinlich die Migration präbursaler B-Zellen in die Bursa, innerhalb der Bursa die Verteilung der lymphoiden Zellen in den Follikeln, das Verweilen der bursalen B-Zellen innerhalb der Bursa sowie auch die Auswanderung dieser Zellen aus der Bursa und die Ansiedlung postbursaler B-Zellen an bestimmten Orten in der lymphatischen Peripherie.

6.1 Die Expression von chCXCR4 auf B-Zellen und die Interaktion mit CXCL12

6.1.1 chCXCL12 und chCXCR4 während der Ontogenese

Bei dieser Dissertation vorausgegangenen qRT-PCR-Analysen fand man bereits an ET10 eine hohe chCXCL12-Expression in der Bursa [265]. Die Hauptquellen der nachgewiesenen chCXCL12-mRNA müssen dabei Komponenten des bursalen Stromas sein, da gereinigte bursale B-Zellen des gleichen ontogenetischen Stadiums eine nahezu 400.000fach niedrigere chCXCL12-mRNA-Expression aufwiesen als die Gesamt-Bursa [265]. Hingegen stieg die chCXCR4-Expression mit steigender Anzahl eingewanderter und proliferierender lymphoider Zellen im Gewebe im Laufe der Ontogenese drastisch an, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Zellfraktion innerhalb der Bursa die Hauptquelle der chCXCR4-mRNA war. Hier wird deutlich, dass die sich drastisch verändernde zelluläre Komposition innerhalb der sich entwickelnden Bursa die mRNA-Expression während der Organogenese stark beeinflusst.

Dies muss auch bei der Betrachtung der in vorliegender Arbeit erhobenen qRT-PCR-Daten berücksichtigt werden. Auch hier konnte ein massiver Anstieg der chCXCR4-Expression im bursalen Gewebe festgestellt werden, sobald das Gewebe mit lymphoiden Zellen besiedelt war. Allerdings war ein Abfall der chCXCL12-mRNA-Expression zu verzeichnen. Wahrscheinlich wurde durch die veränderte Zusammensetzung des bursalen Gewebes im Laufe der bursalen Organentwicklung der proportionale Anteil der Stromazell-mRNA am Gesamt-mRNA-Gehalt des Organes verringert, wodurch eine nur scheinbare Verringerung der chCXCL12-Expression im Verlauf der bursalen Entwicklung zustande kam. An dem untersuchten Ort der präbursalen B-Zell-Reifung, der fetalen Milz, änderte sich die Expression von Chemokin und Rezeptor vor dem Schlupf kaum. Erst danach fand man eine Verringerung der chCXCL12-Expression, die wahrscheinlich auch durch die Veränderung der zellulären Bestandteile des Gewebes nach dem Schlupf bedingt wurde. Zu diesem Zeitpunkt sind in der Milz üblicherweise nur noch sehr wenige präbursale B-Zellen zu finden, während erste postbursale B-Zellen und auch T-Zellen aus dem Thymus mit der Kolonisierung der Peripherie beginnen.

Die Untersuchung der funktionellen Expression von Chemokinrezeptoren auf Zelloberflächen ist nur auf Proteinebene sinnvoll, da diese nicht ausschließlich durch Transkriptions- und Translationsraten beeinflusst werden, sondern auch durch mannigfaltige post-translationale Vorgänge wie Rezeptor-Internalisierung sowie -De- und -Resensitivierung [266]. Untersuchungen mithilfe des generierten anti-chCXCR4-

Antikörpers zeigten, dass präbursale B-Zellen in der Milz an ET14 einen einheitlichen chCXCR4^{med}-Phänotyp aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen auch die wenigen in der Bursa gefundenen B-Zellen noch keine hohe chCXCR4-Expression auf. Dies änderte sich an ET18. Die bursalen B-Zellen zeigten eine stark erhöhte Expression von chCXCR4, während das Niveau der chCXCR4-Expression auf den präbursalen B-Zellen der Milz unverändert blieb. Möglicherweise führt der chCXCR4^{high} Phänotyp bursaler B-Zellen ab diesem Zeitpunkt in Analogie zu HSCs im Säuger-Knochenmark zu einer Retention dieser Zellen in der Bursa [41]. Zu diesen Daten passt, dass bursale Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht emigrieren. Nach dem Schlupf waren in der Bursa stets zwei Populationen bursaler B-Zellen zu beobachten. Neben einer chCXCR4^{high} Population trat zusätzlich eine chCXCR4^{low} Population auf. Zu diesem Zeitpunkt vollzieht sich auch die Entwicklung typisch strukturierter Bursa-Follikel mit Trennung von Rinde und Mark. Außerdem beginnen nun erste Zellen aus der Bursa auszuwandern, um als postbursale B-Zellen die Peripherie zu besiedeln. Die Verringerung der chCXCR4-Expression auf einigen bursalen B-Zellen könnte also bedingen, dass diese Zellen zum Verlassen der Bursa befähigt werden. Genau dies machen Knochenmarkszellen, um aus dem Knochenmark emigrieren zu können [222]. Um diese Hypothese zu bekräftigen wurden B-Zellen immunologisch reifer Bursen genauer charakterisiert.

6.1.2 Die Expression von chCXCR4 auf bursalen B-Zellen

Einige der bursalen B-Zellen zeigten in durchflusszytometrischen Messungen eine deutlich reduzierte Expression ihres B-Zell-Rezeptors, was als Anzeichen baldiger Apoptose zu werten ist [69]. Diese L-Kette^{low} B-Zellen exprimierten chCXCR4 in einheitlich hohem Maße. Bei den B-Zellen mit hoher B-Zell-Rezeptor-Expression konnten hingegen chCXCR4^{high} von chCXCR4^{low} B-Zellen unterschieden werden. Möglicherweise sind nur Zellen, die nicht kurz vor der Apoptose stehen und L-Kette^{high} sind, in der Lage, die Expression von chCXCR4 negativ zu regulieren, da nur diese eine chCXCR4-Internalisierung nach B-Zell-Rezeptor-Aktivierung vollziehen können [220].

Bei der Betrachtung histologischer Präparate immunologisch ausgereifter Bursen fällt auf, dass die B-Zellen in den Follikelrinden dichter gepackt liegen als in der Follikel-Medulla. Die Zellen im Mark exprimieren vermutlich weniger MHCII auf ihrer Oberfläche als die der Rinde, worauf Färbungen histologischer Präparate mittels anti-MHCII-Antikörper hinweisen [76]. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass histologische Untersuchungen

ungeeignet sind, um die Oberflächenexpression bestimmter Moleküle absolut zu quantifizieren. Liegen die Zellen beispielsweise in der Rinde dichter gepackt und teils in mehreren Ebenen übereinander, so liefert ein Überlagerungsbild eine möglicherweise stärkere Färbung in dieser Region verglichen mit beispielsweise dem Mark, in welchem die Zellen in geringerer Anzahl lockerer im Präparat verteilt liegen, obwohl die einzelnen Zellen eine sehr ähnliche Färbung aufweisen. Dies ist auch bei Betrachtung der in Abbildung 14 gezeigten Untersuchung der chCXCR4-Expression in der Bursa zu beachten: Hier sieht man zwar, dass die Rinde nach der anti-chCXCR4-Färbung stärker leuchtet als das Mark. Aber ob die Zellen hier jeweils stärker oder schwächer angefärbt sind, kann mittels Histologie aus oben genannten Gründen nicht absolut quantitativ nachgewiesen werden. Die während durchflusszytometrischer Untersuchungen identifizierten bursalen B-Zell-Populationen unterschiedlicher MHCII- und chCXCR4-Expression können daher nicht genau lokalisiert werden. Möglicherweise liegen die MHCII^{low} chCXCR4^{low} B-Zellen vor allem im Mark, während die MHCII^{high} chCXCR4^{high} B-Zellen vornehmlich in der Rinde zu finden sind. Ob die MHCII^{high} chCXCR4^{low} B-Zellen in Rinde oder Mark liegen, kann nicht beurteilt werden. Diese Zellen könnten sowohl im Mark als auch in der Rinde unauffällig zwischen den stark leuchtenden chCXCR4^{high} B-Zellen liegen. Ein bislang nicht verfügbarer Antikörper, welcher beispielsweise ausschließlich bursale B-Zellen des Follikelmarks erkennt, wäre nötig, um beispielsweise mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen definitiv zu klären, ob sich die eine oder andere Population bursaler B-Zellen in Rinde oder Mark des Follikels befindet.

Im Follikelmark werden den hier befindlichen B-Zellen vermutlich Antigene präsentiert [267], was nach B-Zell-Rezeptor-Aktivierung zu einer chCXCR4-Internalisierung führen könnte, wie dies für huCXCR4 auf transfizierten DT40-Zellen nach Zugabe von anti-IgM-Antikörpern beschrieben wurde [220]. Ein anderer Grund, weshalb die Zellen des Marks wenig chCXCR4 auf der Oberfläche tragen könnten, wären Milieufaktoren wie das Vorhandensein verschiedener Zytokine oder eine vielleicht vergleichsweise hohe Verfügbarkeit von Sauerstoff [214, 219]. An der cortico-medullären Grenze der Follikel war stets eine starke Fluoreszenz zu sehen. Möglicherweise kommt es hier durch ein zum zentralen Bereich des Marks verschiedenes Milieu zu einer Hochregulation von chCXCR4. Hier könnten auch verschiedene Stromazellen, wie beispielsweise die sogenannten *arch forming cells* residieren, die möglicherweise bestimmte Zytokine sezernieren oder vielleicht sogar CD40L zur Stimulation von CD40 auf B-Zellen auf ihrer Oberfläche tragen, wodurch eine verstärkte Oberflächenexpression von chCXCR4 verursacht werden

kann. In CD40L-stimulierten Kulturen primärer Bursazellen war stets eine massive Erhöhung der chCXCR4-Expression zu finden. Ob diese verstärkte chCXCR4-Expression allerdings tatsächlich rein auf die CD40L-Stimulation zurückzuführen ist oder von anderen Milieu-Faktoren mitverursacht wurde, kann nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise resultiert die starke, CD40L-bedingte Proliferation der Zellen auch in einer pH-Wert-Verschiebung oder einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, sodass eine vermehrte chCXCR4-Expression nach der Induktion intrazellulärer Stress-Mediatoren wie HIF-1 α verursacht wird, wie es beim Menschen beschrieben wurde [28]. Auch kreuzreagierende Zytokine im FBS-haltigen Medium könnten eine veränderte chCXCR4-Expression bewirkt haben.

Das chL12 (OV)-Antigen ist ein Marker für auswanderungsbereite bursale B-Zellen [71]. 95% der bursalen B-Zellen exprimieren dieses Antigen nicht, 5% der bursalen B-Zellen sind hingegen OV⁺. Diese Zellen sind es, die nach der Auswanderung, vermutlich über kortikale Gefäße, als sogenannte *recent bursal emigrants* (RBEs) in der Blutbahn auftauchen [71]. RBEs sind klein, zeigen eine hohe Expression von MHCII sowie eine hohe B-Zell-Rezeptor-Expression. Dies ist auch der Phänotyp der typischerweise im Blut auftretenden B-Zellen: OV⁺ MHCII^{high} L-Kette^{high}. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass die OV⁺ bursalen B-Zellen eindeutig der chCXCR4^{low} Population zuzurechnen waren. Außerdem waren die Zellen dieser Population einheitlich klein, das heißt vermutlich mitotisch inaktiv, während die chCXCR4^{high} Population in der Bursa teils große Zellen vom Blasten-Typ enthielt. Ob sich die bursalen OV⁺ B-Zellen in Medulla oder Cortex aufhalten, konnte bislang nicht geklärt werden. Möglicherweise werden diese Zellen aufgrund ihrer vergleichsweise geringen chCXCR4-Expression nicht mehr von der hohen CXCL12-Konzentration im bursalen Gewebe zurückgehalten und können erst hierdurch die Bursa verlassen. Die Verringerung der chCXCR4-Expression würde somit in Analogie zu den Knochenmarkszellen des Säugers eine Voraussetzung für eine Auswanderungsfähigkeit bursaler OV⁺ B-Zellen aus dem CXCL12-reichen Gewebe darstellen [41].

6.1.3 Die Expression von chCXCR4 auf postbursalen B-Zellen

Die in Blut, Milz, Caecaltonsillen, Knochenmark und Thymus zu findenden B-Zellen waren meist chCXCR4^{low}. Im Blut und in der Milz traten allerdings auch unregelmäßig Populationen von B-Zellen mit größerem Zelldurchmesser auf, die chB6^{high} waren, ihre

Expression von chCXCR4 nochmals verringert zu haben schienen und somit chCXCR4^{very low} waren. In allen untersuchten Caecaltonsillen existierte neben der chB6^{med} CXCR4^{low} Population eine zweite Population von chB6^{high} chCXCR4^{high} B-Zellen. Mithilfe des später generierten anti-chCXCR5-Antikörpers konnten die verschiedenen B-Zell-Populationen besser charakterisiert werden.

6.1.4 Funktionelle Untersuchungen der CXCL12/CXCR4-Interaktion

Durchflusszytometrische Calciumflux-Messungen haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen den CXCL12-Molekülen verschiedener Spezies und chCXCR4 einen Calciumflux in den Zellen bewirkte. Die Interaktion zwischen Chemokin und Rezeptor löste also eine zelluläre Reaktion aus. Diese war bei Einsatz von chCXCL12-haltigen Zellkulturüberständen in ihrer Stärke geringer, dafür aber über einen längeren Zeitraum messbar als beispielsweise bei Zugabe von gereinigtem, kommerziell erhältlichem huCXCL12, welches nach Zugabe einen hohen Anstieg der Kalziumkonzentration mit schnellem Abflauen des Signals bewirkte. Möglicherweise ist dies als Resultat einer geringeren Konzentration oder einer geringeren Stabilität des im Zellkulturüberstand befindlichen Hühner-Chemokins verglichen mit dem konzentrierten, gereinigten huCXCL12 zu werten, wodurch in derselben Zeit pro Zelle weniger CXCL12-chCXCR4-Interaktionen stattfinden und sowohl das Signal geringer ausfällt als auch die Liganden-abhängige Rezeptor-Internalisierung weniger schnell von statten geht. Dies entspricht Überlegungen von Germain et al., die beschreiben, dass Rezeptoren von Zellen nach schwächerer Aktivierung über einen längeren Zeitraum hinweg aktivierbar sind als bei stärkerer Aktivierung des Rezeptors [268].

Der Calciumflux nach Liganden-Bindung war spezifisch inhibierbar, indem chCXCR4 auf den verwendeten Zellen durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100 blockiert wurde [223]. Dies spricht für eine sehr spezifische Interaktion von CXCL12 mit chCXCR4.

Sowohl DT40-Zellen als auch primäre B-Zellen unterschiedlicher Gewebe migrierten in Richtung hoher CXCL12-Konzentrationen. Die Migration war ebenfalls durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100 zu hemmen. Die Migrationraten der Zellen waren sowohl abhängig von der Dosis des angewandten Chemokins als auch von der chCXCR4-Expressionsdichte auf der jeweiligen Zelloberfläche. Bursale B-Zellen mit größtenteils hoher chCXCR4-Expression zeigten eine deutlich höhere spezifische Migration verglichen mit den chCXCR4^{low} B-Zellen aus Milz und Blut. Dies ist ein erster funktioneller Hinweis

darauf, dass chCXCR4^{high}-B-Zellen tatsächlich eine stärkere Retention durch die wahrscheinlich CXCL12-reiche bursale Umgebung erfahren als chCXCR4^{low} B-Zellen, die in die Peripherie entlassen werden können. Dies wäre analog zu in hohem Maße CXCR4-exprimierenden Säuger-B-Zellen im Knochenmark, die durch hohe Konzentrationen von CXCL12 im Knochenmark gehalten werden [41].

Die Bindung des anti-chCXCR4-Antikörpers bewirkte nach Zugabe von CXCL12 bei durchflusszytometrischen Messungen einen verringerten Calciumflux sowie in Transwell-Migrations-Assays eine deutlich verminderte Migrationsrate der Zellen. Da der anti-chCXCR4-Antikörper keine Aktivierung von chCXCR4 auslöst, ist eine Internalisierung des Chemokinrezeptors unwahrscheinlich. Vielmehr erscheint es so, dass die Anlagerung des Antikörpers an sein Epitop die Interaktion zwischen Chemokin und Rezeptor vermutlich räumlich behindert. Einen weiteren Hinweis hierauf liefert die Beobachtung, dass chCXCR4 auf CXCL12-behandelten Zellen durch Verwendung des monoklonalen anti-chCXCR4 Antikörpers, verglichen mit unbehandelten Zellen, nicht mehr in gleichem Ausmaß nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise kam es nach CXCL12-Bindung zu einer Rezeptor-Internalisierung. Eine andere Möglichkeit ist aber auch darin zu sehen, dass der Antikörper nicht mehr mit gleicher Effektivität an sein Epitop am Chemokinrezeptor binden konnte, nachdem sich bereits der Chemokin-Ligand angelagert hatte und hierdurch möglicherweise eine Konformationsänderung oder eine sterische Anlagerungs-Hinderung am Rezeptor bewirkt hatte.

6.2 Die Expression von chCXCR5 auf B-Zellen und chCXCL13

CXCR5 wird beim Säuger vornehmlich von B-Zellen, aber auch von einer Reihe anderer Zelltypen exprimiert und ist in der Interaktion mit CXCL13 für die Entstehung der B-Zell-Areale innerhalb lymphatischer Strukturen von größter Bedeutung [231]. Im Gegensatz zu den Säugern, bei denen je nur eine CXCL13-Form bekannt ist, existieren beim Huhn gleich drei Isoformen von chCXCL13: chCXCL13 L1, chCXCL13 L2 sowie chCXCL13 L3 [247].

6.2.1 chCXCL13 und chCXCR5 während der B-Zell-Ontogenese

Bei Betrachtung der zu verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese durchgeführten qRT-PCR-Analysen ist, wie schon bei den Analysen zur chCXCR4-Expression, zu

berücksichtigen, dass es zwischen den gewählten Zeitpunkten zu beträchtlichen Veränderungen der Gewebezusammensetzung kommt. Bei diesen Analysen war eindeutig erkennbar, dass die Expression aller drei chCXCL13-Isoformen an ET14 in Bursa und Milz noch verhältnismäßig gering war. An ET18 war jeweils ein Anstieg der Expression aller drei Isoformen in der Bursa zu sehen. Möglicherweise beginnen erst zwischen diesen beiden Zeitpunkten bestimmte bursale Stromazellen mit der Produktion dieser Chemokine. Da das bursale Stromagewebe noch nicht detailliert beschrieben wurde, kann nur vermutet werden, welche Art Stromazelle diese Aufgabe wahrnehmen könnten. Eine beschriebene Stromazellart ist beispielsweise die sogenannte *bursal secretory dendritic cell* [77]. Auch in der Milz könnten spezielle, bislang nicht beschriebene Stromazellen nach dem Schlupf vermehrt chCXCL13 exprimieren und hierdurch chCXCR5-exprimierende B-Zellen in ihre Umgebung locken. Bei Säugern übernehmen diese Aufgabe beispielsweise spezialisierte Zellen des lymphoretikulären Bindegewebes [269].

Die Expression des chCXCR5-Proteins auf B-Zellen wurde während der Ontogenese mithilfe des erzeugten anti-chCXCR5-Antikörpers untersucht. Auf präbursalen B-Zellen in der Milz war die Expression von chCXCR5 an ET14 zwar uneinheitlich, aber auf insgesamt niedrigem Niveau. Dies traf auch auf die zu diesem Zeitpunkt in der Bursa befindlichen B-Zellen zu, was ein Hinweis dafür ist, dass der Interaktion zwischen chCXCL13 und chCXCR5 für eine Besiedlung der Bursa durch diese Zellen vermutlich eine nur untergeordnete Bedeutung beigemessen werden kann. An ET18 kam es auf bursalen B-Zellen zu einer massiven Steigerung der chCXCR5-Expression, während die chCXCR5-Expression auf den zu diesem Zeitpunkt noch in der Milz zu findenden, zahlenmäßig wenigen präbursalen B-Zellen unverändert niedrig war. Möglicherweise ist diese vermehrte chCXCR5-Expression für die Besiedlung bestimmter bursaler Strukturen nötig, sodass erst chCXCR5^{high} B-Zellen in die Follikel-Anlagen gelockt und dort gehalten werden. Wo und von welchen Zellen chCXCL13 zu diesem Zeitpunkt in der Bursa synthetisiert wird, muss noch untersucht werden. Erst nach dem Schlupf, also sobald die ersten postbursalen B-Zellen die Milz besiedeln, kam es zu einem Anstieg der chCXCR5-Expression auf den bereits aus der Bursa emigrierten B-Zellen der Milz, wodurch die Entstehung typischer B-Zell-Areale beispielsweise in Form von B-Zell-Follikeln wahrscheinlich erst ermöglicht werden könnte.

6.2.2 Die Expression von chCXCR5 auf bursalen B-Zellen

Auf bursalen B-Zellen bleibt die chCXCR5-Expression auch nach dem Schlupf hoch. In der Bursa entwickelt sich keine B-Zell-Population mit geringerer chCXCR5-Expression,

wodurch die Expression dieses Chemokinrezeptors während des Auswanderungsprozesses bursaler B-Zellen nur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Hingegen war in der Bursa zehnwöchiger Hühner bei genauerer Betrachtung neben der $chB6^{high}CXCR5^{high}$ B-Zell-Population eine zweite Population mit gesteigerter $chCXCR5$ -Expression zu erkennen. Dies war eine Population sehr großer Zellen mit außergewöhnlich hoher Expression von $chB6$, die bei bisherigen durchflusszytometrischen Untersuchungen nicht von den üblichen bursalen B-Zellen differenziert werden konnte. Sie zeigten bezüglich aller untersuchter Oberflächenmarker, d.h. L-Kette (B-Zell-Rezeptor), MHCII, BAFF-R und $chCXCR4$, eine erhöhte Fluoreszenz. Die hohe Fluoreszenz dieser Zellen in durchflusszytometrischen Analysen muss allerdings nicht zwangsläufig eine höhere Dichte dieser Moleküle auf der Zelloberfläche bedeuten, sondern kann auf der generell höheren Fluoreszenz größerer Zellen verglichen mit der kleineren Zellen beruhen. Ob diese Zellen aufgrund der höheren $chCXCR5$ -Expression bestimmte Lokalisationen innerhalb der Bursa einnehmen, kann momentan nur vermutet werden. Es könnte sich beispielsweise um sogenannte bursale Stammzellen handeln, deren Vorkommen und Lokalisation *in vivo* aber bislang nicht eindeutig gesichert werden konnte [92]. Möglicherweise handelt es sich auch um spezielle Plasmazell-Subtypen oder B-Gedächtniszellen, die vielleicht spezielle Areale innerhalb der Bursafollikel besiedeln.

6.2.3 Die Expression von $chCXCR5$ auf postbursalen B-Zellen

Schon bei durchflusszytometrischen Untersuchungen von Leukozyten zehnwöchiger Hühner nach Färbung von $chB6$ gegen $chCXCR5$ wurde deutlich, dass die meisten postbursalen B-Zellen $chCXCR5$ zwar auf hohem Niveau exprimieren, aber auch $chCXCR5^{low}$ B-Zellen vorkommen.

Im Blut war neben einer B-Zell-Population mit $chB6^{med} chCXCR5^{high}$ Phänotyp eine unregelmäßig auftretende $chB6^{high}$ B-Zell-Population zu finden, die allerdings $chCXCR5^{low}$ war. Diese Zellen haben die Expression dieses Rezeptors möglicherweise zum Verlassen der B-Zell-Areale und zum Übertritt in die Blutbahn reduziert, um $chCXCL13$ -unabhängig zu werden und andere Orte innerhalb des Organismus anzusteuern. Dieses Phänomen tritt beispielsweise bei Plasmazellen von Maus und Mensch auf [246]. Ob die Zellen dieser $chB6^{high}$ Population allerdings tatsächlich Plasmazellen sind, ist fraglich, da *in vitro*-Untersuchungen von CD40L-stimulierten Hühnerleukozyten gezeigt haben, dass CD40L-induzierte Plasmablasten ihre $chB6$ -Expression wahrscheinlich

eher reduzieren und daher vermutlich nicht $\text{chB6}^{\text{high}}$ sind [264]. Außerdem zeigten die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ B-Zellen im Blut eine hohe Expression des B-Zell-Rezeptors, was für Plasmazellen untypisch wäre, denn Säuger-Plasmazellen exprimieren für gewöhnlich nur wenig B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche [246].

In Milz und Caecaltonsillen waren jeweils drei B-Zell-Populationen zu finden. Die $\text{chB6}^{\text{high}}$ Population spaltete sich in diesen Organen in je eine $\text{chCXCR5}^{\text{high}}$ und eine $\text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Population auf. Sowohl die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ als auch die $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Population in der Milz unterschieden sich phänotypisch von denen aus den Caecaltonsillen. Wahrscheinlich besiedeln die $\text{chCXCR5}^{\text{high}}$ Zellen analog zum Säugersystem chCXCL13 -reiche B-Zell-Areale, während die $\text{chCXCR5}^{\text{low}}$ B-Zellen diese Lokalisationen verlassen können.

Beim Säuger ist eine ganze Reihe verschiedener B-Zell-Typen in der Peripherie zu finden, die durch verschiedene Oberflächenmarker charakterisiert sind. Beim Huhn existieren bedauerlicherweise keine Antikörper gegen die meisten dieser Oberflächenmoleküle. Daher waren die verschiedenen B-Zell-Typen bei dieser Tierart bislang nicht gut differenzierbar. Neben verschiedenen Transitionsstadien von der immaturen zur maturen B-Zelle treten beim Säuger folliculäre B-Zellen auf, die den Hauptteil der B-Zell-Fraktion beispielsweise in der Milz ausmacht [270]. Vermutlich liegen beim Huhn zahlenmäßig ähnliche Verhältnisse vor, sodass die meisten der $\text{chB6}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ B-Zellen folliculäre B-Zellen sind, die wie auch die des Säugers typischerweise keine besonders hohe mitotische Aktivität aufweisen, das heißt verhältnismäßig klein sind, und BAFF-R, MHCII und viel Immunglobulin auf ihrer Oberfläche tragen.

In der Säugermilz treten neben folliculären B-Zellen auch Plasmablasten und Plasmazellen auf, die im Laufe von Germinalen Zentrums-Reaktionen gebildet werden. Von Plasmazellen des Säugers ist bekannt, dass sie die CXCR5-Expression sowie auch die Expression des B-Zell-Rezeptors verringern und größeren Zelldurchmesser haben als folliculäre B-Zellen [246, 270]. Eine $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{low}} \text{chL-Kette}^{\text{low}}$ Population tritt auch in der Milz sowie in den Caecaltonsillen auf. Diese Zellen könnten aufgrund ihres $\text{chCXCR5}^{\text{low}}$ Phänotyps durchaus Plasmazellen sein, die in der Lage sind, die möglicherweise chCXCL13 -reichen B-Zell-Areale zur Erfüllung ihrer Effektorfunktion zu verlassen und andere Lokalisationen im Organismus anzusteuern. Säuger-Plasmablasten hingegen halten sich zur Vermehrung noch in den CXCL13 -reichen B-Zell-Arealen auf, weshalb eine hohe Expression von chCXCR5 auf diesen Zellen zu finden ist [246]. Einige der $\text{chB6}^{\text{high}} \text{chCXCR5}^{\text{high}}$ B-Zellen in Milz und Caecaltonsillen könnten also durchaus

Plasmablasten sein. Während einer immunologischen Reaktion entstehen auch B-Gedächtniszellen [54]. Vermutlich ist dies auch beim Huhn der Fall. Zusätzliche durchflusszytometrische Untersuchungen unter Verwendung neu generierter Antikörper gegen chSyndecan-1 (CD138) [271] und chTACI, einen Rezeptor für das Zytokin chBAFF, könnten ebenfalls Hinweise auf die Funktion der verschiedenen Zellen liefern: Bei Säugern wird beispielsweise Syndecan-1 vermehrt von Plasmazellen exprimiert [272], während die Expression von TACI vornehmlich auf Plasmablasten, Plasmazellen, aber auch auf B-Gedächtniszellen zu finden ist [273]. Während das Überleben und die Funktionalität von Plasmazellen des Säugers vom Zytokin BAFF abhängig ist, scheinen B-Gedächtniszellen unabhängig von diesem Zytokin zu sein [274], was bei Betrachtung der BAFF-R-Expression auf einigen der identifizierten B-Zelltypen mitbeachtet werden muss. Möglicherweise sind B-Gedächtniszellen des Huhnes BAFF-R-negativ und finden sich in der chB6^{high} chCXCR5^{low} Population, die in Milz und Caecaltonsillen der untersuchten Tiere vorkam.

Um abzuklären, ob es die verschiedenen neu identifizierten B-Zell-Populationen Plasmablasten, Plasmazellen oder Gedächtniszellen beherbergen, könnte es hilfreich sein, dass diese Zelltypen nicht nur durch bestimmte Oberflächenmarker charakterisiert sind, sondern auch durch die Expression bestimmter zytoplasmatischer Faktoren. Da verschiedene Transkriptionsfaktoren in der Evolution hochkonserviert sind, kann es durchaus sein, dass Antikörper gegen derartige intrazelluläre Proteine des Säugers auch die äquivalenten Hühner-Proteine detektieren. Somit stünden diese kreuzreagierenden Antikörper für die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Hühner-B-Zell-Populationen mittels zytoplasmatischer Färbung zur Verfügung. Während beispielsweise naive B-Zellen vor allem Pax5 exprimieren, findet man in aktivierten B-Zellen vornehmlich die Expression von bcl-6 und in Plasmablasten und in Plasmazellen die von blimp-1 [275]. Falls keiner der potentiell kreuzreagierenden Kandidaten-Antikörper die Antigene in Hühnerzellen erkennen sollte, gäbe es die Möglichkeit, die Expression solcher Faktoren innerhalb einzelner B-Zell-Populationen mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene zu untersuchen, nachdem die verschiedenen Zelltypen anhand ihrer chB6 und chCXCR5-Expression mittels durchflusszytometrischer Methoden separiert worden sind.

Außerdem können in der Milz und eventuell auch in anderen Organen des Huhnes postbursale Stammzellen vorkommen, durch die die humorale Immunität des Huhnes auch nach der Involution der Bursa noch aufrechterhalten werden kann [92]. Der Phänotyp dieser Zellen ist noch umstritten, es wird aber angenommen, dass sie im Gegensatz zu

anderen postbursalen B-Zellen $chL12^-$ sind [267]. Zusätzliche durchflusszytometrische Untersuchungen hinsichtlich dieses Antigens und der Chemokinrezeptor-Expression könnten zur Charakterisierung und Isolierung dieser Zellfraktion beitragen.

Bei den aus Milz und Caecaltonsillen isolierten B-Zellen könnte es sich theoretisch auch um verschiedene Funktionszustände von B-Zellen während einer Germinalen Zentrums-Reaktion handeln, wobei Zentroblasten in Analogie zum Säuger $CXCR4^{high} CXCR5^{low}$ und Zentrozyten $CXCR4^{low} CXCR5^{high}$ sein könnten [239]. Hierbei muss allerdings gesagt werden, dass sich Lymphozyten aus Germinalen Zentren mittels der gewählten Leukozyten-Präparations-Methoden nicht zuverlässig aus Geweben wie Milz und Caecaltonsillen herauslösen lassen und diese oftmals vollständig innerhalb dieser Strukturen an Geweberesten und Gefäßstämmen verbleiben. Um eine effektive Präparation auch dieser Zellen zu erreichen, müssten die Gewebe beispielsweise einem Protease-Verdau unterworfen werden. Ergänzend hierzu wären zur Untersuchung der Chemokinrezeptor-Expression innerhalb Germinaler Zentren weitergehende histologische Untersuchungen unter Zuhilfenahme der erzeugten anti-Chemokinrezeptor-Antikörper hilfreich, um klären zu können, ob Zentrozyten möglicherweise $chCXCR4^{low} chCXCR5^{high}$ und Zentroblasten $chCXCR4^{high} chCXCR5^{low}$ sind und deshalb wie beim Säuger an unterschiedlichen Orten innerhalb eines Germinalen Zentrums anzutreffen sind [239]. Auch hier sind allerdings methodische Grenzen gesetzt, da in histologischen Präparaten unter Umständen aus den zuvor diskutierten optischen Effekten nur schlecht zwischen hoher und niedriger Chemokinrezeptor-Oberflächenexpression auf einzelnen Zellen differenziert werden kann.

Dass jedes der untersuchten Organe ein unterschiedliches Repertoire an B-Zell-Typen aufzuweisen hat, ist nicht verwunderlich. In jedem dieser Organe herrscht ein jeweils typisches Milieu, welches für bestimmte Zelltypen unterschiedliche, für deren Überleben und Differenzierung zuträgliche Faktoren zu bieten hat. Ebenfalls darf es nicht verwundern, dass nicht alle B-Zell-Populationen bei jedem der untersuchten Tieren zu finden war: Hier könnten altersbedingte Unterschiede in der B-Zell-Populations-Komposition eine Rolle spielen, wie dies auch bei Säugern beobachtet werden kann. Bei Menschen treten beispielsweise im Alter verglichen mit jungen Individuen vermehrt B-Gedächtniszellen auf und die B-Zellen von Senioren zeigen eine geringere Expression von E2A sowie AID und durchlaufen seltener einen Klassenwechsel ihrer Immunglobuline [276, 277]. Möglicherweise treten manche B-Zelltypen auch nur in den Geweben von Tieren auf, in denen aktuell eine immunologische Reaktion stattfindet.

6.3 chCXCR4 und chCXCR5 auf T-Zellen und Zellen der myeloiden Reihe

T-Zellen exprimierten bereits während ihrer Thymus-abhängigen Entwicklung chCXCR4 in unterschiedlichem Ausmaß. Bereits nach dem Doppelt-negativen Stadium war auf Thymozyten die kontinuierliche Expression von chCXCR5 zu finden. Möglicherweise nehmen diese beiden Chemokinrezeptoren, im Zusammenspiel mit dem beim Huhn bislang nicht untersuchten, bei Säugern allerdings für T-Zell-Migration verantwortlichen CCR7, Einfluss auf die für die Differenzierung dieser Zellen nötige Wanderung durch verschiedene Regionen innerhalb des Thymus [204].

Auch nach der Entwicklung im Thymus könnte die unterschiedlich ausgeprägte chCXCR4-Expression auf T-Zellen eine Rolle bei der Verteilung dieser Zellen innerhalb verschiedener peripherer Kompartimente spielen [45]. Einige periphere T-Zell-Subpopulationen exprimierten auch chCXCR5. Dies ermöglicht verschiedenen T-Zell-Subpopulationen vermutlich, mit B-Zellen zu co-lokalisieren und hierdurch direkt mit diesen interagieren zu können, wie dies beim Säuger bereits beschrieben wurde [241]. Dies ist beispielsweise bei CXCR5-exprimierenden CD4⁺ folliculären T-Helfer-Zellen beim Säuger der Fall, die in der Lage sind, in CXCL13-reiche B-Zell-Areale einzutreten und die Entstehung einer funktionalen Keimzentrumsreaktion bedingen [278]. Auch im Blut von Säugern kommen CXCR5-exprimierende T-Zellen vor, die sogenannten *Human Central Memory CD4 T Cells* [242]. Möglicherweise existieren derartige Zellen auch beim Huhn.

Die myeloiden Zellen verschiedenen Ursprungs exprimierten chCXCR4 und chCXCR5 in unterschiedlichem Ausmaß: chCXCR4^{low} Blut-Monozyten zeigten eine recht niedrige chCXCR5-Expression, während chCXCR4^{low} Milz-Makrophagen eine höhere chCXCR5-Expression aufwiesen. Dies kann für die effektive Antigenpräsentation durch diese Zellen von Bedeutung sein, wofür sich diese teils in der Nähe von B-Zellen aufhalten müssen. Die zahlreichen im Knochenmark vorhandenen myeloiden chCXCR4^{low} sowie chCXCR4^{high} Zellen zeigten eine sehr uneinheitliche chCXCR5-Expression, was ein Hinweis für die Heterogenität dieser Zellgruppe ist.

6.4 Mögliche Rollen von chCXCR4 und chCXCR5

Ein Konzept der möglichen B-Zell-Migration beim Huhn zeigt Abbildung 41. Die tatsächliche Abhängigkeit dieser Prozesse von der Expression oder Nicht-Expression bestimmter Chemokinrezeptoren wurde bislang nicht nachgewiesen. Die deskriptiven

Daten sowie erste funktionelle Tests geben jedoch deutliche Hinweise darauf, dass sowohl chCXCR4 als auch chCXCR5 eine Rolle hierbei spielen.

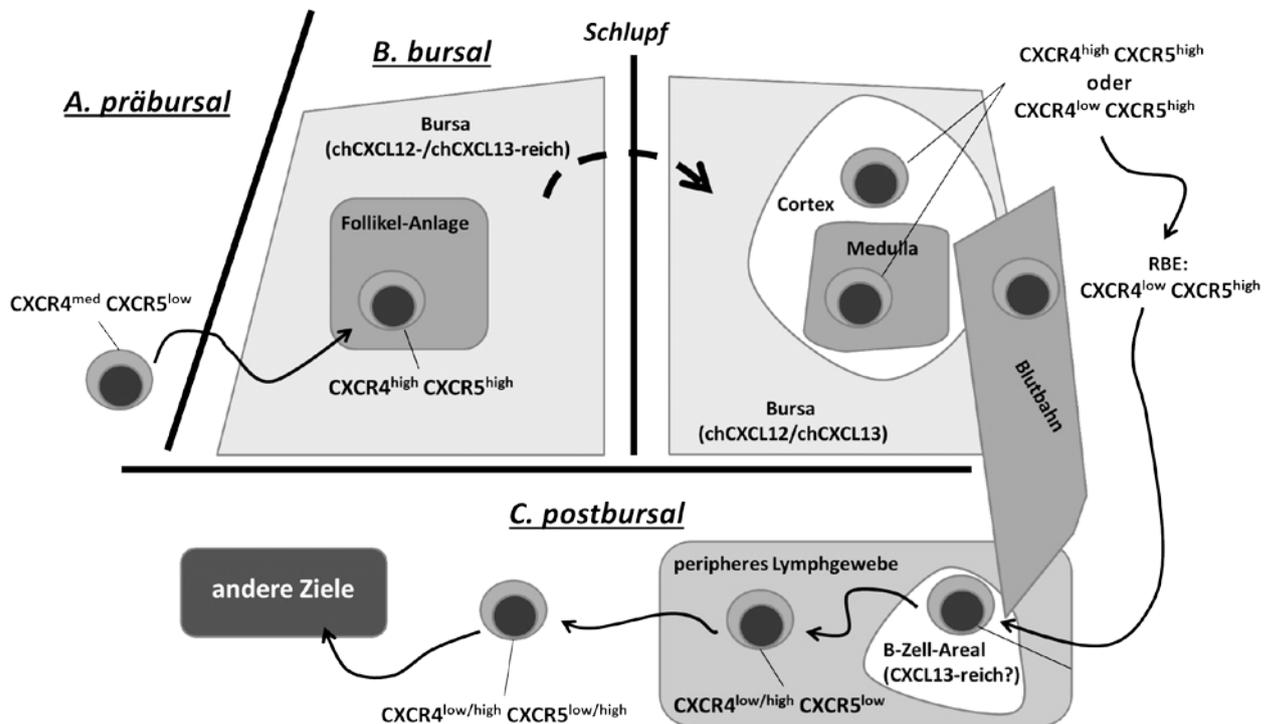


Abbildung 41: Hypothese zur Chemokin-gesteuerten B-Zell-Wanderung

Präbursale B-Zellen (A) wandern während der Ontogenese in die Bursa ein. Sie besiedeln als bursale Zellen (B) die Follikelanlagen und beginnen nach dem Schlupf zu emigrieren. Postbursale B-Zellen (C) besiedeln danach unterschiedliche lymphatische Kompartimente des Organismus.

Präbursale B-Zellen in der Milz zeigen einen $\text{chCXCR4}^{\text{med}} \text{chCXCR5}^{\text{low}}$ -Phänotyp. Diese besiedeln die Bursa in einem vermutlich zweistufigen Prozess. Zuerst muss der Übertritt ins bursale Stroma, danach der Eintritt von hier in die Follikel-Anlagen bewältigt werden. Frühe bursale B-Zellen haben einen den präbursalen B-Zellen ähnlichen Phänotyp. Erst nach ET14 steigern diese die Expression von chCXCR4 und chCXCR5 auf ihrer Oberfläche, wobei die chCXCR4-Expression die Zellen vermutlich an der Auswanderung aus dem bursalen Stroma hindert. Um den Zeitpunkt des Schlupfes tritt innerhalb der Bursafollikel die Trennung zwischen Mark und Rinde auf, zeitgleich entsteht eine neue bursale B-Zell-Population mit verringerter chCXCR4-Expression und die ersten bursalen Zellen beginnen zu emigrieren und die Peripherie zu besiedeln. Dass einige der bursalen $\text{chCXCR4}^{\text{low}}$ B-Zellen zur Emigration fähig sind, beweist ihre chL12 (OV-Antigen)-Expression. Bis zur Auswanderung aus der Bursa zeigen alle B-Zellen eine hohe chCXCR5-Expression. Postbursale B-Zellen zeigen hingegen bezüglich ihrer

Chemokinrezeptor-Expression ein sehr heterogenes Bild. Vermutlich hängt eine hohe chCXCR5-Expression mit der Fähigkeit betroffener B-Zellen zusammen, chCXCL13-reiche Gebiete innerhalb lymphatischer Strukturen zu besiedeln, während chCXCR5^{low} B-Zellen diese Orte verlassen können, um andere Destinationen anzusteuern.

6.5 Ausblick

Um die Funktion homöostatischer Chemokine während der B-Zellentwicklung beim Huhn besser zu verstehen, wäre es von Vorteil, die genaue Expression dieser Moleküle innerhalb der lymphatischen Strukturen zu untersuchen. Durch In-situ-Hybridisierung von histologischen Bursa-Präparaten könnte die genaue Herkunft von chCXCL12 in diesem Organ bestimmt und mit der Expression in anderen immunologischen Organen verglichen werden. Auch bei den verschiedenen chCXCL13-Isoformen wäre eine genaue Untersuchung der Gewebe-Expression von Bedeutung, um erste Anhaltspunkte zu bekommen, ob diesen drei Isoformen jeweils eine unterschiedliche Expressionsverteilung in verschiedenen Lokalisationen sowie eventuell sogar unterschiedliche Funktion zukommt. Zur Wirkung der Interaktion zwischen jeweils chCXCR5 und den drei chCXCL13-Isoformen wurden bislang keine funktionellen Tests durchgeführt. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine chCXCR5-exprimierende HEK-293-Zelllinie erzeugt. Diese könnte nach Expression der chCXCL13-Isoformen für Calciumflux- sowie Chemotaxis-Assays verwendet werden, um erste Einblicke in eventuelle Funktionsunterschiede der Isoformen zu bekommen.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen verschiedenen B-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich phänotypisch so stark voneinander, dass diesen unterschiedlichen Zelltypen vermutlich auch unterschiedliche Funktionen im Immunsystem zukommen. Bei Betrachtung der verschiedenen B-Zell-Populationen unterschiedlicher Chemokinrezeptor-Expression in verschiedenen Organen wäre es interessant, diese nach einer Separation jeweils getrennt voneinander funktionell zu untersuchen. Hierbei könnte festgestellt werden, ob diese Zellen Antikörper produzieren oder ob diese Zellen Stammzell-Potential besitzen, sich also *in vitro* nach Stimulation mit verschiedenen Agenzien zu Zellen anderen Phänotyps entwickeln.

Zur Untersuchung, ob chCXCR4 im Zusammenspiel mit chCXCL12 bei der Besiedlung der Bursa-Anlage mit lymphoiden Zellen während der Ontogenese tatsächlich essentiell

ist, wäre eine *in vivo*-Blockierung der CXCL12/CXCR4-Interaktion in der zweiten Brutwoche durch CXCR4-Antagonisten denkbar. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung sind die meisten gestaltgebenden Prozesse im Embryo bereits abgeschlossen, sodass nicht mit einer hohen Letalität zu rechnen ist. Eine lokale Gabe von Polyphemusin II-Abkömmlingen konnte in Hühnerembryonen bereits die Migration myogener Progenitorzellen beeinflussen [255, 256]. Sollte die Interaktion zwischen chCXCL12 und chCXCR4 für eine erfolgreiche Kolonisierung der Bursa mit lymphoiden Zellen nötig sein, dann führt die Anwendung eines derartigen Protokolls womöglich zu einer stark verminderten Ausprägung dieses Prozesses.

Um die Einwanderung präbursaler B-Zellen in eine Bursa zu untersuchen wäre es überdies denkbar, diese Zellen zu isolieren und danach in ein B-Zell-freies Huhn zu geben, welches allerdings eine Bursa-Anlage entwickelt haben muss. B-Zell-freie Hühner könnten beispielsweise durch die Gabe von Steroidhormonen generiert werden [74]. Möglicherweise kommt es hier bei der Gabe unbehandelter präbursaler B-Zellen zu einer normalen Ausbildung des Organes mit nachfolgend physiologisch ausgeprägter humoraler Immunantwort, während die Gabe von mit spezifischen Chemokinrezeptor-Antagonisten behandelten präbursalen B-Zellen in einem Ausbleiben der bursalen Besiedlung münden würde.

Zum Nachweis der Wichtigkeit der CXCL12/CXCR4-Interaktion für die Retention bursaler B-Zellen in der Bursa könnten ebenfalls *in vivo*-Versuche hilfreich sein. Hierfür könnten bursale B-Zellen *in-situ* zunächst mit einem Farbstoff, beispielsweise FITC, markiert werden [71]. Dies ist möglich, indem man eine Farbstoff-haltige Lösung auf die Anallippen der zu untersuchenden Hühner gibt, damit diese Lösung durch *cloacal drinking* retrograd in den Enddarm und über die Verbindung zum Bursa-Lumen ins bursale Gewebe aufgenommen wird. Der Farbstoff lagert sich an die dortigen Zellen an und markiert diese. Stimmt die Hypothese, dass die Interaktion zwischen chCXCL12 und chCXCR4 bursale B-Zellen im Gewebe hält, sollte nach der Applikation eines spezifischen CXCR4-Inhibitors eine erhöhte Freisetzung markierter bursaler B-Zellen ins Blut zu sehen sein. Das Auftreten dieser Zellen im Blut könnte aufgrund ihrer Farbstoff-Markierung sowie anhand des Nicht-Blut-B-Zell-Phänotyps dieser Zellen (teils große B-Zellen, teils L-Kette^{low}, teils MHC^{low}) über einen bestimmten Zeitraum hinweg verfolgt werden.

Die Frage, welche chemotaktisch wirkenden Faktoren die Wanderung von B-Zellen im Huhn tatsächlich steuern, kann momentan nicht abschließend beantwortet werden. In den nächsten Jahren wird sich vermutlich noch ein ganzes Netzwerk an chemotaktisch

wirksamen Substanzen entschlüsseln lassen, welche die Wanderungen der verschiedenen Leukozyten im Huhn steuern. Weiterführende funktionelle Untersuchungen bezüglich der Rollen von chCXCR4 und chCXCR5 sind aber nötig, um das Migrationsverhalten aviärer B-Zellen besser zu verstehen. Die Grundlagen für solche Studien wurden durch die vorliegende Arbeit geschaffen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13 sowie ihre Rezeptoren CXCR4 und CXCR5 steuern beim Säuger die Migration von B-Zellen und die Entwicklung lymphoider Strukturen. Die B-Zellentwicklung beim Huhn unterscheidet sich stark von der beim Säuger, da weite Teile dieses Prozesses in der Bursa Fabricii ablaufen. Präbursale B-Zellen wandern während der Ontogenese in die Bursa ein, bleiben dort als bursale B-Zellen zur Proliferation und Genkonversion und besiedeln nach Emigration die Peripherie als postbursale B-Zellen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob Hühner-CXCL12 (chCXCL12) und Hühner-CXCL13 (chCXCL13) sowie deren Rezeptoren an dieser Wanderung beteiligt sein können. Durch die Generierung zweier monoklonaler Antikörper gegen chCXCR4 und chCXCR5 war es erstmals möglich, die Expression dieser Chemokinrezeptoren auch auf der Oberfläche von Hühnerleukozyten zu untersuchen. qRT-PCR-Analysen zeigten, dass in der Bursa bereits an ET14 eine hohe Expression von chCXCL12 vorlag. Zu diesem Zeitpunkt wanderten frühe präbursale B-Zellen mit chCXCR4^{med} chCXCR5^{low} Phänotyp vermutlich aus Milz und Knochenmark in die Bursa-Anlage ein. An ET18 exprimierten die bursalen B-Zellen chCXCR4 und auch chCXCR5 bereits auf wesentlich höherem Niveau als noch an ET14. Möglicherweise führt die hohe Expression von chCXCR4 auf bursalen B-Zellen zur Retention dieser Zellen innerhalb des chCXCL12-reichen bursalen Gewebes. Ab diesem Zeitpunkt war parallel mit einem massiven Anstieg der chCXCL13-Expression im bursalen Gewebe eine erhöhte chCXCR5-Expression auf bursalen B-Zellen zu verzeichnen. Die Expression von chCXCR5 auf bursalen B-Zellen blieb nach dem Schlupf auf durchweg hohem Niveau, während sich neben einer chCXCR4^{high} B-Zell-Population eine chCXCR4^{low} B-Zell-Population entwickelte. Zu diesem Zeitpunkt entwickelt sich auch die typische Follikelstruktur mit einer Unterteilung in Mark und Rinde. Eine Subpopulation der chCXCR4^{low} B-Zellen innerhalb dieser gereiften Follikel exprimierte chL12 (auch OV-Antigen), was ein Kennzeichen auswanderungsbereiter bursaler B-Zellen ist. Vermutlich wandern also nur chCXCR4^{low} B-Zellen aus der Bursa aus, da sie verglichen mit chCXCR4^{high} B-Zellen weniger stark durch eine chCXCL12/chCXCR4-Interaktion im Gewebe gehalten werden. Auch die durchweg chL12-exprimierenden B-Zellen im Blut sind chCXCR4^{low}. Transwell-Migrations-Assays bestätigten, dass primäre bursale B-Zellen mit vergleichsweise hoher chCXCR4-Expression eine stärkere spezifische Migration in

Richtung CXCL12 zeigten als periphere B-Zellen, die überwiegend CXCR4^{low} waren. Diese durch die CXCL12/chCXCR4-Interaktion bedingte Migration war mithilfe eines spezifischen CXCR4-Antagonisten, AMD3100, zu inhibieren. Nach der Auswanderung in die Peripherie zeigten die postbursalen B-Zellen keinen einheitlichen Phänotyp. Mithilfe des neu entwickelten monoklonalen anti-chCXCR5-Antikörpers war es erstmal möglich, verschiedene Subpopulationen von postbursalen B-Zellen eindeutig voneinander zu differenzieren. Die meisten dieser Zellen waren zwar chB6^{med} chCXCR4^{low} chCXCR5^{high}. In einigen peripheren lymphatischen Organen waren aber auch postbursale B-Zellen anderen Phänotyps zu finden. Möglicherweise beherbergen diese Populationen in verschiedenen Organen neben follikulären B-Zellen auch Plasmablasten, Plasmazellen sowie Gedächtnis-B-Zellen. Insgesamt weisen diese ersten Untersuchungen darauf hin, dass CXCR4 und CXCR5 auch bei der Migration von B-Zellen beim Huhn eine wichtige Rolle einnehmen.

8 SUMMARY

Characterization of chCXCR4 and chCXCR5 and their function during chicken B cell development

The homeostatic chemokines CXCL12 and CXCL13 and their receptors CXCR4 and CXCR5 control B cell trafficking in mammals. In contrast to mammals where B cells develop in the bone marrow the main part of B cell development in chicken takes place in the bursa of Fabricius and differs in many ways from that in mammals. During ontogeny, prebursal B cells immigrate into the bursa, stay there as bursal B cells to proliferate and undergo gene conversion and emigrate after hatch to colonize the periphery as postbursal B cells. The aim of this study was to characterize the possible involvement of chicken CXCR4 (chCXCR4) and chicken CXCR5 (chCXCR5) and their ligands in chicken B cell migration. The generation of two monoclonal antibodies for chCXCR4 and chCXCR5 enabled us to examine surface expression of these chemokine receptors on chicken leukocytes, for the first time. Early prebursal B cells at ED14 which migrate from spleen and bone marrow to the bursa anlage showed a chCXCR4^{med} chCXCR5^{low} phenotype. At ED18, expression of chCXCR4 and chCXCR5 on bursal B cells was increased as compared to that at ED14. Possibly, high levels of chCXCR4 expression on these cells lead to a retention in the CXCL12 rich bursal tissue. An increase in surface expression of chCXCR5 on bursal B cells on ED18 was paralleled by a massive increase of chCXCL13 mRNA in the bursal tissue. After hatch, expression of chCXCR5 on bursal cells remained high while two bursal B cell subpopulations with different expression levels of CXCR4 emerged: chCXCR4^{high} and chCXCR4^{low}. At this point of time, the typical structure of the bursal follicle with medulla and cortex develops. In these mature follicles, a subpopulation of chCXCR4^{low} B cells shows expression of chL12 (also known as OV-antigen) which is a marker for bursal emigrants. Presumably, only chCXCR4^{low} bursal B cells emigrate as they experience lower retention to the bursal tissue rich in chCXCL12 compared to chCXCR4^{high} bursal B cells. Consistently, chL12⁺ B cells in blood showed low expression levels of chCXCR4. Transwell-migration assays confirmed that primary bursal B cells with high expression of chCXCR4 showed stronger chemotaxis towards CXCL12 compared to chCXCR4^{low} B cells isolated from blood and spleen. This CXCL12/chCXCR4-dependent migration could be inhibited by administration of the specific CXCR4-antagonist

AMD3100. On the basis of their chB6 and chCXCR5 expression, different subpopulations of postbursal B cells could definitely be distinguished in lymphoid tissues. The majority of B cells were chB6^{med}/chCXCR5^{high}, but also small populations with a chB6^{high}/chCXCR5^{high} or chB6^{high}/chCXCR5^{low} phenotype were detectable which might represent plasmablasts, plasma cells or memory B cells and can now further be characterized. Collectively, these observations point to an important role of CXCR4 and CXCR5 in chicken B cell trafficking.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Thomma, B.P., B.P. Cammue, and K. Thevissen, *Plant defensins*. *Planta*, 2002. **216**(2): p. 193-202.
2. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(9): p. 710-720.
3. Imler, J.L. and J.A. Hoffmann, *Toll receptors in innate immunity*. *Trends in cell biology*, 2001. **11**(7): p. 304-311.
4. Rast, J.P., et al., *Genomic insights into the immune system of the sea urchin*. *Science's STKE*, 2006. **314**(5801): p. 952-956.
5. Cooper, M.D. and M.N. Alder, *The evolution of adaptive immune systems*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 815-822.
6. Cooper, M.D., R. DA PETERSON, and R.A. Good, *Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken*. *Nature*, 1965. **205**: p. 143-146.
7. Cooper, M.D., et al., *The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken*. *The Journal of experimental medicine*, 1966. **123**(1): p. 75-102.
8. Tiselius, A. and E.A. Kabat, *Electrophoresis of immune serum*. *Science*, 1938. **87**(2262): p. 416-417.
9. Fagraeus, A., *The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1948. **58**(1): p. 1-13.
10. Froland, S., J. Natvig, and P. Berdal, *Surface-bound immunoglobulin as a marker of B lymphocytes in man*. *Nature: New biology*, 1971. **234**(51): p. 251-252.
11. Porter, R. *The structure of gamma-globulin and antibodies*. 1962.
12. Edelman, G. and J. Gally, *A model for the 7S antibody molecule*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1964. **51**(5): p. 846-853.
13. Brack, C., et al., *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. *Cell*, 1978. **15**(1): p. 1-14.
14. Becker, R.S. and K.L. Knight, *Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits*. *Cell*, 1990. **63**(5): p. 987-997.

15. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annual review of immunology, 1991. **9**(1): p. 219-241.
16. Ford, C., et al., *Cytological identification of radiation-chimaeras*. Nature, 1956. **177**: p.452-454.
17. Moore, M.A.S. and D. Metcalf, *Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of In Vivo and In Vitro Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo**. British journal of haematology, 1970. **18**(3): p. 279-296.
18. Palis, J., K.E. McGrath, and P.D. Kingsley, *Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants*. Blood, 1995. **86**(1): p. 156-163.
19. Medvinsky, A. and E. Dzierzak, *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region*. Cell, 1996. **86**(6): p. 897-906.
20. Taoudi, S., et al., *Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+ CD45+ pre-definitive HSCs*. Cell stem cell, 2008. **3**(1): p. 99-108.
21. Mikkola, H.K.A., et al., *Placenta as a site for hematopoietic stem cell development*. Experimental hematology, 2005. **33**(9): p. 1048-1054.
22. Rhodes, K.E., et al., *The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation*. Cell stem cell, 2008. **2**(3): p. 252-263.
23. Ema, H. and H. Nakauchi, *Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo*. Blood, 2000. **95**(7): p. 2284-2288.
24. Matsumoto, K., et al., *Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells*. PLoS ONE, 2009. **4**(3): p. e4820.
25. Christensen, J.L., et al., *Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells*. PLoS biology, 2004. **2**(3): p. e75.
26. Smith, L.G., I.L. Weissman, and S. Heimfeld, *Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(7): p. 2788-2792.
27. Hirao, A., F. Arai, and T. Suda, *Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2004. **3**(12): p. 1481-1483.
28. Eliasson, P. and J.I. Jönsson, *The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be*. Journal of cellular physiology, 2010. **222**(1): p. 17-22.

29. Adams, G.B., et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. *Nature*, 2005. **439**(7076): p. 599-603.
30. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 324-336.
31. Hardy, R.R., P.W. Kincade, and K. Dorshkind, *The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage*. *Immunity*, 2007. **26**(6): p. 703-714.
32. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. *The Journal of experimental medicine*, 1994. **180**(5): p. 1955-1960.
33. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. *Cell*, 2008. **135**(6): p. 1118-1129.
34. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. *Nature*, 2006. **441**(7097): p. 1068-1074.
35. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. *Science*, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
36. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. *Immunity*, 1994. **1**(8): p. 661-673.
37. Papathanasiou, P., et al., *Evaluation of the Long-Term Reconstituting Subset of Hematopoietic Stem Cells with CD150*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2498-2508.
38. Yang, L., et al., *Identification of Lin⁻Sca1⁺ kit⁺ CD34⁺ Flt3⁻ short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2717-2723.
39. Harman, B.C., et al., *T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 886-892.
40. Hardy, R., et al., *Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow*. *The Journal of experimental medicine*, 1991. **173**(5): p. 1213-1225.
41. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. *Immunity*, 1999. **10**(4): p. 463-471.
42. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe, *Transitional B cells: step by step towards immune competence*. *Trends in immunology*, 2003. **24**(6): p. 342-348.

43. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu. Rev. Immunol., 2005. **23**: p. 161-196.
44. Tew, J.G., et al., *Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells*. Immunological reviews, 2006. **156**(1): p. 39-52.
45. Förster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
46. Garside, P., et al., *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node*. Science, 1998. **281**(5373): p. 96-99.
47. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-99.
48. MacLennan, I.C.M., *Germinal centers*. Annual review of immunology, 1994. **12**(1): p. 117-139.
49. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, *Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation*. Immunologic research, 2001. **24**(2): p. 97-109.
50. Spolski, R. and W. Leonard, *IL-21 and T follicular helper cells*. International immunology, 2010. **22**(1): p. 7-12.
51. Weiss, U., R. Zobebelein, and K. Rajewsky, *Accumulation of somatic mutants in the B cell compartment after primary immunization with a T cell-dependent antigen*. European journal of immunology, 2005. **22**(2): p. 511-517.
52. Feuillard, J., et al., *Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching*. International immunology, 1995. **7**(1): p. 121-130.
53. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunological reviews, 2010. **237**(1): p. 140-159.
54. Liu, Y.J., et al., *Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2*. Immunity, 1995. **2**(3): p. 239-248.
55. 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*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(13): p. 4771-4780.
56. Silacci, P., et al., *Developmental extinction of major histocompatibility complex class II gene expression in plasmacytes is mediated by silencing of the transactivator gene CIITA*. The Journal of experimental medicine, 1994. **180**(4): p. 1329-1336.

57. Shaffer, A., et al., *XBPI, 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.
58. Medina, F., et al., *The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression*. *Blood*, 2002. **99**(6): p. 2154-2161.
59. LeBien, T.W., *Fates of human B-cell precursors*. *Blood*, 2000. **96**(1): p. 9-23.
60. Adelman, H.B., *The embryological treatises of Hieronymus Fabricius of Aquapendente: The formation of the egg and of the chick De formatione ovi et pulli The formed fetus De formato foetu*. Vol. 1. 1942: Cornell University Press.
61. Jolly, J., *La bourse de Fabricius et les organes lympho-epitheliaux* 1914: Archives d'anatomie microscopique.
62. Jolly, J., *L'involution physiologique de la bourse de Fabricius et ses relations avec l'apparition de la maturite sexuelle*. *CR Soc. Biol*, 1913. **75**: p. 638-648.
63. Ratcliffe, M.J.H., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006. **30**(1-2): p. 101-118.
64. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production*. *Poultry science*, 1956. **35**(1): p. 224-225.
65. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. *Cell*, 1985. **40**(2): p. 283-291.
66. Mansikka, A., et al., *Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(23): p. 9416-9420.
67. Jalkanen, S., et al., *Defect in the generation of light-chain diversity in bursectomized chickens*. *Nature*, 1984. **311**(5981): p. 69-71.
68. Houssaint, E., E. Diez, and J. Pink, *Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen*. *Immunology*, 1987. **62**(3): p. 463-470.
69. Paramithiotis, E., K.A. Jacobsen, and M. Ratcliffe, *Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius*. *The Journal of experimental medicine*, 1995. **181**(1): p. 105-113.
70. Masteller, E.L., et al., *Expression of sialyl Lewis (x) and Lewis (x) defines distinct stages of chicken B cell maturation*. *The Journal of Immunology*, 1995. **155**(12): p. 5550-5556.

71. Paramithiotis, E. and J. Michael, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius*. European journal of immunology, 1994. **24**(2): p. 458-463.
72. Glick, B., *Normal growth of the bursa of Fabricius in chickens*. Poultry science, 1956. **35**(4): p. 843-851.
73. Ciriaco, E., et al., *Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. Microscopy research and technique, 2003. **62**(6): p. 482-487.
74. Glick, B., *The influence of dipping eggs in male hormone solutions on lymphatic tissue and antibody response of chickens*. Endocrinology, 1961. **69**: p. 984-985.
75. Glick, B., *The effect of penicillin and cortisone on the bursa of Fabricius*. Poultry science, 1957. **36**(5): p. 1038-1041.
76. Olah, I., Vervelde, L., *Structure of the avian lymphoid system*. Avian immunology Davidson F., Kaspers B., Schat KA, 2008: p. 13-50.
77. Olah, I. and B. Glick, *Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1978. **34**(12): p. 1642-1643.
78. Olah, I., et al., *Light and electron microscope structure of secretory cells in the medulla of bursal follicles of normal and cyclophosphamide treated chickens*. Developmental & Comparative Immunology, 1979. **3**: p. 101-115.
79. Olah, I. and B. Glick, *The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius*. Poultry science, 1978. **57**(5): p. 1445-1450.
80. Bockman, D.E. and M.D. Cooper, *Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study*. American Journal of Anatomy, 1973. **136**(4): p. 455-477.
81. Schaffner, T., et al., *The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content*. Cellular immunology, 1974. **13**(2): p. 304-312.
82. Naukkarinen, A. and T.E. Sorvari, *Involution of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa*. Journal of leukocyte biology, 1984. **35**(3): p. 281-290.
83. Romppanen, T., et al., *Thymus-dependent immune functions in chickens bursectomized with colchicine applied to the anal lips*. Developmental & Comparative Immunology, 1983. **7**(3): p. 525-534.
84. Nagy, N., et al., *Origin of the bursal secretory dendritic cell*. Anatomy and embryology, 2004. **208**(2): p. 97-107.

85. Ekino, S., et al., *Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci, 1980. **58**: p. 289-296.
86. Houssaint, E., A. Toraño, and J. Ivanyi, *Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius*. European journal of immunology, 1983. **13**(7): p. 590-595.
87. Weber, W. and L. Foglia, *Evidence for the presence of precursor B cells in normal and in hormonally bursectomized chick embryos*. Cellular immunology, 1980. **52**(1): p. 84-94.
88. Pink, J.R., O. Vainio, and A.M. Rünbeek, *Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius*. European journal of immunology, 1985. **15**(1): p. 83-87.
89. Sinha, R.K., C. Alexander, and R.G. Mage, *Regulated expression of peripheral node addressin-positive high endothelial venules controls seeding of B lymphocytes into developing neonatal rabbit appendix*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006. **110**(1): p. 97-108.
90. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Somatic Diversification of the Chicken*. Advances in immunology, 1990. **48**: p. 41-67.
91. Korte, J., Fröhlich, T., Kohn, M., Kaspers B., Arnold G.J., Härtle S. , *2-D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development*. Proteomics, 2012. **Accepted**.
92. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. European journal of immunology, 1973. **3**(9): p. 585-595.
93. McCormack, W., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes & development, 1989. **3**(6): p. 838-847.
94. Ratcliffe, M.J.H., et al., *Avian B cell precursors: Surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. European journal of immunology, 1986. **16**(2): p. 129-133.
95. 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*. European journal of immunology, 1991. **21**(8): p. 1951-1958.
96. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio, *Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo*. The Journal of experimental medicine, 1991. **174**(2): p. 397-406.
97. Lampisuo, M., et al., *Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius*. Scandinavian journal of immunology, 1998. **47**(3): p. 223-228.

98. Paramithiotis, E., *Life and death in chicken B cell development*, 1994, McGill University.
99. Paramithiotis, E. and M. Ratcliffe, *Evidence for phenotypic heterogeneity among B cells emigrating from the bursa of Fabricius: a reflection of functional diversity?* Current topics in microbiology and immunology, 1996. **212**: p. 29-36.
100. Paramithiotis, E. and M.J.H. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. European journal of immunology, 1993. **23**(1): p. 96-102.
101. Durkin, H., G. Theis, and G. Thorbecke, *Bursa of Fabricius as site of origin of germinal centre cells*. Nature, 1972. **235**(56): p. 118-119.
102. Hainke, S., *Charakterisierung der germinalen Zentrumsreaktion beim Huhn und deren Beeinflussung durch das Zytokin chBAFF*, 2011, Ludwig-Maximilians-Universität München.
103. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Developmental & Comparative Immunology, 2003. **27**(2): p. 159-166.
104. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(9): p. 4232-4241.
105. Jeurissen, S., *The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response*. Immunology, 1993. **80**(1): p. 29-33.
106. Jeurissen, S.H.M., et al., *Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens*. Cell and tissue research, 1989. **258**(1): p. 119-124.
107. Hudson, L., *Immunoglobulin-bearing lymphocytes of the chicken. I. Heavy chain immunoglobulin commitment and organ distribution*. European journal of immunology, 1975. **5**(10): p. 694-698.
108. Poznansky, M.C., et al., *Active movement of T cells away from a chemokine*. Nature medicine, 2000. **6**(5): p. 543-548.
109. Witt, D.P. and A.D. Lander, *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. Current Biology, 1994. **4**(5): p. 394-400.
110. Proudfoot, A.E.I., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(4): p. 1885-1890.
111. Kohrgruber, N., et al., *Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(11): p. 6592-6602.

112. Harvath, L., *Neutrophil chemotactic factors*. Exs, 1991. **59**: p. 35-52.
113. Larsen, G.L. and P.M. Henson, *Mediators of inflammation*. Annual review of immunology, 1983. **1**(1): p. 335-359.
114. Hirai, H., et al., *Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(2): p. 255-261.
115. Luster, A.D. and A.M. Tager, *T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(9): p. 711-724.
116. Hannun, Y.A., C. Luberto, and K.M. Argraves, *Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling*. Biochemistry, 2001. **40**(16): p. 4893-4903.
117. Goetzl, E.J. and H. Rosen, *Regulation of immunity by lysosphingolipids and their G protein-coupled receptors*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**: p. 1531-1537.
118. Goetzl, E.J. and M.H. Gräler, *Sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor: trophic support and functional regulation of T lymphocytes*. Journal of leukocyte biology, 2004. **76**(1): p. 30-35.
119. Quinn, M.T., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(8): p. 2805-2809.
120. Yang, D., et al., *β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6*. Science, 1999. **286**(5439): p. 525-528.
121. Chertov, O., et al., *Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(6): p. 2935-2940.
122. Gerard, C. and N.P. Gerard, *C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor*. Annual review of immunology, 1994. **12**(1): p. 775-808.
123. Boehme, S.A., et al., *Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(6): p. 3599-3603.
124. Center, D. and W. Cruikshank, *Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells*. The Journal of Immunology, 1982. **128**(6): p. 2563-2568.
125. Okumura, N., et al., *Chemotactic and chemokinetic activities of stem cell factor on murine hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4100-4108.

126. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2002. **42**(1): p. 469-499.
127. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines—CXC and CC Chemokines*. Advances in immunology, 1993. **55**: p. 97-179.
128. Valenzuela-Fernández, A., et al., *Leukocyte elastase negatively regulates stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(18): p. 15677-15689.
129. Kollet, O., et al., *Osteoclasts Are Involved in Stem Cell Mobilization: Cleavage of SDF-1 by Cathepsin K*, 2004, Am Soc Hematology. p. 1291-1291.
130. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(47): p. 43503-43508.
131. Davis, D.A., et al., *Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1 α in the circulation*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4561-4568.
132. Schulte, A., et al., *Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by α - and γ -secretases*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **358**(1): p. 233-240.
133. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity*. Immunity, 2000. **12**: p. 121-127.
134. Kim, C.H., *The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond*. Current opinion in hematology, 2005. **12**(4): p. 298-304.
135. Kelner, G.S., et al., *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine*. Science, 1994. **266**(5189): p. 1395-1399.
136. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**: p. 640-644.
137. Hebert, C.A., R. Vitangcol, and J.B. Baker, *Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(28): p. 18989-18994.
138. Clark-Lewis, I., et al., *Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(8): p. 3574-3577.
139. Sallusto, F., *The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune response*. Experimental Dermatology, 2002. **11**(5): p. 476-478.

140. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. Current Opinion in Immunology, 2000. **12**(3): p. 336-341.
141. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2098-2102.
142. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu. Rev. Immunol., 2007. **25**: p. 787-820.
143. Rajarathnam, K., et al., *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8*. Science, 1994. **264**(5155): p. 90-92.
144. Campanella, G.S.V., et al., *Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and in vivo activity*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(10): p. 6991-6998.
145. Gouwy, M., et al., *Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration*. Journal of leukocyte biology, 2004. **76**(1): p. 185-194.
146. Milligan, G. and N.J. Smith, *Allosteric modulation of heterodimeric G-protein-coupled receptors*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(12): p. 615-620.
147. Borroni, E.M., et al., *Chemoattractant receptors and leukocyte recruitment: more than cell migration*. Science's STKE, 2009. **2**(59): p. pe10.
148. Spangrude, G., et al., *Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin*. The Journal of Immunology, 1985. **135**(6): p. 4135-4143.
149. Blanpain, C., et al., *The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(7): p. 5179-5187.
150. Kehrl, J.H., *Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration*. Immunologic research, 2006. **34**(3): p. 211-227.
151. Neptune, E.R., T. Iiri, and H.R. Bourne, *Gai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(5): p. 2824-2828.
152. Javitch, J.A., *The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors*. Molecular pharmacology, 2004. **66**(5): p. 1077-1082.
153. Terrillon, S. and M. Bouvier, *Roles of G-protein-coupled receptor dimerization*. EMBO reports, 2004. **5**(1): p. 30-34.
154. Gurevich, V.V. and E.V. Gurevich, *GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds*. Trends in neurosciences, 2008. **31**(2): p. 74-81.

155. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. The EMBO journal, 1997. **16**(23): p. 6996-7007.
156. Jiao, X., et al., *Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(13): p. 5752-5762.
157. Baker, A., et al., *CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(48): p. 35163-35168.
158. Staudinger, R. and J.C. Bandres, *Solubilization of the chemokine receptor CXCR4*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **274**(1): p. 153-156.
159. Palmesino, E., et al., *Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells*. Immunobiology, 2006. **211**(5): p. 377-389.
160. Nibbs, R., G. Graham, and A. Rot. *Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6*. Semin Immunol. 2003. **15**: 287-294.
161. Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati, *Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(12): p. 907-918.
162. Mantovani, A., et al., *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. Trends in immunology, 2001. **22**(6): p. 328-336.
163. Bonecchi, R., et al., *Chemokine Decoy Receptors: Structure–Function and Biological Properties*. The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology, 2010: p. 15-36.
164. Fra, A.M., et al., *Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(5): p. 2279-2282.
165. Weber, M., et al., *The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines*. Science's STKE, 2004. **15**(5): p. 2492-2508.
166. Di Liberto, D., et al., *Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis infection*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(9): p. 2075-2084.

167. Gosling, J., et al., *Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(6): p. 2851-2856.
168. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6085-6093.
169. Mahabaleshwar, H., B. Boldajipour, and E. Raz, *Killing the messenger: The role of CXCR7 in regulating primordial germ cell migration*. Cell adhesion & migration, 2008. **2**(2): p. 69-70.
170. Miller, L., et al., *The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy*. The New England journal of medicine, 1976. **295**(6): p. 302-304.
171. Darbonne, W., et al., *Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin*. Journal of Clinical Investigation, 1991. **88**(4): p. 1362-1369.
172. Gardner, L., et al., *The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **321**(2): p. 306-312.
173. Kashiwazaki, M., et al., *A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions*. International immunology, 2003. **15**(10): p. 1219-1227.
174. Middleton, J., et al., *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell, 1997. **91**(3): p. 385-395.
175. Druey, K.M., et al., *Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family*. Nature, 1996. **379**: p. 742-746
176. Moratz, C., et al., *Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1^{-/-} mice*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(13): p. 5767-5775.
177. Shi, G.X., et al., *RGS13 regulates germinal center B lymphocytes responsiveness to CXC chemokine ligand (CXCL) 12 and CXCL13*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(5): p. 2507-2515.
178. Lippert, E., et al., *Role of regulator of G protein signaling 16 in inflammation-induced T lymphocyte migration and activation*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(3): p. 1542-1555.
179. Xie, S., et al., *IL-17 activates the canonical NF- κ B signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16*. The Journal of Immunology, 2010. **184**(5): p. 2289-2296.

180. Hannigan, M., et al., *Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase γ show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(6): p. 3603-3608.
181. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. nature cell biology, 2007. **9**(10): p. 1110-1121.
182. Russell, S., *How polarity shapes the destiny of T cells*. Journal of cell science, 2008. **121**(2): p. 131-136.
183. Real, E., et al., *Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(9): p. 5649-5652.
184. Knall, C. and G.L. Johnson, *G-protein regulatory pathways: Rocketing into the twenty-first century*. Journal of Cellular Biochemistry, 1998. **72**(S30-31): p. 137-146.
185. Marinissen, M.J. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*. Trends in pharmacological sciences, 2001. **22**(7): p. 368-376.
186. Morris, A.J. and C.C. Malbon, *Physiological regulation of G protein-linked signaling*. Physiological reviews, 1999. **79**(4): p. 1373-1430.
187. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-689.
188. Hyduk, S.J., et al., *Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for $\alpha 4\beta 1$ integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants*. Blood, 2007. **109**(1): p. 176-184.
189. Crittenden, J.R., et al., *CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation*. Nature medicine, 2004. **10**(9): p. 982-986.
190. Pasvolsky, R., et al., *A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(7): p. 1571-1582.
191. Tadokoro, S., et al., *Talin Binding to Integrin β Tails: A Final Common Step in Integrin Activation*. Science, 2003. **302**(5642): p. 103-106.
192. Krupnick, J.G. and J.L. Benovic, *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1998. **38**(1): p. 289-319.
193. Stoffel, R.H., J. Pitcher, and R. Lefkowitz, *Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates*. Journal of Membrane Biology, 1997. **157**(1): p. 1-8.

194. Ferguson, S.S.G., et al., *Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization*. Science, 1996. **271**(5247): p. 363-366.
195. Zhang, J., et al., *Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(16): p. 10999-11006.
196. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-638.
197. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 591-594.
198. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(16): p. 9448-9453.
199. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. Science, 1993. **261**(5121): p. 600-603.
200. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(6): p. 2305-2309.
201. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: p. 174-179.
202. Campana, L., et al., *Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells*. Journal of leukocyte biology, 2009. **86**(3): p. 609-615.
203. Kahn, J., et al., *Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation*. Blood, 2004. **103**(8): p. 2942-2949.
204. Campbell, J.J., J. Pan, and E.C. Butcher, *Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation*. The Journal of Immunology, 1999. **163**(5): p. 2353-2357.
205. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **82**: p. 829-833.
206. Oberlin, E. and F. Ali Amara, *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**: p. 833-835.
207. Loetscher, M., et al., *Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(1): p. 232-237.

208. Miller, R.J., G. Banisadr, and B.J. Bhattacharyya, *CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development*. Journal of neuroimmunology, 2008. **198**(1-2): p. 31-38.
209. McGrath, K.E., et al., *Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4*. Developmental biology, 1999. **213**(2): p. 442-456.
210. Klein, R.S. and J.B. Rubin, *Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity*. Trends in immunology, 2004. **25**(6): p. 306-314.
211. Furusato, B., et al., *CXCR4 and cancer*. Pathology international, 2010. **60**(7): p. 497-505.
212. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(42): p. 35760-35766.
213. Thelen, M. and S. Thelen, *CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?* Journal of neuroimmunology, 2008. **198**(1-2): p. 9-13.
214. Staller, P., et al., *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel–Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 307-311.
215. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nature medicine, 2004. **10**(8): p. 858-864.
216. Driessen, R.L., H.M. Johnston, and S.K. Nilsson, *Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region*. Experimental hematology, 2003. **31**(12): p. 1284-1291.
217. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR 4*. Nature immunology, 2002. **3**(7): p. 687-694.
218. Franitza, S., et al., *TGF- β 1 enhances SDF-1 α -induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules*. European journal of immunology, 2002. **32**(1): p. 193-202.
219. Jourdan, P., et al., *Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(2): p. 716-724.
220. Guinamard, R., et al., *B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell–derived factor (SDF)-1 α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(9): p. 1461-1466.

221. Abbal, C., et al., *TCR-mediated activation of allergen-specific CD45RO+ memory T lymphocytes results in down-regulation of cell-surface CXCR4 expression and a strongly reduced capacity to migrate in response to stromal cell-derived factor-1*. International immunology, 1999. **11**(9): p. 1451-1462.
222. Kim, H.K., et al., *G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells*. Blood, 2006. **108**(3): p. 812-820.
223. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(8): p. 1307-1318.
224. Tamamura, H., et al., *A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **253**(3): p. 877-882.
225. Dobner, T., et al., *Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma*. European journal of immunology, 1992. **22**(11): p. 2795-2799.
226. Barella, L., et al., *Sequence variation of a novel heptahelical leucocyte receptor through alternative transcript formation*. Biochemical Journal, 1995. **309**(Pt 3): p. 773-779.
227. Legler, D.F., et al., *B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(4): p. 655-660.
228. Gunn, M.D., et al., *A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 799-803.
229. Förster, 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. 1037-1047.
230. Voigt, I., et al., *CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone*. European journal of immunology, 2000. **30**(2): p. 560-567.
231. Brandes, M., et al., *Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines*. International immunology, 2000. **12**(9): p. 1285-1292.
232. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-314.
233. Luther, S.A., K.M. Ansel, and J.G. Cyster, *Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor α , and CCR7 ligands in lymph node development*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(9): p. 1191-1198.

234. Ohl, L., et al., *Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(9): p. 1199-1204.
235. Honda, K., et al., *Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(5): p. 621-630.
236. Ngo, V.N., et al., *Lymphotoxin α/β and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(2): p. 403-412.
237. Cupedo, T. and R.E. Mebius, *Cellular interactions in lymph node development*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(1): p. 21-25.
238. Röhlich, K., *Beitrag zur Cytologie der Keimzentren der Lymphknoten*. Z. Mikrosk. Anat. Forsch, 1930. **20**: p. 287-297.
239. Allen, C.D.C., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nature immunology, 2004. **5**(9): p. 943-952.
240. Schaerli, P., et al., *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(11): p. 1553-1562.
241. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(11): p. 1545-1552.
242. Chevalier, N., et al., *CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(10): p. 5556-5568.
243. Hardtke, S., L. Ohl, and R. Förster, *Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help*. Blood, 2005. **106**(6): p. 1924-1931.
244. Graeler, M. and E.J. GOETZL, *Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells*. The FASEB journal, 2002. **16**(14): p. 1874-1878.
245. Cinamon, G., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone*. Nature immunology, 2004. **5**(7): p. 713-720.
246. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(1): p. 45-56.

247. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. Journal of interferon & cytokine research, 2005. **25**(8): p. 467-484.
248. Hughes, S. and N. Bumstead, *The gene encoding the chicken chemokine K60 maps to chromosome 4*. Animal Genetics, 2000. **31**(6): p. 418-419.
249. Martins-Green, M. and J.E. Feugate, *The 9E3/CEF4 gene product is a chemotactic and angiogenic factor that can initiate the wound-healing cascade in vivo*. Cytokine, 1998. **10**(7): p. 522-535.
250. Kaiser, P., S. Hughes, and N. Bumstead, *The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster*. Immunogenetics, 1999. **49**(7): p. 673-684.
251. Liang, T.S., et al., *Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4*. Journal of leukocyte biology, 2001. **69**(2): p. 297-305.
252. Yusuf, F., et al., *Expression of chemokine receptor CXCR4 during chick embryo development*. Anatomy and embryology, 2005. **210**(1): p. 35-41.
253. Read, L.R., et al., *Cloning and characterization of chicken stromal cell derived factor-1*. Developmental & Comparative Immunology, 2005. **29**(2): p. 143-152.
254. Vasyutina, E., et al., *CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells*. Genes & development, 2005. **19**(18): p. 2187-2198.
255. Yusuf, F., et al., *Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos*. Developmental Dynamics, 2006. **235**(11): p. 3007-3015.
256. Rehim, R., et al., *A novel role of CXCR4 and SDF-1 during migration of cloacal muscle precursors*. Developmental Dynamics, 2010. **239**(6): p. 1622-1631.
257. Stebler, J., et al., *Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12*. Developmental biology, 2004. **272**(2): p. 351-361.
258. Graham, F., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology, 1977. **36**(1): p. 59-72.
259. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Molecular and cellular biology, 1987. **7**(1): p. 379-387.
260. Buerstedde, J., et al., *Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line*. The EMBO journal, 1990. **9**(3): p. 921-927.

261. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon- γ* . Journal of immunological methods, 2003. **274**(1): p. 229-232.
262. 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. 375-390.
263. Shulman, M., C. Wilde, and G. Köhler, *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. Nature, 1978. **276**: p. 269-270.
264. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture*. Developmental & Comparative Immunology, 2008. **32**(9): p. 1015-1026.
265. Schmieder, S., *Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten*, 2011, Ludwig-Maximilians-Universität München.
266. Ferguson, S.S.G., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. Pharmacological reviews, 2001. **53**(1): p. 1-24.
267. Ratcliffe, M.J.H., *B CELLS, THE BURSA OF FABRICIUS AND THE GENERATION OF ANTIBODY REPERTOIRES*. Avian immunology Davidson F., Kaspers B., Schat KA, 2008. **67-89**.
268. Germain, R.N., *Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology*. Nature immunology, 2012. **13**(10): p. 902-906.
269. Katakai, T., et al., *Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 6189-6200.
270. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Current Opinion in Immunology, 2008. **20**(2): p. 149-157.
271. Rottach, E.M., *Generierung neuer Marker für Hühner B-Zellen*, 2012, Ludwig-Maximilians-Universität München.
272. Chilosi, M., et al., *CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies*. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 1999. **12**(12): p. 1101-1106.
273. Salzer, U., S. Jennings, and B. Grimbacher, *To switch or not to switch—the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation*. European journal of immunology, 2007. **37**(1): p. 17-20.

-
274. Benson, M.J., et al., *Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(6): p. 3655-3659.
275. Kallies, A., et al., *Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 555-566.
276. Frasca, D., et al., *Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(8): p. 5283-5290.
277. Colonna-Romano, G., et al., *B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression*. Mechanisms of ageing and development, 2003. **124**(4): p. 389-393.
278. Kim, C.H., et al., *Subspecialization of Cxcr5+ T Cells*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(12): p. 1373-1382.

10 ANHANG

A verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

- 1 Applichem, Darmstadt
- 2 Biochrom, Berlin
- 3 Rotexmedica, Trittau
- 4 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 5 Bio & SELL e.K., Feucht
- 6 freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Thomas Göbel, Institut für Tierphysiologie, LMU München
- 7 CLN GmbH, Freising
- 8 AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
- 9 Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
- 10 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- 11 Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
- 12 Fermentas GmbH, St- Leon-Rot
- 13 Promega Corp., Mannheim
- 14 MWG, Ebersberg
- 15 Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
- 16 freundlicherweise von Dr. J. Young, Institute of Animal Health, Compton/UK zur Verfügung gestellt
- 17 GeneArt AG, Regensburg
- 18 Roche, Mannheim
- 19 Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
- 20 Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
- 21 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market/UK
- 22 ImmunoTools GmbH, Friesoythe
- 23 Corning Incorporated, Corning, NY/USA
- 24 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- 25 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
- 26 VWR International GmbH, Darmstadt
- 27 Brand, Wertheim
- 28 LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim
- 29 Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

B Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gegenstand	Modellname	Hersteller
Bakterienbrutschrank	Mini Inkubator	Labnet International. Inc., Woodbridge, USA
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Applied Biosciences, Darmstadt
Brüter (Stall)	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BioLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
FACS I	BD FACSCantoII mit BD FACS Loader	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS II	BD FACSCantoII mit BD High Throughput Sampler	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gel Dokumentation	Image Quant 300 Software: Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Mini-Sub®-cell GT	Bio-Rad, München
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen
Kryotom	Kryostat HM500OM	Mikrom International GmbH, Walldorf
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Mikroskop	Leica DMIL Kamera: DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikrowelle S2	MS1987U	LG Electronics, Ratingen
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
UV-Bildschirm zur Gelpräparation	TFP-20.L	Spicker KaDie, Schwandorf
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

11 DANKSAGUNG

Großer Dank gilt Dr. Sonja Härtle und Professor Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und vor allem für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation. Beide waren bei technischen sowie organisatorischen Fragestellungen stets erreichbare Ansprechpartner, trugen durch zahlreiche ausgiebige und konstruktive Diskussionen entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit bei und vermittelten mir eine große Freude und Motivation am wissenschaftlichen Arbeiten.

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

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie und besonders jenen der AG Kaspers möchte ich mich für das gute Arbeitsklima sowie jegliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei Marina Kohn und Beatrice Schärer bedanke ich mich ganz besonders für die unermüdliche Unterstützung, die bei den tagelangen Screenings während der Generierung der monoklonalen Antikörper nötig war. Marina Kohn möchte ich auch für Herstellung der histologischen Präparate danken. Ingrid Riehl danke ich für ihre große Hilfe beim Aufreinigen der Antikörper.

Bei Dr. Stefan Schmieder, Dr. Benjamin Schusser und Dr. Susanne Schwarz möchte ich mich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitsmethoden bedanken.

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

Auch Frau Crass und Frau Summer möchte ich für die Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Belangen danken.

Ein großer Dank gilt auch der gesamten Rechnerbetriebsgruppe, deren Mitarbeiter bei EDV-Problemen immer zur Stelle waren.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Mitdoktoranden Susanne Röhl, Eva-Maria Rottach, Julia Schermuly und Melanie Reger für ihre große Hilfsbereitschaft und viele erheiternde Momente innerhalb und außerhalb des Büros aussprechen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums und auch während meiner Dissertation immer unterstützt hat.