

Aus dem Institut für Immunologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Thomas Brocker

**Untersuchungen zum T-Zell-Priming durch dendritische Zellen
für die B-Zell-Hilfe**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

.....
Valentin Josef Aebischer
.....

aus

.....
Melbourne, Australien
.....

Jahr

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. R. Obst
Prof. Dr. S. Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Mocikat

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -----

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2020

1. Erklärungen

1.1 Eidesstattliche Versicherung

Aebischer, Valentin Josef

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zum T-Zell-Priming durch dendritische Zellen für die B-Zell-Hilfe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Tübingen, 24.10.2020

Valentin Aebischer

Ort, Datum

Valentin Josef Aebischer

2. Inhaltsverzeichnis

1. ERKLÄRUNG	3
1.1 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	3
2. INHALTSVERZEICHNIS.....	5
3. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
4. TABELLENVERZEICHNIS	8
5. ABKÜRZUNGEN	9
6. EINLEITUNG	12
6.1 DEFINITION UND MEILENSTEINE IN DER GESCHICHTE DER IMMUNOLOGIE	12
6.2 KOMPONENTEN DES IMMUNSYSTEMS.....	13
6.3 ANGEBORENES IMMUNSYSTEM	13
6.4 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM	14
6.5 MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE IMMUNOLOGIE: DIE ANATOMIE SEKUNDÄR LYMPHATISCHER ORGANE	14
6.6 ABLAUF EINER PHYSIOLOGISCHEN ADAPTIVEN IMMUNANTWORT	16
6.7 CD4 ⁺ T-HELPER-ZELLEN	17
6.8 FOLLIKULÄRE HELFER-T-ZELLEN (T _{FH})	18
6.9 DENDRITISCHE ZELLEN UND IHRE INTERAKTION MIT T _{FH} -ZELLEN	21
6.10 INTERAKTION VON T _{FH} - UND B-ZELLEN.....	21
6.11 EXTRA-FOLLIKULÄRE UND FOLLIKULÄRE IMMUNANTWORTEN	24
6.12 ZIEL DER ARBEIT	24
7. MATERIALIEN UND METHODEN	26
7.1 MÄUSE.....	26
7.1.1 AND.....	26
7.1.2 IiMCC	26
7.1.3 IiMCCxSW	27
7.1.4 Ii-rTAXTIM	27
7.1.5 C57BL/6	28
7.1.6 B10.BR	28
7.2 GERÄTE	28
7.3 SOFTWARE	30
7.4 VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE	30
7.5 ANTIKÖRPER UND ZELLFARBSTOFFE	31
7.6 CHEMIKALIEN	33
7.7 LÖSUNGEN UND PUFFER	34
7.8 ZELLEN	36
7.9 OLIGONUKLEOTIDE	36
7.10 GENOTYPISIERUNG.....	36
7.10.1 Typisierung	36
7.10.2 Vorbereitung und DNA-Isolierung.....	37
7.10.3 PCR.....	37
7.10.4 PCR-Programm	38
7.10.5 Agarose-Gelelektrophorese	38
7.11 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	39
7.11.1 Zellpräparation	39
7.11.2 Durchflusszytometrie Grundlagen	41
7.11.3 Durchflusszytometrische Analyse	44
7.12 MAGNETISCHE ZELLSORTIERUNG (MAGNETIC CELL SORTING = MACS)	45

7.12.1 B-Zell Aufreinigung	46
7.12.2 CD4 ⁺ T-Zell Aufreinigung.....	46
7.13 PROTEINKONJUGATION AN SRBC UND MRBC	47
7.14 ADOPTIVER ZELLTRANSFER	47
7.15 DOXYZYKLINGABE	48
8. ERGEBNISSE	49
8.1 TYPISIERUNGEN.....	49
8.2 CHARAKTERISIERUNG VON ZELLEN VOR TRANSFER.....	50
8.3 DURCHFLUSSZYTOTRISCHE IDENTIFIZIERUNG TRANSFERIERTER ZELLEN.....	51
8.4 FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN TRANSIENTER VERSUS PERMANENTER ANTIGENPRÄSENTATION	52
8.5 EXPRESSION VON KEIMZENTRUMSSPEZIFISCHEN OBERFLÄCHENMARKERN NACH SRBC-IMMUNISIERUNG	55
8.6 DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN VON AND-T-ZELLEN UND IIMCC-B-ZELLEN NACH TRANSIENTER UND PERMANENTER ANTIGENPRÄSENTATION AUF DENDRITISCHEN ZELLEN	57
8.7 EINFLUSS VON ANTIGENSPEZIFISCHER STIMULATION AUF DIE EXPRESSION VON CD90.1 AUF T-ZELLEN	59
8.8 EINFLUSS DER DURCH DEN ADOPTIVEN ZELLTRANSFER ERHÖHTEN VORLÄUFERFREQUENZ AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION	60
8.9 EINFLUSS VERSCHIEDENER ANTIGENSPEZIFISCHER B-ZELL-REZEPTOR-STIMULATIONEN AUF DIE B-ZELL-PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG	62
8.10 EINFLUSS DES B-ZELL-REZEPTOR-SIGNALS AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION BEI TRANSIENTER UND PERMANENTER ANTIGENPRÄSENTATION AUF DENDRITISCHEN ZELLEN	64
8.11 EINFLUSS VERLÄNGERTER TRANSIENTER ANTIGENPRÄSENTATION DURCH DENDRITISCHE ZELLEN AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION	67
8.12 BEGINN DER T-ZELL-ABHÄNGIGEN B-ZELL-PROLIFERATION	69
8.13 SYSTEMVERGLEICHENDE ANALYSE DES ANTIKÖRPERKLASSENWECHSELS	70
9. DISKUSSION	73
9.1 BEDEUTUNG DER DAUER DER ANTIGENPRÄSENTATION FÜR DIE T _{fh} -ZELL-DIFFERENZIERUNG	73
9.2 BEDEUTUNG DER ANTIGEN-PRÄSENTIERENDEN ZELLE FÜR DIE T _{fh} -ZELL-DIFFERENZIERUNG	74
9.4 ABHÄNGIGKEIT DER B-ZELL-PROLIFERATION VON DER T-ZELL-HILFE	76
9.5 MÖGLICHKEIT DES T-ZELL-PRIMING DURCH ALLEINIGE ANTIGENPRÄSENTATION AUF B-ZELLEN	77
9.6 EINFLUSS PHYSIOLOGISCHERER VORLÄUFERFREQUENZEN AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION	78
9.6 EINFLUSS EINES B-ZELL-REZEPTOR-SIGNALS AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION	80
9.6 FEHLENDER ANTIKÖRPERKLASSENWECHSEL DER B-ZELLEN IM TRANSGENEN SYSTEM.....	81
9.7 LIMITATIONEN UND FORSCHUNGS-AUSBLICK	84
10. ZUSAMMENFASSUNG	86
11. LITERATUR	87
12. WEBLINKS	97

3. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SEKUNDÄR LYMPHATISCHE ORGANE	15
ABBILDUNG 2: CD4 ⁺ T-ZELL-LINIEN	18
ABBILDUNG 3: DIFFERENZIERUNG VON FOLLIKULÄREN HELFER-T-ZELLEN REGULIERT DURCH DENDRITISCHE ZELLEN UND B-ZELLEN	20
ABBILDUNG 4: II-RTA SCHEMA	28
ABBILDUNG 5: TYPISIERUNGEN	49
ABBILDUNG 6: ZELLCHARAKTERISIERUNG VOR TRANSFER	51
ABBILDUNG 7:: IDENTIFIZIERUNG TRANSFERIERTER ZELLEN	52
ABBILDUNG 8: T-ZELL-ABHÄNGIGE B-ZELL-PROLIFERATION.....	54
ABBILDUNG 9: PROLIFERATIONSVERHALTEN UND PHÄNOTYP NACH SRBC+ANTIGEN IMMUNISIERUNGEN.....	56
ABBILDUNG 10: KEIMZENTRUMSPHÄNOTYP VON ENDOGENEN T-ZELLEN, SOWIE TRANSFERIERTEN AND-T-ZELLEN ENTSPRICHT PD-1 ⁺ , CXCR5 ⁺ FOLLIKULÄRE T HELFERZELLEN UND DER VON II ⁺ MCCxSW-B-ZELLEN IGD ^{LO} , GL-7 ⁺ , PNA ⁺	58
ABBILDUNG 11: VERHALTEN VON CD90.1 NACH STIMULATION	60
ABBILDUNG 12:: EINFLUSS KLEINERER VORLÄUFERFREQUENZEN AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION.....	62
ABBILDUNG 13: EINFLUSS VERSCHIEDENER ANTIGENSPEZIFISCHER B-ZELL-REZEPTOR-STIMULATIONEN	64
ABBILDUNG 14: EINFLUSS DES B-ZELL-REZEPTOR-SIGNAL AUF DIE T-B-ZELL-INTERAKTION BEI TRANSIENTER UND PERMANENTER ANTIGENPRÄSENTATION	66
ABBILDUNG 15: EINFLUSS VERLÄNGERTER TRANSIENTER ANTIGENPRÄSENTATION AUF DENDRITISCHEN ZELLEN	68
ABBILDUNG 16: BEGINN DER T-ZELL-ABHÄNGIGEN B-ZELL-PROLIFERATION	70
ABBILDUNG 17: SYSTEMVERGLEICH ANTIKÖRPERKLASSENWECHSEL.....	72

4. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ABKÜRZUGEN	9
TABELLE 2: GERÄTE	28
TABELLE 3: SOFTWARE	30
TABELLE 4: VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE	30
TABELLE 5: ANTIKÖRPER UND ZELLFARBSTOFFE	31
TABELLE 6: CHEMIKALIEN	33
TABELLE 7: LÖSUNGEN UND PUFFER	34
TABELLE 8: ZELLEN	36
TABELLE 9: OLIGONUKLEOTIDE	36
TABELLE 10: PCR-PROGRAMM	38

5. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	
Abb.	Abbildung	
Al-647	Alexa Fluor 647	FACS Farbstoff
APC	Allophycocyanin	FACS Farbstoff
Bcl-6	B cell lymphoma-6	Transkriptionsfaktor
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1	Transkriptionsfaktor
BSA	Bovines Serumalbumin	
CD	Cluster of differentiation	Oberflächenmerkmal zur Unterscheidung von Zellpopulationen
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl- ester musculoaponeurotic fibrosarcoma	Zellfarbstoff, der Rückschluss auf eine begrenzte Anzahl Zellteilungen zulässt
c-MAF	oncogene homolog	Transkriptionsfaktor
CTV	Cell Trace Violet	Zellfarbstoff, der Rückschluss auf eine begrenzte Anzahl Zellteilungen zulässt
CXCL	Chemokin mit Cystein-X-Cystein Aufbau	X: andere Aminosäure
CXCR	Chemokinrezeptor mit C-X-C Aufbau; X:	
d	Day	Tag
DEL	duck egg lysozyme	Lysozym aus Enteneiern
DC	dendritic cell	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	Standardzellnährmedium
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat	Nukleosidtriphosphat
ECDI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorid	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Durchflusszytofluorimetrie
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FDC	follicular dendritic cell	Follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	FACS Farbstoff
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3	Transkriptionsfaktor in regulatorischen T-Zellen
FSC	forward scatter	Vorwärtsstreuung
FVD	Fixable Viability Dye	Farbstoff, der tote Zellen anfärbt
g	Schwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)	
GR-1	muriner Granulozytenmarker	
HEL	hen egg lysozyme	Lysozym aus Hühnereiern
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Puffer
i.v.	intravenös	
ICOS	inducible co-stimulator	Oberflächenmarker auf z.B. Tfh-Zellen

IFN	Interferon	
Ig	Immunglobulin	Antikörper
IL	Interleukin	
ILC	innate lymphocytes	Lymphozyten des angeborenen Immunsystems
LCMV	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus	
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor	Transkriptionsfaktor
MACS	Magnetic Cell Sorting	magnetische Zellsortierung
MCC	Moth cytochrome c	Motten-Zytochrom c
MGI	Mouse genome informatics	Internetdatenbank für Mausgenome
MHC	Major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten	
MRBC	mouse red blood cell	Mauserythrozyten
NFAT	nuclear factor of activated T-cells	Transkriptionsfaktor in z.B. aktivierten T- Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	
PALS	Periarterielle Lymphozytenscheide	
PBS	phosphate buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCC	pidgeon cytochrome C	Tauben-Zytochrom c
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent	
PD-1	Programmed cell death protein 1	Oberflächenmarker
PE	Phycoerythrin	FACS Farbstoff
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cyanine 5.5	FACS Farbstoff
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanine 7	FACS Farbstoff
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex	FACS Farbstoff
PK	Proteinase K	
PNA	Peanut Agglutinin	Lectin, das stark Proteine auf Keimzentrums- B-Zellen bindet
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur	
SA	Streptavidin	
SAP	SLAM associated protein	
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule	
SRBC	sheep red blood cell	Schafserythrozyten
SSC	sideward scatter	Seitwärtsstreuung
STAT	Signal transducer and activator of transcription	
SW	switch	Knock-in Ig: somit sind B-Zellen noch zum Antikörperklassenwechsel fähig
Taq	Thermus aquaticus	
TCF	transcription factor	Transkriptionsfaktor
TER 119	Antikörper gegen reife Erythrozyten und	deren Vorläuferzellen
Tfh	T follicular helper cell	follikuläre T-Helferzellen

Th Zellen	Helfer-T-Zellen
UV	Ultraviolet
V	Volt
Vol	Volumen

Tabelle 1: Abkürzungen

Auflistung der in der Arbeit zu findenden Abkürzungen und deren jeweilige Bedeutung.

6. Einleitung

6.1 Definition und Meilensteine in der Geschichte der Immunologie

Immunologie ist die Lehre von der körpereigenen Abwehr gegen Infektionen [frei nach: Murphy et al., 2008 Janeway's Immunobiology]. Dadurch ist sie eines der Kernfächer der medizinischen Grundlagenforschung. Schon mehrfach wurden Forscher für bedeutende Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Untersuchungen aus den letzten 130 Jahren zeigten ein immer größeres Netzwerk von zellulären und humoralen Faktoren auf, die dem Organismus eine ausreichende, gleichzeitig jedoch ihn selbst nicht schädigende Abwehr gegen Krankheitserreger ermöglichen. Doch die Anfänge bestanden aus Berichten von Krankheiten, wie der menschliche Körper sie abwehrt und zum Teil auch dagegen immun wird. So beschrieb beispielsweise Thukydides im zweiten Peloponnesischen Krieg (5. Jahrhundert vor Christus) die attische Pest. Als erster erkannte er Unterschiede zwischen erworbener Immunität und primärer Resistenz (Habs, 1982). Eine solche erworbene Immunität zu erzeugen, versprach klinisch nutzbare Prävention, was in Westeuropa erstmals im 18. Jahrhundert bekannt wurde. Lady Mary Wortley Montague, die Frau des britischen Botschafters im osmanischen Reich, beobachtete die Technik der Variolation und berichtete davon in England (Dinc and Ulman, 2007). Kindern wurden kleine Wunden beigebracht und das Sekret aus Pusteln von Pockenkranken, von denen im damaligen Europa jährlich 400,000 starben, hineingerieben (Barquet and Domingo, 1997). Es ließ sich beobachten, dass diese Prozedur einige Kinder gegen Pocken resistent werden ließ, andere jedoch tötete. Sicherer konnte durch eine beabsichtigte Infektion mit den weniger aggressiv verlaufenden Kuhpocken, einem nahen Verwandten des Pockenerregers, Immunität erreicht werden. Edward Jenner erkannte diesen Zusammenhang und etablierte die erste Impfung (Riedel, 2005). 1891 gelang es dann Paul Ehrlich erstmals experimentell spezifische und bleibende Immunität zu erzeugen. Seine Mäuse und Kaninchen konnten durch Dosisstufung eines Giftes gegen eben dieses immun gemacht werden, während sie gegen ein zweites, anderes trotzdem empfindlich blieben (Ehrlich, 1891a, b). Doch worauf beruhte dieser aufbaubare Schutz?

Während Ilya Metschnikoff die zelluläre Immunabwehr durch Phagozyten entdeckte und erforschte, erweiterten Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato das Wissen über die Abwehrmechanismen um den nicht-zellulären Anteil durch den Nachweis protektiver Faktoren im Serum des Blutes. Transferiertes Serum von gegen Tetanus oder Diphtherie immunisierten Tieren, war in der Lage infizierte, erkrankte Tiere zu heilen (von Behring, Kitasato, 1890). Dass die Antikörper des Serums wiederum von Zellen, nämlich Plasma B-Zellen, produziert werden, beschrieb Astrid Fagraeus in ihrer Promotion (Fagraeus, 1948). Damit

verband sie die bisher miteinander konkurrierenden Theorien der zellulären und/oder humoralen Abwehr zu einem System.

Es bedurfte einer umfassenden Idee, um aus der reinen Kenntnis schützender Bestandteile eine allgemeine Theorie der Funktionsweise von Immunantworten aufzustellen. Frank Macfarlane Burnet und David Talmage formulierten diese 1957 mit ihrer Theorie der klonalen Selektion. Demnach sind spezifische Immunzellen Klone gemeinsamer Ursprungszellen. Diese produzieren variante Nachkommen, von welchen wiederum diese selektiert und vermehrt werden, welche eine gesteigerte Spezifität und damit verbesserte Funktionsweise vorweisen (Burnet, 1957: erneut gedruckt in Burnet, 1976; Talmage, 1957). Ergebnisse der immunologischen Forschung ermöglichten und ermöglichen große Fortschritte der Medizin wie Impfungen, Serumtherapien und spezifische Antikörpertherapien, womit sie nicht unerheblichen Anteil an unserer gesteigerten und immer noch steigenden Lebenserwartung haben.

6.2 Komponenten des Immunsystems

Das Immunsystem wird klassischerweise untergliedert in das angeborene System, welches relativ weit verbreitete molekulare Muster von Mikroben erkennt und sofort unspezifisch reagieren kann und das erworbene, adaptive System. Dieses kann durch somatische Rekombination auch auf initial unbekannte Antigene reagieren. So ist es auch in der Lage Pathogene zu bekämpfen, denen der Organismus noch nie begegnet ist. Beide Systeme setzen sich sowohl aus zellulären, als auch azellulären (humorales Immunsystem) Bestandteilen zusammen, kommunizieren miteinander und ergänzen sich.

6.3 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht zellulär aus Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und relativ neu identifizierten „innaten“ Lymphozyten (ILC). Seine humoralen Bestandteile sind verschiedene Zytokine, die der Kommunikation unter anderem auch mit dem adaptiven Immunsystem dienen und das Komplementsystem. Das Komplementsystem besteht aus in einer Kaskade von nacheinander aktivierbaren Proteasen und über diese proteolytisch aktivierten Eiweiße führt es letztendlich zu Opsonisierung oder Lyse von Pathogenen und zur Freisetzung von Chemokinen. Schließlich wird auch die Barrierefunktion von Epithelien, wie der Haut oder der Darmschleimhaut als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen.

6.4 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit, wodurch eine erhöhte Spezifität erreicht wird und durch sein „Gedächtnis“ aus. Es setzt sich ebenfalls aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen, deren Interaktion die Herstellung von hochspezifischen Antikörpern oder das direkte Abtöten infizierter Zellen zum Ziel hat. Zwei Zellarten werden hier unterschieden:

B-Lymphozyten, die nach dem Ursprungsorgan ihrer Erstentdeckung in der *Bursa fabricii* von Hühnern benannt sind und aus dem Thymus stammende T-Lymphozyten.

Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht in der Produktion von hochaffinen Antikörpern, dem humoralen Teil des adaptiven Immunsystems, und dem Anlegen von B-Gedächtniszellen (Allen et al., 2007b; Cyster, 2010).

T-Lymphozyten werden in zytotoxische und Helfer-T-Zellen unterteilt, die sich anhand von Oberflächenmolekülen unterscheiden lassen. CD8⁺ T-Zellen sind zytotoxisch und sollen infizierte Zellen selbstständig abtöten. CD4⁺ T-Zellen sind Helfer-T-Zellen und unterstützen verschiedene immunologische Vorgänge, nicht zuletzt die Funktion von B-Zellen und die Produktion von Antikörpern.

6.5 makro- und mikroskopische Immunologie: die Anatomie sekundär lymphatischer Organe

Die lymphatischen Organe sind Entwicklungs- und Begegnungsstätten der Lymphozyten. Sie werden in primäre und sekundäre unterteilt. In den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) findet die Entwicklung der B-, bzw. T-Lymphozyten statt, die danach zirkulieren und die sekundär lymphatischen Organe besiedeln. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Lymphknoten, die Antigene aus der Lymphe auffangen (Abb. 1 A) und die Milz, die das Blut filtriert (Abb. 1 B), sowie organspezifische lymphatische Gewebe, wie z.B. dem schleimhautassoziierten lymphatischen Gewebe (Mucosa associated Lymphoid Tissue = MALT). Die verschiedenen Immunzellen können hier effizient interagieren und Immunantworten initiieren.

Um die dafür nötigen Begegnungen der Zellen zu gewährleisten, haben die sekundären lymphatischen Organe eine besondere Architektur, die T- und B-Zell-Areale und spezielle Gefäße einschließt. Hochendotheliale Venolen (in Lymphknoten) oder Zentralarterien (in der Milz) lassen Lymphozyten besonders leicht extravasieren, wonach sie, von Chemokingradienten gelenkt, in die jeweiligen Zellzonen gelangen (Delves and Roitt, 2000).

Ein Lymphknoten (Abb. 1 A) gliedert sich strukturell in die Rinde (Cortex) mit der B-Zell-Zone, den Parakortex (T-Zell-Zone) und die Markstränge. Die Milz (Abb. 1 B) hingegen besteht aus roter und weißer

Pulpa. Während die rote Pulpa auf die Elimination von alten Blutzellen spezialisiertes Gewebe ist, finden in der weißen Pulpa Immunreaktionen statt. Um eine Zentralarterie herum, befindet sich die periarterielle Lymphozytenscheide (PALS = T-Zellzone), auf welche wiederum die B-Zell-Zone mit den Follikeln folgt. Im Laufe einer Immunreaktion entwickeln sich primäre Lymphfollikel durch die Entstehung eines Keimzentrums zu sekundären Follikeln (Rohlich K., 1930). Die Kenntnis der Anatomie und Funktionsweise lymphatischer Organe sowohl auf makroskopischer, als auch mikroskopischer und molekularer Ebene ist fundamental, um Keimzentrumsreaktionen und die Interaktionen von T-Zellen zu verstehen und einordnen zu können.

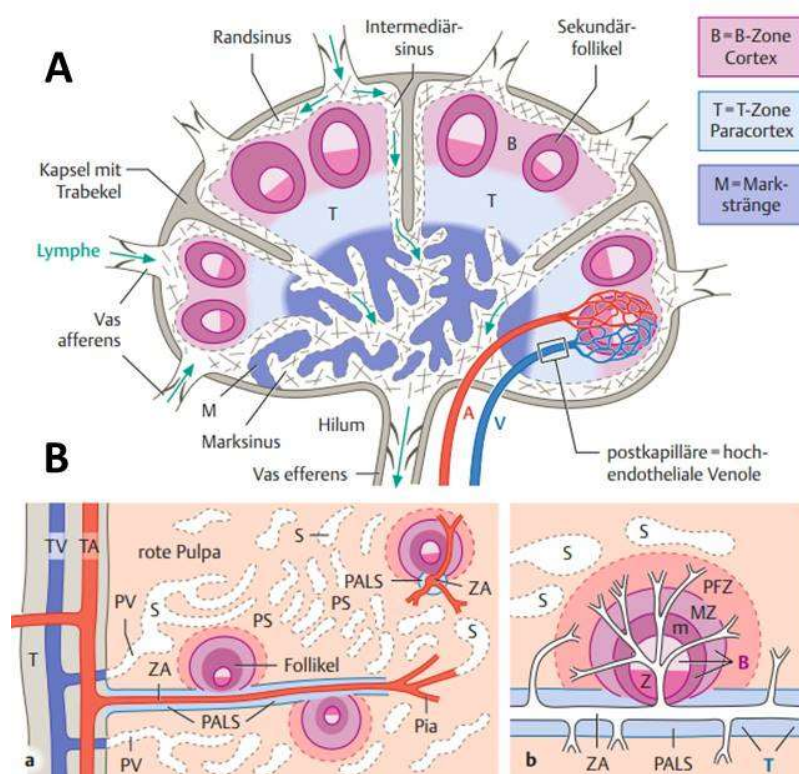


Abbildung 1: Anatomie sekundär lymphatischer Organe

A) schematische Zeichnung eines Lymphknotens; **T** T-Zell-Zone, **B** B-Zell-Zone, **M** Markstränge **B)** schematische Darstellungen einer Milz in Längs- und Querschnitt; **T(blau)** T-Zell-Zone = **PALS** periarterielle Lymphozytenscheide, **B(lila)** B-Zell-Zone, **T(schwarz)** Trabekel, **TA & TV** Trabekelarterie & -vene; **ZA** Zentralarterie **Pia** Pinalarterie, **S** Sinusoid, **PV** Pulpavene, **Z** Keimzentrum, **m** Lymphozytenmantel, **MZ** Marginalzone, **PFZ** perifollikuläre Zone, **PS** Pulpastränge

Abbildung aus Lüllmann-Rauch, R. (2015). Taschenlehrbuch Histologie 3. Auflage (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart). Seite 350 & 353

6.6 Ablauf einer physiologischen adaptiven Immunantwort

Im Rahmen einer Immunantwort, z.B. auf eine Infektion, versucht das adaptive Immunsystem eine ausreichende Pathogenabwehr zu erzeugen und parallel auch seine Art eines „Gedächtnisses“ anzulegen. Hierbei werden von Pathogen-spezifischen B-Zellen Gedächtniszellen generiert. So steht eine höhere Zahl von spezifischen B-Zellen zur Verfügung und bei erneutem Kontakt kann das gleiche Pathogen deutlich schneller und kraftvoller bekämpft werden (Tangye and Tarlinton, 2009).

Damit sich Immunzellen aus naiven Vorläufern zu funktionalen Effektorzellen differenzieren können, bedarf es dreier verschiedener Signale und eines passenden Begegnungsortes der Zellen. Signal 1 (für Spezifität) wird durch das Antigen gegeben, auf das der Lymphozyt spezifisch reagiert. Im Falle von pathogen-spezifischen T-Zellen liefern an MHC-gebundene, peptidische Bruchstücke des Erregers auf der Oberfläche sogenannter Antigen-präsentierender Zellen dieses Signal 1. T-Zellen erkennen über ihre T-Zell-Rezeptoren den MHC-Peptid-Komplex. Aufgrund der großen Variabilität der MHC-Moleküle ist Signal 1 damit auch MHC-Typ abhängig, bzw. restringiert (Zinkernagel and Doherty, 1974a, b). Signal 2 (für Ko-Stimulation) bedingt direkten Zell-Zell-Kontakt, der zu Signal 1 ko-stimulatorisch wirkende Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglicht. Zuletzt wird Signal 3 (für Differenzierung) durch das lokale Milieu gegeben. Es wird durch die jeweils lokal gegenwärtigen Zellen aufgebaut, die Botenstoffe, wie z.B. Interleukine (IL) und Interferone (IFN) synthetisieren.

Bei einer Immunreaktion gelangen Antigene mit der Lymphe oder über den Blutkreislauf frei oder an Zellen gebunden z.B. mit dendritischen Zellen, von der Peripherie in die sekundären lymphatischen Organe. Hier werden sie verarbeitet und eine spezifische Immunantwort kann in Gang gesetzt werden.

CD4⁺T-Zellen, die dort über Signale 1 und 2 von dendritischen Zellen stimuliert wurden, wandern z.T. zur Grenze der B-Zell-Zone (Okada et al., 2005). B-Zellen wiederum erhalten Signal 1 über die Bindung ihrer membranständigen Immunglobuline (Antikörper) an Antigene, die auf follikulären dendritischen Zellen (FDC) oder in gelöster Form oder auf der Oberfläche von Sinusmakrophagen erkannt wird (Yuseff et al., 2013). Sie begeben sich nach dieser Aktivierung ebenfalls zur Grenze zwischen T-Zell- und B-Zell-Zone (Abb. 1), wo sie aufgenommene und in Peptidbruchstücke aufgespaltene Proteinantigene auf MHC-Moleküle den T-Zellen präsentieren (Okada et al., 2005). Abhängig von Signal 1 kommt es so zur richtigen Positionierung der T- und B-Zellen, die antigenspezifische Interaktionen ermöglicht. In deren Folge entscheiden Signale 2 und 3 über Differenzierung und Spezialisierung der Zellen.

Damit sich B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen und B-Gedächtniszellen differenzieren können, sind zwei Wege beschrieben (Kaji et al., 2012). Einige der aktivierten B-Zellen generieren T-Zell-unabhängig eine schnelle, primäre Antikörperantwort, indem sie Immunglobuline (Ig) vom Typ M sezernieren (IgM) (MacLennan et al., 2003). Andere hingegen wandern in die Follikel, um dort mit Hilfe von T-Zellen - Signale 2 und 3 – im Rahmen von Keimzentrumsreaktionen durch somatische Hypermutation und Proliferation ihre Bandbreite zu vergrößern (Pereira et al., 2010; Berek et al., 1991). Durch die folgende Selektion auf höher affine Klone und deren weiterer Proliferation und Hypermutation, wird die Affinität der Antikörper kontinuierlich gesteigert und die Population spezifischer B-Zellen expandiert (Rajewsky, 1996). B-Zellen können im Verlauf dieser Vorgänge die Antikörperklasse wechseln. Sie verlassen dann den Follikel und sezernieren enddifferenziert als Plasmazellen Antikörper oder werden zu B-Gedächtniszellen. Letztere sind metabolisch inaktiv und teilen sich kaum mehr. Sie sind aber in der Lage bei erneuter Konfrontation eine schnelle und effiziente Sekundärantwort zu starten. Z.B. über die Anzahl der B-Zellen, deren Affinität und den Wechsel der Antikörperklasse lassen sich B-Zellen im räumlichen und zeitlichen Verlauf von Immunreaktion nachverfolgen und Zwischenstufen erlauben Rückschlüsse auf die notwendigen oder hinreichenden Interaktionen mit T-Helfer-Zellen.

6.7 CD4⁺ T-Helfer-Zellen

CD4⁺ T-Zellen stellen das Helferkompartiment der T-Zell-Population dar, während zytotoxische T-Zellen CD8⁺ sind. Helfer-T-Zellen können ihrerseits in verschiedene Linien untergliedert werden, die zu ihrer Differenzierung unterschiedliche Bedingungen (Signal 3) benötigen. Sie unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Zytokine, die sie produzieren und von denen ihre Effektor- und Helferfunktionen abhängen. Jede dieser Linien basiert auf der Expression eines Subtyp-definierenden Master-Transkriptionsregulators (Abb. 2).

T-Zellen entwickeln sich aus myeloiden Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus gewandert sind. In dessen Rinde bilden sich über mehrere doppelnegative (CD4⁻CD8⁻) Stadien hinweg doppelt positive (CD8⁺CD4⁺) T-Zellen aus, bevor sie sich zu CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen differenzieren und den Thymus verlassen, um in der Peripherie zu zirkulieren. Im Laufe ihrer Entwicklung werden sie sowohl positiv, als auch negativ bezüglich der Autoreaktivität ihres T-Zell-Rezeptors selektioniert. Diese Selektion stellt sicher, dass nur Zellen emigrieren, die einerseits einen funktionierenden T-Zell-Rezeptor exprimieren, andererseits aber nicht auf MHC-Peptid-Komplexe körpereigener Peptide reagieren.

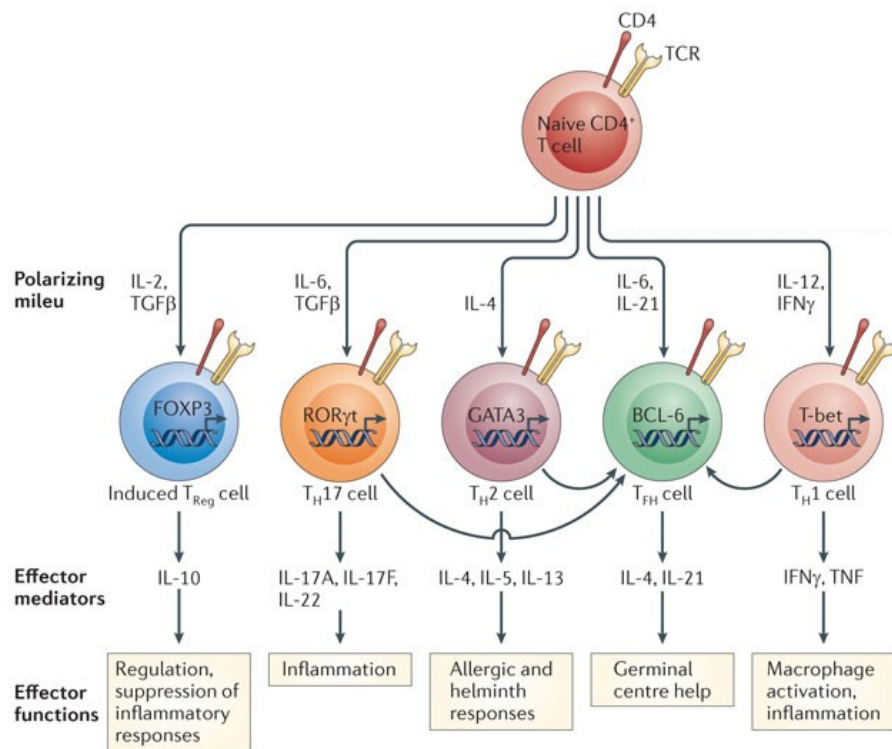


Abbildung 2: CD4⁺ T-Zell-Linien

Legende: TCR = T-Zell-Rezeptor, CD = Gruppen von Oberflächenmerkmalen, Polarizing milieu = polarisierendes Milieu, IL = Interleukin, TGF = transformierender Wachstumsfaktor, IFN = Interferon, FOXP3 = Forkhead-Box-Protein P3, Rorγt = RAR-related orphan receptor γ, GATA3 = Glutaryl Aminotransferase-Untereinheit A, BCL-6 = B-Zell Lymphom 6 Protein, T-bet = T-box exprimiert in T-Zellen, TNF = Tumornekrosefaktor-α

Naive CD4⁺ können sich nach der Interaktion mit ihrem Antigen in verschiedenen Helfer-T-Zell-Subtypen entwickeln. Über die Differenzierung entscheidet zum eine das polarisierende Milieu und Aktivierung eines bestimmten Master-Transkriptionsregulators (FoxP3 für regulatorische T-Zellen, Rorγt für Th17, GATA3 für Th2, Bcl-6 für Tfh und T-bet für Th1). Nach Differenzierung zu diesen Effektor-T-Zelltypen sezernieren sie wiederum charakteristische Zytokine und erfüllen damit verschiedene Funktionen. So regulieren Treg inflammatorische Prozesse, Th17 induzieren Entzündungen, Th2 haben allergische Funktionen und helfen bei der Abwehr von Helminthen, Tfh sind für die B-Zell-Hilfe in Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe verantwortlich und Th1 aktivieren Makrophagen und induzieren Inflammationen.

Abbildung übernommen aus: Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12, 137. (Zytolytische CD4⁺T-Zelle ausgeblendet)

6.8 Follikuläre Helfer-T-Zellen (Tfh)

Die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren führt zur Ausbildung verschiedener Subtypen von Helfer-T-Zellen. So kontrollieren die Transkriptionsfaktoren T-bet, Gata-3, ROR-γ und Bcl-6 jeweils die Differenzierung zu Th1-, Th2-, Th-17, Tfh-Zellen (Abb. 2).

Tfh-Zellen sind die B-Zell-helfenden T-Zellen in den Lymphfollikeln und sind unabkömmlich für die Generierung und Aufrechterhaltung von Keimzentrumsreaktionen (MacLennan, 1994). Das System der Hilfe bei der B-Zell-Differenzierung ist eng kontrolliert, um das Entstehen von autoreaktiven Zellen zu verhindern. Eine Deregulation von Zellen mit Tfh-Zell-Phänotyp korreliert z.B. mit dem Entstehen und dem Verlauf von Autoimmunkrankheiten, wie dem systemischen Lupus Erythematodes, dem Sjögren-Syndrom oder der rheumatoiden Arthritis (Ma et al., 2012; Simpson et al., 2010; Tangye et al., 2013). Sie wird sogar als Risikoindikator für Diabetes mellitus Typ 1 im Menschen diskutiert, da bei prädiabetischen Kindern und auch kurz nach Diagnosesicherung Zellen mit Tfh-Phänotyp vermehrt im Blut nachgewiesen worden sind (Viisanen et al., 2017).

Tfh-Zellen sind definiert durch die Expression von CXCR5 (Breitfeld et al., 2000; Kim et al., 2001; Schaerli et al., 2000), PD-1 (Crotty, 2011), ICOS und ihrem Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Die Expressionsstärke von BCL-6 korreliert mit dem Status der Differenzierung, die wiederum durch die Interaktion mit dendritischen Zellen und B-Zellen gesteuert wird (Crotty, 2011; Rasheed et al., 2006; Yu et al., 2009) (Abb.3).

Ohne den Transkriptionsfaktor BCL-6 können sich Zellen eines Tfh-Phänotyps nicht entwickeln. Weitestgehend agiert er als Suppressor von Blimp-1, einem wichtigen Faktor in der Entwicklung zu anderen CD4⁺ Subpopulationen (Johnston et al., 2009). BCL-6 inhibiert Blimp-1 und umgekehrt (Crotty et al., 2010; Martins and Calame, 2008). Weiter induziert BCL-6 mindestens zum Teil PD-1, ICOS und CXCR5 (Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor steht unter dem Einfluss von Interleukinen (Signal 3), die zwar teilweise über gemeinsame Rezeptoren wirken, sich aber in ihrer Wirkung auf die T-Zell-Differenzierung enorm unterscheiden. So wird z.B. IL-2 oft experimentell benutzt, um T-Zell-Kulturen zu expandieren. Es inhibiert jedoch die Differenzierung zu Tfh-Zellen (Ballesteros-Tato et al., 2012). Diese ist indessen von IL-6 und IL-21 abhängig (Harker et al., 2011; Nurieva et al., 2008).

CXCR5 ist ein Chemokinrezeptor. Die Konzentration seines Liganden (CXCL13) steigt in sekundären lymphatischen Organen in Richtung der Follikel an und steuert so die Migration der Tfh-Zelle (Breitfeld et al., 2000; Haynes et al., 2007; Schaerli et al., 2000).

Nach Stimulation produzieren Tfh-Zellen charakteristischerweise vor allem IL-21 und IL-4, aber auch IFN- γ , IL-27, IL-12 und sie exprimieren ICOS (Johnston et al., 2009; Reinhardt et al., 2009; Yusuf et al., 2010; Choi et al., 2011, Crotty 2011) (Abb. 3).

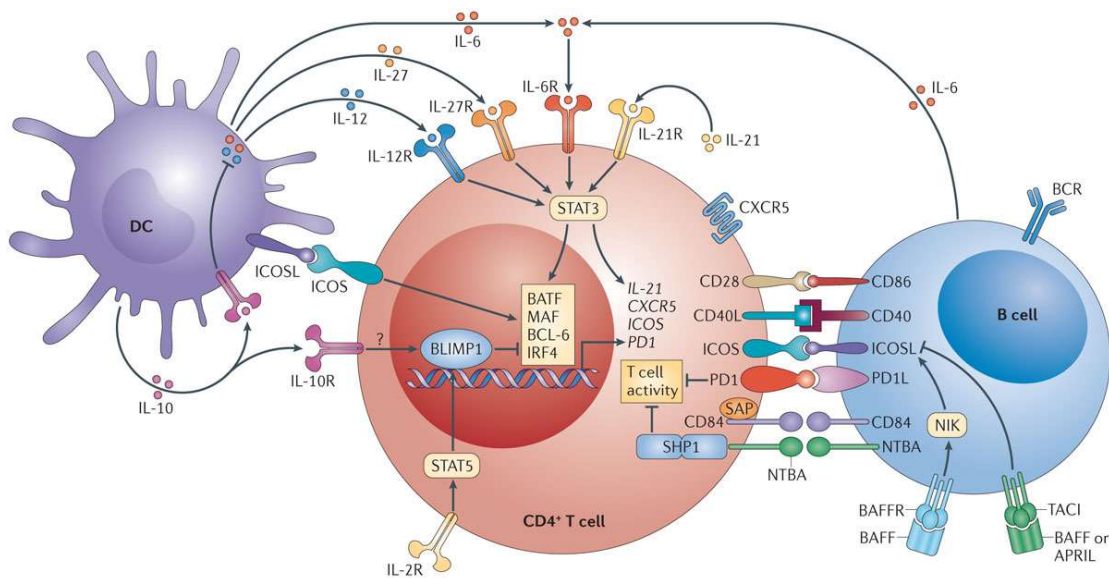


Abbildung 3: Differenzierung von folliculären Helfer-T-Zelle reguliert durch dendritische Zellen und B-Zellen

Legende: spitze Pfeile = Aktivierung, stumpfe Pfeile = Inhibition, **Zellen:** DC = dendritische Zelle, B cell = B-Zelle
Extrazellulär: IL = Interleukin, BAFF = B-Zell-aktivierender Faktor, APRIL **Oberflächenmoleküle:**, IL-xR = Interleukin-x Rezeptor, CD = Gruppen von Oberflächenmerkmalen, ICOS = Induzierbarer T-Zell-Costimulator, ICOSL = ICOS Ligand, CXCR5 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5, PD1 = programmierter Zelltod Protein 1 , PD1L = PD1 Ligand, , NTBA = natürliche Killer-, T-, and B-Zell Antigen, BCR = B-Zell-Rezeptor, BAFFR = BAFF Rezeptor, TACI = transmembraner Aktivator und CAML Interaktor **Signalkaskaden:** STAT = Signalüberträger und Transkriptionsaktivator, SAP = SLAM-assoziiertes Protein, SHP = Src Homologieregion 2 beinhaltende Phosphatase, NIK = NF-κB-induzierende Kinase **Transkriptionsfaktoren:** BLIMP1 = B-Lymphozyten-induziertes Maturationsprotein-1, BATF = basic leukemia zipper transcriptional factor ATF-like MAF = musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, BCL-6 = B-cell lymphoma 6 protein, IRF4 = Interferon regulatorischer Faktor 4

Zur Differenzierung zu Tfh-Zellen treten naive CD4⁺-Zellen mit dendritischen Zellen und B-Zellen in Interaktion. Nach der Antigen- und Costimulation mit dendritischen Zellen exprimieren sie BCL-6 und CXCR5. Dadurch geführt, migrieren sie an die Grenze der T-Zell- und B-Zell-Zone, wo sie auf B-Zellen treffen und ihre Differenzierung zu Keimzentrum Tfh-Zellen vollenden. Im Milieu von IL-6, IL-12 und IL-27 durch dendritische Zellen und B-Zellen (kein IL-12) und IL- 21 von CD4⁺ T-Zellen werden über STAT3 die Transkriptionsfaktoren BATF, MAF, BCL-6 und IRF4 aktiviert, die nachfolgend die Expression von PD-1, CXCR5, ICOS und IL-21 induzieren oder verstärken. BLIMP, IL-10 und IL-2 hingegen wirken antagonistisch und hemmen die Tfh-Differenzierung. Im Zell-Zell-Kontakt, den die Rekrutierung von SAP stabilisiert und die Assoziation von SHP1 destabilisiert, sind es vor allem CD28-CD86-, CD40L-CD40- und ICOS-ICOSL-Interaktionen, die die Tfh-Differenzierung forcieren. Die ICOSL-Expression wird in B-Zellen durch BAFFR und TACI reguliert.

Abbildung übernommen aus: Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - Tfh cells in human health and disease. Nat Rev Immunol 13, 417

6.9 Dendritische Zellen und ihre Interaktion mit Tfh-Zellen

Dendritische Zellen wurden 1973 von Zanvil Cohn und Ralph Steinman entdeckt (Steinman and Cohn, 1973). Sie gehören zu den professionell Antigen-präsentierenden Zellen und fielen früh durch die ungewöhnliche Dichte an MHC-Komplexen auf, die in immunhistologischen Studien beschrieben ist (Steinman et al., 1979, Banchereau and Steinman, 1998 und Grouard et al., 1996). Sie war ein erster Hinweis auf die Rolle der dendritischen Zellen in der Stimulation von T-Zellen. Die sekundären lymphatischen Organe bieten die Strukturen, damit sich dendritische Zellen und T-Zellen treffen. Um Tfh-Zell-Differenzierung auszulösen, müssen dendritische Zellen den zum T-Zell-Rezeptor passenden Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex (Signal 1) auf ihrer Oberfläche tragen. Eine hohe Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Peptid-MHC-Komplex scheint hierbei die Entwicklung zu Tfh-Zellen zu unterstützen (Fazilleau et al., 2009). Zusätzlich interagieren die T-Zellen über CD28 und weitere Moleküle mit Liganden auf der Oberfläche der dendritischen Zellen. Diese Ko-Stimulationen definieren in ihrer Summe und Qualität Signal 2 (Ferguson et al., 1996).

Dendritische Zellen sind außerdem von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von Keimzentren und auch den späteren Antikörperklassenwechsel der B-Zellen (Borriello et al., 1997; Ferguson et al., 1996). In den T-Zellen führt die Interaktion von CD28 (mit CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2)) zur Expression von ICOS und BCL-6 (Linterman et al., 2014; Weber et al., 2015; Yoshinaga et al., 1999). Zuvor noch werden die beiden Transkriptionsfaktoren TCF-1 und LEF-1, die wiederum die Expression von ICOS und dem IL-6-Rezeptor verstärken, exprimiert (Choi et al., 2015; Wu et al., 2015; Xu et al., 2015). Die Stärke des dann folgenden ICOS-Signals korreliert mit der Größe von Keimzentren, sowie der Bildung von Tfh-Zellen und spielt über die Steuerung der Expression von CXCR5 eine Rolle in der Positionierung der T-Zelle an der Grenze zur B-Zell-Zone (Wang et al., 2015; Weber et al., 2015).

6.10 Interaktion von Tfh- und B-Zellen

Für die Entwicklung einer protektiven Antikörperantwort ist die Interaktion von T-Zellen und B-Zellen unverzichtbar (Claman et al., 1966). Auch sie besteht aus einer Peptid-MHC-restringierten Kommunikation (Signal 1), auf einer Zell-Zell-Ko-Stimulation durch B-Zellen (Signal 2) und der Wirkung von Zytokinen (Signal 3). So haben die Zellen Einfluss auf die gegenseitige Differenzierung, Proliferation und auf das Überleben der Interaktionspartner.

T- und B-Zellen treffen erstmals nach jeweils individueller Aktivierung (durch eine Antigen-präsentierende Zelle oder das Antigen selber) an der Grenze ihrer jeweiligen Zell-Zonen in den sekundären lymphatischen Organen aufeinander (Allen et al., 2007a; Garside et al., 1998) (Abb. 1). Dort interagiert der T-Zell-Rezeptors mit Peptid-MHC-Komplexe auf B-Zellen. Die Interaktionszeiten zwischen mehr und weniger passenden T- und B-Zellen unterscheiden sich in ihrer Dauer bis zu 10.000-fach und sind ein entscheidender Faktor in der Selektion der Partnerzelle (Batista and Neuberger, 1998, 2000; Shlomchik and Weisel, 2012). Mit dieser bilden sie ein Konjugat und migrieren in den Follikel. Dort kontrollieren Tfh-Zellen durch selektive Hilfe die Affinitätsreifung, den Antikörperklassenwechsel, die Plasmazelldifferenzierung und die Geschwindigkeit des Zellzyklus der B-Zellen (Crotty, 2011; Good-Jacobson et al., 2010; Gitlin et al., 2015).

Obwohl B-Zellen und dendritische Zellen abhängig von Peptid-MHC-Komplexen (Signal 1) mit T-Zellen in Verbindung treten, unterscheidet sich die Interaktion und beide Zellen können unterschiedliche Einflüsse auf die Differenzierung der Z-Zellen haben. Der Adaptor SAP ist in der Interaktion mit B-Zellen nötig, in der mit dendritischen Zellen hingegen nicht (Qi et al., 2008). Tfh-Zellen exprimieren SAP hoch, während B-Zellen dessen Liganden SLAM exprimieren (Yusuf et al., 2010). Die Bildung von T-B-Konjugaten findet SAP-abhängig statt (Cannons et al., 2010; Qi et al., 2008). Sind T-Zellen SAP-defizient, kann z.B. im Rahmen einer LCMV_{Armstrong} Infektion keine Langzeitimmunität im entsprechenden Mausmodell aufgebaut werden (Crotty et al., 2003). SAP ist auch im Menschen relevant. Das für SAP kodierende Gen ist in Patienten mit X-chromosomalem lymphoproliferativen Syndrom (XLP) fehlend oder defekt und dies führt zu unkontrollierter B-Zell-Proliferation bei einer Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) (Coffey et al., 1998; Sayos et al., 1998).

Eine der funktional wichtigsten ko-stimulatorischen Interaktionen ist die von CD40L (auf Tfh-Zellen) und CD40 (auf B-Zellen). Wird sie nach dem Entstehen eines Keimzentrums blockiert, kann dieses in der Folge nicht aufrechterhalten werden. Im Falle eines primären Defekts z.B. aufgrund einer Mutation von CD40L oder CD40 kann sich dieses erst gar nicht entwickeln (Foy et al., 1994; Han et al., 1995; Takahashi et al., 1998).

Auch Signale über PD-1-Liganden spielen eine entscheidende Rolle. PD-1-Liganden sind auf B-Zellen in Keimzentren hoch exprimiert und interagieren mit PD-1 auf Tfh-Zellen. Ein Fehlen dieser Signale führt zu verringerten Zahlen an langlebigen Plasmazellen (Good-Jacobson et al., 2010).

Des Weiteren exprimieren B-Zellen den ICOS-Liganden (ICOSL), in dessen Abwesenheit die Keimzentrumsbildung ebenfalls eingeschränkt ist (Nurieva et al., 2008). Die ICOS-ICOSL Wechselwirkung liefert Signale, die die Migration zum B-Zell-Follikel fördern und für die Unterhaltung der Tfh-Zell-Population bestimmend ist (Weber et al., 2015; Xu et al., 2013). So sterben Tfh-Zellen nach drei Tagen ohne ICOS Stimulation (Choi et al., 2011). Ein homozygoter Verlust von ICOS ist im Menschen mit dem variablen Immundefekt Syndrom (CVID) assoziiert, das sich durch Spiegelerniedrigungen von IgG und IgA und hoher Infektanfälligkeit auszeichnet (Grimbacher et al., 2003). Die ICOS-ICOSL Wechselwirkung hat zudem Einfluss auf die Produktion von IL-21 und damit auf Signal 3 (Bauquet et al., 2009).

IL-21-Signale induzieren und erhalten die BCL-6-Expression, die für Entwicklung von Tfh-Zellen unabkömmlich ist und auch in Keimzentrums-B-Zellen den wichtigsten Transkriptionsregulator in darstellt (Linterman et al., 2010; Poholek et al., 2010; Zotos et al., 2010). Über tausend Gene wurden mittlerweile als Ziele von BCL-6 identifiziert (Basso et al., 2010; Klein et al., 2003). IL-21 und auch IL-4 können zudem Blimp-1 in B-Zellen induzieren und so die Plasmazelldifferenzierung von B-Zellen am Ende der Keimzentrumsreaktion unterstützen (Shapiro-Shelef and Calame, 2005; Tarlinton et al., 2008). Das von Tfh-Zellen sezernierte IL-4 ist für die B-Zellen überlebenswichtig. Der Wettstreit darum selektiert einzelne B-Zell-Klone und fördert den Antikörperklassenwechsel zu z.B. IgG1 (Reinhardt et al., 2009).

B-Zellen empfangen einerseits Hilfe von Tfh-Zellen, haben umgekehrt aber auch Einfluss auf deren Differenzierung und Regulation. Im Zusammenhang mit einer antiviralen Antwort gegen LCMV – einem murinen Modell für akute virale Infektionen – sind B-Zellen in der Lage, naive T-Zellen limitiert zu primen und in Richtung einer Tfh-Differenzierung zu orientieren. Trotzdem ist zur Entfaltung der vollen Tfh-Differenzierung die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen unabkömmlich (Barnett et al., 2014). Sie allein ist allerdings auch nicht hinreichend zur vollständigen Differenzierung von Tfh-Zellen. Fehlt die Antigenpräsentation durch B-Zellen in Mäusen, werden nur als „prä-Tfh-Zellen“ bezeichnete T-Zellen erzeugt, die in der Produktion von IL-21 defizient sind (Goenka et al., 2011). Humane CD4⁺ T-Zellen werden nach Antigenpräsentation durch B-Zellen ebenfalls zu Tfh-ähnlichen Zellen. Diese sind sogar in der Lage, IL-21 zu produzieren, haben aber auch Charakteristiken von Th1-Zellen (de Wit et al., 2015). In Abwesenheit von B-Zellen verschwinden zunächst entstandene Tfh-Zellen (Johnston et al., 2009). Eine auf B-Zellen beschränkte Ablation von MHC-Klasse-II Genen und damit die Unterbindung der spezifischen Interaktion mit T-Zellen verbessert den Krankheitsverlauf in einem murinen Lupusmodell (Giles et al., 2015). Während Mäuse, deren B-Zellen zwar noch zur Interaktion mit T-Zellen in der Lage sind, aber ihre Antikörper nicht sezernieren können, weiterhin eine ausgeprägte Symptomatik zeigen (Chan et al., 1999).

Auch diese Beobachtungen unterstreichen den Einfluss der B-Zellen auf die Tfh-Zell-Differenzierung und deren Proliferation und zeigen Funktionen jenseits der Antikörperproduktion auf.

6.11 Extrafollikuläre und follikuläre Immunantworten

Keimzentren sind spezialisierte Gewebestrukturen in sekundären lymphatischen Organen, in denen die Affinitätsreifung und der Antikörperklassenwechsel stattfinden (Honjo et al., 2002; Rajewsky, 1996). Für beide Schritte benötigen B-Zellen die Hilfe von Tfh-Zellen (Avery et al., 2008; Takahashi et al., 1998). Prinzipiell können diese Schritte jedoch auch außerhalb der Keimzentren stattfinden. Initial werden zum Beispiel IgM Antikörper von relativ geringer Affinität extrafollikulär und T-Zell-unabhängig sezerniert und auch extrafollikulärer, T-Zell-abhängiger Antikörperklassenwechsel zu IgG ist beschrieben (MacLennan et al., 2003; Odegard et al., 2008). Während einer Infektion mit *Salmonella enterica* var Typhimurium ist eine somatische Hypermutationen mit Affinitätsreifung spezifischer B-Zell-Klone auch außerhalb von Keimzentren beschrieben worden (Di Niro et al., 2015). *Ehrlichia muris* unterdrückt follikuläre Immunreaktionen in der Milz (Racine et al., 2010). *Borrelia burgdorferi* hemmt die Keimzentrumsbildung, derweil diese Bakterien eine extrafollikuläre IgM-Antwort unterstützen (Hastey et al., 2012). Der Erreger, bzw. die Krankheiten scheinen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ausbildung der B-Zell-Immunantwort zu haben.

In Antworten mit Follikelbildung gelangen nur höchstaffine B-Zell-Klone in die Keimzentren (Schwickert et al., 2011). Diese teilen sich in eine dunkle und eine helle Zone auf (Abb. 1) (Rohlich K., 1930), zwischen denen die B-Zellen zyklisch hin und her wandern. In der dunklen Zone proliferieren B-Zellen und verändern über somatische Hypermutation der variablen Genregionen ihrer Ig-Gene die Affinität zum Antigen (Takahashi et al., 1998). Danach wandern sie in die T-Zell-reichere helle Zone (Allen et al., 2007b). Dort präsentieren sie ihre Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe, mit denen sie im Wettbewerb um die antigenspezifische T-Zell-Hilfe stehen, durch die ihr Überleben gesichert wird (Rajewsky, 1996; Schwickert et al., 2011; Takahashi et al., 1998). Nach mehreren Zyklen zwischen dunkler und heller Zone differenzieren sie sich zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen (Shlomchik and Weisel, 2012).

6.12 Ziel der Arbeit

Die B-Zell-Hilfe durch T-Zellen ist unabkömmlich für die Ausbildung hochaffiner Antikörperantworten. Sie werden in sekundären lymphatischen Organen innerhalb von Keimzentren initiiert. Hier sind Tfh-Zellen,

d.h. auf B-Zell-Hilfe spezialisierte T-Zellen zu finden. In deren Abwesenheit können Keimzentren nicht gebildet werden. Für den Aufbau eines Ig-vermittelten Impfschutzes ist die Funktionalität der Keimzentren aber absolut maßgebend. Die zellulären und kinetischen Bedingungen, unter denen sich naive T-Zellen zu Tfh-Zellen differenzieren, sind deshalb von großem Interesse für die immunologischen Forschung.

In der Literatur werden verschiedene Modelle der Tfh-Zell-Differenzierung diskutiert. Einerseits wird die kontinuierliche Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen als hinreichend für die Tfh-Zell-Differenzierung gesehen (Caminschi and Shortman, 2012; Deenick et al., 2010). Auf der anderen Seite sind auch Beobachtungen publiziert, die die Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen und B-Zellen gemeinsam erst als hinreichend für die Tfh-Zell-Differenzierung sehen (Barnett et al., 2014; Baumjohann et al., 2011; Goenka et al., 2011).

In transgenen li-rTAXTIM Mäusen, die sowohl das An-, als auch das Abschalten der Präsentation von Peptiden des Motten-Zytochroms c (MCC) auf MHC-Klasse-II erlauben, untersuchten wir, ob die Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen den ersten Anstoß zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu Tfh-Zellen gibt oder ob sie im Verlauf der gesamten Immunantwort vorhanden sein muss. Zum anderen wollten wir wissen, ob die Proliferation und Funktionalität von B-Zellen allein von der T-Zell-Hilfe abhängt. So haben B-Zellen antigenspezifische B-Zell-Rezeptoren, deren Stimulierung die Anforderungen an die Interaktion von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen verändern könnte.

7. Materialien und Methoden

7.1 Mäuse

In folgender Auflistung ist eine Kurzbeschreibung der genutzten Mausstämmen zu finden.

7.1.1 AND

Genbezeichnung nach

MGI	Tg(Tc Tg(TcrAND)53Hed) (http://www.informatics.jax.org/allele/key/33033)
MGI-ID	3053044
Hintergrund	B10.BR
Referenz	Kaye et al., 1989

Die verwendeten Mäuse dieser Linie tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor auf dem genetischen Hintergrund B10.BR. Ihr Rezeptor ist spezifisch für Motten-Zytochrom c (MCC) auf MHC-Klasse-II. Er erkennt sowohl MCC₉₃₋₁₀₃, als auch MCC₈₈₋₁₀₃, sowie Tauben-Zytochrom c (PCC) im Kontext von H2-E^k. Im Labor sind kongen (auf CD45.1 oder CD90.1) markierte Linien etabliert und in dieser Arbeit benutzt worden.

7.1.2 liMCC

Genbezeichnung nach

MGI	Tg(H2-Ea-Cd74/MCC)37GNnak (http://www.informatics.jax.org/allele/key/612059)
MGI-ID	4439128
Hintergrund	B10.BR
Referenz	Yamashiro et al., 2002

liMCC Mäuse exprimieren durch das Transgen MCC₈₈₋₁₀₃ auf MHC-Klasse-II (H2-E^k). Auch hier wurden kongen CD45.1 markierte Zellen für Experimente mit adoptiven Transfers genutzt.

7.1.3 IiMCCxSW

Genbezeichnungen nach MGI

schwere Kette (ki)	Igh ^{tm1Rbr} (http://www.informatics.jax.org/allele/key/61608)
MGI-ID	3800383
Leichte Kette (tg)	Tg(IgkHyHEL10)1Rbr (http://www.informatics.jax.org/allele/key/61609)
MGI-ID	3800384
Hintergrund	B10.BR
Referenz	Phan et al., 2003; Yamashiro et al., 2002

IiMCCxSW ist eine im Labor etablierte Linie, deren B-Zellen zusätzlich zum IiMCC-Transgen eine transgene leichte Kette tragen. So besitzen ungefähr 50% der B-Zellen ein spezifisches Immunglobulin (Ig) für Hen Egg Lysozym (HEL). Sie besitzen weiterhin die Fähigkeiten zum Antikörperklassenwechsel. SW Hel-Ig transgene Mäuse (Phan et al., 2003) wurden mit IiMCC (Yamashiro et al., 2002) gekreuzt, um die genannte Linie zu züchten und homozygot gehalten. Auch diese Mauslinie war kongen mit CD45.1 markiert.

7.1.4 Ii-rTAxTIM

Genbezeichnungen nach MGI

Ii-rTA	Tg(Cd74-rtTA)#Doi (http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:4439138)
MGI-ID	4439138
TIM	Tg(tetO-Cd74/MCC)#Doi (http://www.informatics.jax.org/allele/key/612062)
MGI-ID	4439134
Hintergrund	B10.BR
Referenz	van Santen et al., 2004; Obst et al., 2005

Ii-rTA ist ein doppelt transgener Stamm (IiS2xTIM), der sowohl das An-, als auch Abschalten der Antigenpräsentation des Peptides MCC₉₃₋₁₀₃ auf H2-E^k erlaubt. Eine Behandlung mit Doxzyklin induziert die Antigenpräsentation, während Entzug die Präsentation abschaltet. Das System besteht aus der S2-Mutante des Tetrazyklin-Transaktivators unter der Kontrolle des Ii-Promotor und dem H-2-E α -Enhancer.

TIM (Tet-inducible invariant chain with MCC) besteht aus dem Tetrazyklin-Operator (tetO), dem CMV minimalen Promotor und der invarianten Kette, in der die CLIP-Sequenz durch MCC₉₃₋₁₀₃ ersetzt ist. Der Transaktivator kann bei Anwesenheit von Doxozyklin den tet-Operator binden und so das TIM-Transgen exprimieren.

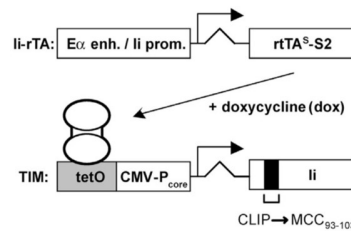


Abbildung 4: li-rTA Schema

Enh. = Enhancer, prom. = Promotor, tetO = Tetrazyklin-Operator, CMV-P = CMV minimaler Promotor, CLIP = Klasse II-assoziiertes invariantes Kettenpeptid, MCC = Motten-Zytochrom c

Darstellung des transgenen li-rTA Schemas: Der Transaktivator rtTA^S-S2 steht unter der Kontrolle des li-Promotors und dem H-2-E α -Enhancer. Er kann bei Anwesenheit von Doxozyklin den tet-Operator binden, was wiederum das TIM-Transgen exprimiert. Unter dieser Kontrolle und dem CMV-P wird die invariante Kette exprimiert, deren CLIP-Sequenz durch MCC₉₃₋₁₀₃ ersetzt ist. aus *Obst et al., 2005*.

7.1.5 C57BL/6

Black 6 Mäuse wurden in Immunisierungsexperimenten mit SRBC als Wildtypkontrolle benutzt. C57BL/6 ist einer der am weitesten verbreiteten Inzuchtstämme in der medizinischen Forschung.

7.1.6 B10.BR

Referenz Stimpfling and Richardson, 1965

B10.BR exprimieren den H-2E Haplotyp k und wurden als Wildtypkontrollen benutzt. Sämtliche benutzten transgenen Linien werden auf dem B10.BR-Hintergrund gehalten. C57BL/6-Tiere tragen den Haplotyp H-2-A^b, während B10.BR H-2-E^k trägt. Die beiden Stämme sind somit nicht histokompatibel.

7.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
-------	--------	------------

Casy Cellcounter	Casy Modell TT	Innovatis
Flockeneisbereiter	AF 20	Scotsman
Kamera	PowerShot A640	Canon
Laminarstrombank	Hera sage 18/2	Heraeus Instruments
Mikroskop	Laborvert FS Type 090-127.012	Leitz
PCR-Maschine	TADVANCED 96G	Biometra
PCR-Maschine	Thermoblock T-1	Biometra
Pipetten	2 µl	Glison
Pipetten	20 µl/200 µl/1000 µl	Eppendorf
Power Supply Electrophoresis		Pharmacia Biotech
Präzisionswaage	L420P-*A2	Sartorius GmbH Göttingen
Rotatormixer	PTR 35	Grant Instruments
Streifenzentrifuge	sprout	Kisker
UV-Lampe	BA-IC-350-M 312 nm	INTAS
Vortex	REAX 1DR	Heidolph
Vortex	REAX 2000	Heidolph
Vortex	Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Wasserbad	M12	mgw LAUDA
Wasserbad Thermostat	MT/2	mgw LAUDA
Zentrifuge für 1,5 ml	centrifuge 5417 C	Eppendorf
Zentrifuge für 1,5 ml	centrifuge 5417 RS	Eppendorf
Zentrifuge für 10-50 ml	Rotanta 46 RS	Hettich
Zentrifuge für 10-50 ml	Rotanta 460 R	Hettich
Zytometer	Canto 1	BD Bioscience
Zytometer	Canto 2	BD Bioscience
Zytometer	FACSCalibur	BD Bioscience

Tabelle 2: Geräte

Auflistung der Geräte, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.3 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro 5.2.1	Becton, Dickinson
Filemaker Pro 12	Filemaker Inc.
FlowJo 8.8.7	Tree Star, Inc.
Office 2010 for Mac	Microsoft
Prism 5.3	GraphPad

Tabelle 3: Software

Auflistung der Software, die für die Auswertung der dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.4 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Hersteller	Modell
96-Lochplatte	Diagonal	
feine Filter	Thomapor, Reichelt Chemietechnik	Porengröße 100 µm
Kanülen	Braun	Sterican 23G
MACS anti-Biotin Beads	Miltenyi Biotec	
MACS-Magnet	Miltenyi Biotec	
MACS-Säule	Miltenyi Biotec	
Objektträger	Diagonal	Objektträger mit rauen Enden
Pasteurpipetten	Diagonal	3 ml
PCR-Reagierstreifen	Brand	
Petrischale	Diagonal	60 mm
Pipettenspitzen	Starlab	2/10 µl
Pipettenspitzen	Starlab	20 µl
Pipettenspitzen	Starlab	200 µl
Pipettenspitzen	Starlab	1000 µl

Reagiergefäß	Sarstedt	1,5 ml
Reagiergefäß	Sarstedt	2 ml
Röhrchen	BD Falcon	14 ml Rundbodenröhrchen
Röhrchen	Cell Star	15 ml Röhrchen mit konischem Boden
Röhrchen	Cell Star	50 ml Röhrchen mit konischem Boden
Spritze	Braun	Omnifix-F 1 ml
Spritze	Braun	Omnican 100
Spritzenfiltereinheiten	EMD Milipore	0,22 µm Millex® Filtereinheiten
Zellsieb	BD Falcon	Porengröße 100 µm

Tabelle 4: Verbrauchsgegenstände

Auflistung der Verbrauchsgegenstände, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.5 Antikörper und Zellfarbstoffe

Antigen	andere Namen	Markierung	Klon	Hersteller	verwendete Verdünnung
Bcl-6		PE	K112-91	BD Bioscience	1:50
CD11b		Biotin	M1/70	BioLegend	1:20
CD11c		Biotin	N418	BioLegend	1:20
CD138		PE	281-2	BioLegend	1:400
CD185	CXCR-5	Biotin	L138D7	BioLegend	1:50
CD278	ICOS	PE	15F9	BioLegend	1:400
CD279	PD-1	FITC	J43	eBioscience	1:50
CD4		PE-Cy7, BV510	Gk1.5	BioLegend	1:400
CD44		PE-Cy7	IM7	BioLegend	1:400

CD45.1		Al-647, PerCp	A20	Biolegend	1:400	
CD45R		PE-Cy7, Biotin	RA3-6B2	BioLegend	1:400	1:12,5
CD49		Biotin	DX5	BioLegend	1:20	
CD62L		PE	MEL-14	BioLegend	1:400	
CD8		Biotin	53-6.7	BioLegend	1:12,5	
CD90.1	Thy1a	Al-647, PerCp	OX-7	BioLegend	1:400	
CD90.2	Thy1b	PE	30-H12	BioLegend	1:400	
CD95	Fas	PE	15A7	eBioscience	1:400	
CFSE				invitrogen	10 µM	
CTV				life Technologies	10 µM	
Fcy-Block			2.4G2	BioLegend	1:400	
FVD 660				eBioscience	1:1000 in PBS	
FVD780				eBioscience	1:2000 in PBS	
GL7		Biotin	GL7	eBioscience	1:400	
GR-1		Biotin	RB6-8C5	BioLegend	1:20	
HyHEL9		FITC		im Labor konjugiert	1:400 in PBS	
IgD		FITC	11-26c.2a	BioLegend	1:400	
IgG1		FITC	RMG1-1	BioLegend	1:400	
IgG2a		FITC	RMG2a-62	BioLegend	1:400	
IgG2b		FITC	RMG2b-1	BioLegend	1:400	
IgM		PerCp	EMM-1	BioLegend	1:400	
PNA		Biotin		Vector	1:5000	
SA		APC		BioLegend	1:1000	
SA		FITC		eBioscience	1:1000	
SA		PE-Cy5.5		eBioscience	1:1000	
TCR-Vα11		FITC	RR8-1	BioLegend	1:400	

Tabelle 5: Antikörper und Zellfarbstoffe

Auflistung der Antikörper und Zellfarbstoffe, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.6 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
(NaH ₄) ₂ SO ₄	Fisher Scientific
1kb Gene Ruler, DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl	Thermoscientific
α-D-Glucose	Carl Roth
Agarose, PeqGold Universal	peQlabs
Antibiotika/Antimykotika	PAA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fisher Scientific
D-Mannitol	Diagonal
Doxyzyklin	AppliChem
ECDI	Thermoscientific
EDTA	Fisher Scientific
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	GLN Chemikalien Laborbedarf
Ethidiumbromid	AppliChem
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Ficoll LSM 1077	GE Healthcare
FoxP3 Kit für intrazelluläre Färbungen	eBioscience
Gelatine	Sigma Chemical Co.
Glycerin	Merck
HEL	Sigma Aldrich
HEPES	PAA
KH ₂ PO ₄	Fisher Scientific
L-Glutamin	PAA
MCC	Peptides & Elephants
MgCl ₂	Fisher Scientific
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Fisher Scientific

Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇	Merck
NaCl	Fisher Scientific
Orange G	Sigma Aldrich
PCC	Sigma Aldrich
Proteinase K	Diagonal
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640	PAA
Taq Polymerase	VWA
Tissue Tek	Sakura Finetek
Triton X-100	Fisher Scientific
Tris	Fisher Scientific
Trypanblau	Carl Roth

Tabelle 6: Chemikalien

Auflistung der Chemikalien, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.7 Lösungen und Puffer

Lösung oder Puffer	Name	Zusammensetzung
	Alsevers Lösung	0,11 M Glucose; 72 mM NaCl, 27 mM Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇
	CASYton	von OMNI Life Science
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	
DMEM + BSA	FACS Medium	DMEM; 1 mM HEPES; 1% BSA
	Ficoll LSM 1077	von GE Healthcare
	Gitocher Puffer, 10x	0,67 M TRIS; 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 65 mM MgCl ₂ ; 0,1% Gelatine; pH 8,8

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	
	MACS Medium entgast	PBS; 1 mM EDTA; 0,5% BSA
	Mannitol-Lösung	0,35 M Mannitol, 0,01 M NaCl
Phosphate buffered saline	PBS	1,5 M NaCl; 80,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 19,6 mM KH_2PO_4
Polymerasekettenreaktionspuffer	PCR-Puffer	
	Proteinase-K-Puffer	1x Gitocher Puffer; 0,3 mg/ml Proteinase K; 0,5% Triton X-100; 1% b-Mercaptoethanol
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	TAE-Puffer 50x	2 M TRIS; 5,7% Essigsäure; 0,5 M EDTA; pH 8
TRIS-EDTA-Puffer	TE-Puffer	10 mM TRIS; 1mM EDTA; pH 7,6
	Zellkulturmedium	RPMI1640; 10% fetales Kälberserum; 2 mM L-Glutamin; 50 μM 2-Mercaptoethanol; 100 Einheiten/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin; 0,25 μg Amphotericin B

Tabelle 7: Lösungen und Puffer

Auflistung der Lösungen und Puffer, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.8 Zellen

Name	Abkürzung	Hersteller
Mauserythrozyten	MRBC	innovative Research inc.
Schafserythrozyten	SRBC	ACILA

Tabelle 8: Zellen

Auflistung der Zellen, die für die dargestellten Experimente benutzt wurden.

7.9 Oligonukleotide

Name	Sequenz	im Nachweis für	Hersteller
RO235	CTCATCTCAAACAAGAGCCA	li-rTA, sense	Eurofins
RO236	CACTGCTTACTTCCTGTACC	li-rTA, antisense	Eurofins
RO281	GTCTCAGAAGTGGGGGCATA	liMCC oder TIM, sense	Eurofins
RO282	GGACAGGCATCATACCCACT	liMCC oder TIM, antisense	Eurofins
RO295	CAGGCCACCACTGCTTACTT	li-rTA, sense	Eurofins
RO296	ATCTTCCAGTTCACGCCATC	li-rTA, antisense	Eurofins
RO375	CAGGGCCAGCCAAAGTATTG	SWHEL LC, sense	Eurofins
RO376	TCCAACCTCTTGTGGGACAGTT	SWHEL LC, antisense	Eurofins

Tabelle 9: Oligonukleotide

Auflistung der Oligonukleotide, die für die Typisierungen benutzt wurden.

7.10 Genotypisierung

7.10.1 Typisierung

Alle Mäuse wurden genotypisiert, um festzustellen, ob die jeweiligen Züchtungen erfolgreich verlaufen sind und die Tiere die erforderlichen Gene tragen. Das heißt, dass informative DNA-Fragmente mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA amplifiziert und mittels nachfolgender Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden. Ethidiumbromid, ein in Doppelstrang-DNA interkalierender und dann fluoreszierender Farbstoff, visualisiert diese DNA-Fragmente und der Genotyp

der Mäuse kann anhand des dadurch sichtbaren Bandenmusters in der Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden (Abb. 5).

7.10.2 Vorbereitung und DNA-Isolierung

Dem Tier wurde weit distal die Schwanzspitze entfernt und das Gewebe mit Proteinase K in PK-Puffer mindestens 6 Stunden bei 56°C verdaut. Anschließend wurde die Proteinase K im Thermocycler bei 95°C inaktiviert. Das Gewebelysat, das die nicht purifizierte DNA enthielt, wurde mit TE-Puffer verdünnt (ein Teil Lysat zu neun Teilen Puffer). Hiervon wurde 1 µl in der PCR verwendet.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine weitere Methode des Verdaus eingeführt. Die distalen Schwanzenden wurden einzeln in 8-Loch-Streifen aufgesammelt. Anschließend wurden 100 µl NaOH (50mM) hinzu pipettiert und die Streifen für 45 Minuten bei 95°C im Thermocycler erhitzt. Nach Zugabe von 10 µl Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) ist die DNA bereit für die nächsten Schritte, wobei sie hier nicht mehr in TE verdünnt wurde. Qualitativ ergab sich kein Unterschied der beiden Methoden. Die zweite Methode des Verdaus ist deutlich zeitsparender.

7.10.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1983 von Kary Mullis erfunden und dient der gezielten DNA-Amplifizierung. Für ihre Erfindung wurde Mullis 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt (Weblink #1). In einem Thermocycler wird die DNA zuerst bei hoher Temperatur denaturiert, der Doppelstrang trennt sich. Wird die Temperatur heruntergefahren, erlaubt das den im Mix enthaltenen Oligonukleotiden (Primer) an komplementäre Sequenzen der vorgelegten DNA zu binden. Dies wird als Annealing bezeichnet, wobei die Basenzusammensetzung der Primer die Temperatur bestimmt, bei der eine Bindung stabil möglich ist (Annealingtemperatur). Eine dem Puffer zugegebene, thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert in Richtung des 3' Endes einen komplementären Strang. Dieser Schritt wird als Elongation bezeichnet. Die Primersequenzen werden so gewählt, dass sie die Synthese eines für die zu typisierenden Sequenzen binden und sie sich in Ihrer Annealingtemperatur nicht zu stark unterscheiden. Wiederholungszyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation ermöglichen die exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts.

Oligonukleotid-Stocklösungen wurden steril in Wasser verdünnt (1 Teil Oligonukleotide zu 9 Teilen PCR-Wasser) und zusammen mit PCR-Wasser, PCR-Puffer, Enhancer, dNTPs und Taq-Polymerase zu einem Mastermix zusammen pipettiert. Pro DNA-Probe wurden hier 15,875 µl PCR-Wasser, 2,5 µl PCR-Puffer, 2,5

µl Enhancer, je 1,25 µl der verdünnten Oligonukleotide, 0,5 µl dNTPs und 0,125 µl Taq-Polymerase zusammengefügt. 1 µl der verdünnten DNA-Probe wurde in eine PCR-Platte vorgelegt, 24 µl des Mastermix hinzugegeben und die Platte zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt durchmischt den Platteninhalt und sammelt die Lösung am Boden der Platte. Zu jeder Probe wurden 25 µl PCR-Öl als Verdunstungsschutz gegeben bevor die Platte in den Thermocycler gestellt wurde, der dann das oben beschriebene Temperaturprogramm für 35 Zyklen durchführte. Es wurde ein sogenannter Hot-Start durchgeführt, bei dem sowohl Deckel als auch Plattenblock des Thermocyclers erst auf 95° erhitzt wurden bevor die Platte platziert wurde.

7.10.4 PCR-Programm

Programmschritt	Dauer	Temperatur	
primäre Denaturierung	5 Minuten	95°C	
Denaturierung	30 Sekunden	95°C	Zyklus
Primerannealing	30 Sekunden	55°C	
Elongation	45 Sekunden	72°C	
letzte Elongation	5 Minuten	72°C	

Tabelle 10: PCR-Programm

Nach initialer Denaturierung (5 Minuten bei 95°C) der Oligonukleotid-Stocklösungen erfolgten 35 Zyklen (grau hinterlegt) von Denaturierung (30 Sekunden bei 95°C), Primerannealing (30 Sekunden bei 55°C) und Elongation (45 Sekunden bei 72°C). Abschließend eine letzte Elongation (5 Minuten bei 72°C) vor der Gelelektrophorese.

7.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird an ein sich in Laufpuffer getauchtes Flachgel elektrische Spannung angelegt. Die DNA, die in Geltaschen vorgelegt wurde und unter den Pufferbedingungen negativ geladen ist, wandert im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Bei der Gelierung bildet Agarose Wasserstoffbrückenbindungen aus. In Abhängigkeit der Konzentration von Agarose bilden sich unterschiedlich große Poren, die die Trenneigenschaften des Gels bestimmen. DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge laufen so unterschiedlich weit. Zusätzlich wird dem Gel Ethidiumbromid zugegeben, welches in Nukleinsäurestränge interkaliert und rot unter UV-Licht fluoresziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde 1,5% Agarosegel hergestellt. 2,25g Agarose wurden in 150 ml einfach konzentriertem TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Das Erhitzen wurde immer wieder unterbrochen und der Lösungsvorgang durch schwenken unter Sicht kontrolliert. Die Lösung wurde mit 2-3 Tropfen Ethidiumbromid versetzt, leicht abgekühlt und in dafür vorbereitete Gelschlitten gegossen. Für die Ausbildung von Geltaschen zur Probenapplikation wurde ein Kamm in die Gellösung gehängt und das Gel um die Kämme herum erkalten gelassen. Der Kamm wurde nach dem Auspolymerisieren des Gels vorsichtig entfernt, der Gelschlitten in die Laufkammer gelegt und mit Laufpuffer (TAE-Puffer) überschichtet. Für die Elektrophorese wurde die PCR-amplifizierte DNA mit Probenpuffer, der Glycerin (zur Erhöhung der Dichte) und der Farbstoff Orangen G (zur optischen Kontrolle des Gellaufs) enthält, versetzt. Die DNA-Proben wurden in laufpuffergefüllte Geltaschen vorgelegt. Die Proben sinken in die Taschen, da der Ladepuffer eine höhere Dichte besitzt als der Laufpuffer. Zur Größenbestimmung und zum Vergleich wurde ein Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge als Marker verwendet und in eine dafür ausgewählte Geltasche pipettiert. Die DNA wurde mittels 1.5% Agarosegelen bei 8-10 V/cm Gellänge für 20 Minuten aufgetrennt. Zur Beurteilung wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

7.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting = FACS) erlaubt in kurzer Zeit die Phänotypisierung einzelner Zellen in großer Zahl. Dabei werden Lichtbrechungseigenschaften und Fluoreszenzsignale ausgenutzt, um Informationen über Größe, Granularität und differentiell exprimierte Antigene (Marker) von einzelnen Zellen zu gewinnen und so Zelltypen voneinander zu unterscheiden. So kann zum Beispiel die Reinheit einer Zellsuspension beurteilt und der Phänotyp unterschiedlichster Zellen analysiert werden.

7.11.1 Zellpräparation

Um FACS-Analyse, Aufreinigungen und Transfers durchzuführen, mussten die Zellen zunächst aus ihrem Gewebeverband herausgelöst und in Suspension gebracht werden.

7.11.1.1 Vorbereitung

Spendermäuse wurden im Vorfeld nummeriert, nach Ohrlochung identifiziert und in einer Kammer mit CO₂ getötet. Die Mäuse wurden hier 3 Minuten lang mit 100% CO₂ begast. 5 ml FACS-Medium wurde steril in 14 ml Röhrchen mit Deckel abgefüllt und auf Eis gestellt.

7.11.1.2 Organentnahmen: Milz, Lymphknoten

Je nachdem, ob nur Milzen oder auch andere Organe benötigt wurden, wurden diese auf unterschiedlichen Wegen aseptisch entnommen. Die toten Tiere wurden auf einer Styroporplatte mit 70% Ethanol desinfiziert. Für einfache Splenektomien ist ein lateraler Zugang praktikabler. So wurden die Tiere auf die rechte Seite gelegt, Bauchdecke und Peritoneum seitlich unter dem Rippenbogen geöffnet und die Milz mit einer Pinzette stumpf herauspräpariert. Für andere Präparationen wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und die Haut ventral vom Schwanzansatz bis zum Unterkiefer aufgetrennt, wobei das Peritoneum möglichst nicht verletzt wurde. Die Bauchlappen wurden rechts und links des Rumpfes stumpf präpariert, flach gespannt und mit Kanülen auf der Platte fixiert. Nun wurden inguinale, brachiale und axilläre Lymphknoten mit spitzen Pinzetten entfernt und in die 14 ml Röhrchen mit dem vorbereiteten FACS-Medium gegeben. Waren zudem auch Splenozyten gebraucht, wurde das Peritoneum nachfolgend eröffnet, die Milz mit einer anatomischen Pinzette stumpf herauspräpariert und ebenfalls in Röhrchen mit vorbereitetem FACS-Medium gegeben.

7.11.1.3 Herstellen einer Einzelzellsuspension

Einzelzellsuspensionen wurden auf zwei Wegen hergestellt. Für einfache FACS-Analysen wurden die gewonnenen Gewebe zwischen den rauen Seiten von zwei Objektträgern in einer kleinen Petrischale zerrieben und die Suspension durch grobe Gaze in 14 ml Röhrchen zurückpipettiert. Nachfolgend wurde die Lösung 5 Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 5 ml FACS-Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

Um Zellen für adoptive Transfers aufzureinigen, wurden die Organe in eiskaltem FACS-Medium unter der Sterilwerkbank mit der Rückseite eines Spritzenstempels durch einen sterilen Filter (Porengröße 100 µm) gerieben und die Suspension zurück in ein Röhrchen überführt, zentrifugiert, das Pellet in 5 ml resuspendiert und die Zellen gezählt.

Für die Gewinnung von Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen wurden diese zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies mit Hilfe von Ficoll durchgeführt. Dazu wurden 3 ml der gebrauchsfertigen Ficoll-Lösung unter die Zellsuspension geschichtet und das Röhrchen mit reduzierter Bremse bei 400 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugationskräfte werden die Zellen in kurzer Zeit aufgrund ihrer Dichte auf diesem Stufengradienten getrennt. Ficoll ist ein Saccharose-Polymer mit vernachlässigbarer Osmolarität. Die Dichte (Ficoll: 1,077 g/ml) ist geringer als die Dichte Granulozyten (ca. 1,08 g/ml) und Erythrozyten (ca. 1,10 g/ml), aber höher als die von Lymphozyten und Monozyten (ca. 1,07 g/ml). Granulozyten und Erythrozyten finden sich so

nach der Zentrifugation im Pellet, während die anderen mononukleären Zellen sich in der sogenannten Interphase oberhalb der Ficoll-Schicht sammeln. Zu heftiges Abbremsen am Ende der Zentrifugation würde Turbulenzen verursachen und die Trennschärfe der Interphase reduzieren. Die Zellen der Interphase wurden mit einer 3 ml Pasteurpipette aufgenommen, in ein neues Röhrchen transferiert und mit 5 ml FACS-Medium aufgefüllt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 5 ml FACS-Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

7.11.1.4 Bestimmung der Zellzahlen

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe von Trypanblau und einer Zählkammer (Neubauer; Tiefe: 0,1 mm, 0,0025 mm²) bestimmt. Die Membranen toter Zellen verlieren ihre Semipermeabilität, wodurch sie sich, im Gegensatz zu lebenden Zellen, durch Trypanblau anfärben lassen. Unter dem Lichtmikroskop zeigen sich so zwei unterschiedliche Populationen. Die lebenden, nicht anfärbbaren Zellen eines Aliquots wurden gezählt. Durch Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren durch Vorverdünnung und Zugabe von Trypanblau kann die Zellzahl der Probe ermittelt werden.

Die zweite Möglichkeit bestand darin die Zahlen vom Casy Cellcounter bestimmen zu lassen. Zellen wurden in 5 ml resuspendiert und 5 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton aufgenommen. Das Gerät zählt die Zellen und mit Beachtung der Verdünnung konnte die absolute Zellzahl der jeweiligen Probe errechnet werden.

7.11.2 Durchflusszytometrie Grundlagen

7.11.2.1 Fluoreszenz

In der Durchflusszytometrie werden Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmarker mit Farbstoffen gekoppelt, die durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden können. Elektronen werden mithilfe der absorbierten Energie vom höchsten besetzten Orbital (Ursprungszustand) in das nächst höhere angeregt. Bei der Rückkehr in den Ursprungszustand wird Energie frei, die vor allem als Licht einer längeren Wellenlänge emittiert wird. Mit dem monochromatischen Licht von Lasern verschiedener Wellenlänge können unterschiedliche Farbstoffe angeregt werden. Dies wird in Durchflußzytometern ausgenutzt. Mit der Laseranzahl nimmt die Anzahl, der anregbaren Fluorochrome und so der messbaren Parameter zu. Die Emission kann gemessen werden und wird in der Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Mit dem Analyseschritt kombiniert können durch Tröpfchenbildung und Tröpfchenablenkung im elektrischen Feld Zellen auch sortiert werden (FACS = fluorescence activated cell sorting), was im

Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genutzt wurde. Hier wurden Zellen gegebenenfalls magnetisch aufgereinigt (siehe *Kap. 8.12*).

7.11.2.2 Färbungen

Zu detektierende Zellmarker können intrazellulär und/oder extrazellulär durch spezifische, fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper nachgewiesen werden.

7.11.2.3 Extrazelluläre Färbungen

Die präparierte Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert, alle Zellen des Pellets in 200 µl FACS-Medium aufgenommen und in eine 96-Loch-Platte übertragen. Wurden mehrere Färbungen durchgeführt, wurde die Suspension in entsprechend viele Aliquots aufgeteilt. Die Platte wurde dann eine Minute bei 400 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und die Überstände durch Abgießen verworfen. Ein Mastermix mit den gewählten Antikörpern wurde hergestellt. Die verwendeten Verdünnungen sind der *Tabelle 5: Antikörper* zu entnehmen. Pro Loch wurden 50 µl vorbereitet. Weitere 50 µl wurden für die jeweiligen Einzelfärbungen hergestellt. Die Antikörpergemische wurden bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C in einer kühlbaren Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert, um komplexierte Antikörper zu pelletieren. Je 50 µl des Antikörpergemisches wurden auf die Zellen gegeben, mit ihnen vermischt und mindestens 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Platte 1 Minute bei 400 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Wurde kein Sekundärantikörper benötigt, war die Probe nach Resuspendierung in 200 µl FACS Medium bereit zur Analyse.

Wenn biotinylierte, spezifische Antikörper benutzt wurden und dadurch Sekundärreagenzien vonnöten waren, wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und mit 50 µl Sekundärreagenziengemisch für mindestens 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die Bindung von Biotin erfolgte über Streptavidin, das an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt ist. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Platte eine Minute bei 400 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach Resuspension in 200 µl ist die Probe bereit zur Analyse.

Einen weiteren Sonderfall stellte die Färbung von liMCCxSW B-Zellen dar. Die methodischen Unterschiede zu anderen extrazellulären Färbungen sind im Folgenden erläutert. Der HEL-spezifische B-Zell-Rezeptor (HyHEL10) wurde indirekt nachgewiesen. HyHEL9 ist ein Antikörper, der ein anderes (nicht überlappendes) Epitop von HEL erkennt. So konnte nach 10-minütiger (bei 4°C) Inkubation der Suspensionen mit HEL (2,5 µg/ml HEL in PBS gelöst (HEL-Stammlösung (1 mg/ml in PBS) 1/400 in PBS verdünnt) die Bindung von HEL an die B-Zellen mit ihm nachgewiesen werden.

HyHEL9 musste in DMEM+HEPES ohne BSA verdünnt werden, da die Färbung anderenfalls nicht funktionierte. So wurden die Zellen nach der Inkubation mit HEL in DMEM+HEPES ohne BSA gewaschen und pelletiert (3 Minuten bei 400g, 4°C). Anschließend wurden die Pellets in 50 µl des Antikörpergemisches in DMEM+HEPES ohne BSA resuspendiert und für mindestens 15 min inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Platte eine Minute bei 400 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Probe ist nach Resuspendierung in 200 µl FACS Medium bereit zur Analyse.

7.11.2.4 Intrazelluläre Färbungen

Einige Marker, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, sind nur intrazellulär nachweisbar und auch Igs wurden zusätzlich intrazellulär gefärbt. Dazu mussten die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Mehrere Kits sind hierfür im Handel erhältlich. Bei den beschriebenen Experimenten kam das FoxP3-staining Kit von eBioscience zum Einsatz. Für intrazelluläre Färbungen wurden Oberflächenmarker erst, wie oben beschrieben gefärbt und die notwendigen Puffer für die weiteren Prozesse hergestellt. Die Zellen verblieben nach der Oberflächenfärbung in der 96-Loch Platte. Für den Fixationspuffer wurde das Fixationskonzentrat 1 zu 3 Teilen Fixation Diluent (nach Angaben des Herstellers) verdünnt. Ebenso wurde der 10x Perm-Puffer für die weiteren Färbeschritte 1 zu 9 mit destilliertem Wasser gemischt. Die Antikörper wurden in Perm-Puffer verdünnt. Die oberflächengefärbten Zellen wurden noch ein weiteres Mal in FACS-Medium gewaschen (3 Minuten bei 400 g, 4°C), dann pelletiert (3 Minuten bei 400g, 4°C) und in 100 µl des hergestellten Fixationpuffers resuspendiert. Diese Suspensionen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden 100 µl des Perm-Puffers hinzugegeben und die Zellen bei Raumtemperatur pelletiert (alle folgenden Zentrifugationen erfolgten für 3 Minuten bei 400g und RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Pellets in 50 µl 1:400 verdünntem FCγ-Block resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Löcher wurden mit 150 µl Perm-Puffer aufgefüllt und die Platte zentrifugiert. Nun wurden 100 µl der intrazellulären Antikörper (Verdünnungen in Perm-Puffer) zu den Zellen gegeben und die Proben wieder in Suspension gebracht. Hierauf folgte eine Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten, wonach die Zellen zwei Mal in Perm-Puffer gewaschen und zur Analyse am Durchflusszytometer in FACS-Medium resuspendiert wurden.

7.11.2.5 Probenvorbereitung für den Nachweis von Proliferation mittels Zytofluorimetrie

Um Proliferation von transferierten Zellen abzuschätzen wurden diese entweder mit cell trace violet (CTV) oder Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) beladen („gelabelt“). Diese beiden fluoreszierenden

Farbstoffe verteilen sich bei der Zellteilung gleichmäßig auf Tochterzellen. Die Intensität ihrer Fluoreszenz nimmt von Generation zu Generation ab und die Anzahl der Teilungen kann anhand ihrer Intensitätsspitzen bestimmt werden. Verlässlich kann man mit dieser Methode bis zu acht Zellteilungen nachverfolgen.

Vor der Farbstoffbeladung wurde die Zellzahl bestimmt und FCS und PBS mit 0,1% BSA auf 37°C vorgewärmt. Zellen werden in warmem PBS mit 0,1% BSA resuspendiert (500 µl pro 10⁷ Zellen) und bei 37°C inkubiert. Auf laufendem Vortex wird CFSE oder CTV hinzugegeben (0,5 µl einer 5 µM Farbstofflösung in DMSO pro 10⁷ Zellen), das Röhrchen 10 Minuten bei 37°C inkubiert und einmal nach 5 Minuten mit reduzierter Stärke auf dem Vortex gemischt. Nach der Inkubationszeit wird die Suspension mit dem gleichem Volumen FCS unterschichtet und 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in DMEM ohne BSA gewaschen und intravenös in 100 µl i.v. transferiert.

7.11.3 Durchflusszytometrische Analyse

Vor der Analyse wurden die gefärbten Zellen in FACS-Medium durch feine Filter in spezielle FACS-Röhrchen überführt, um die Dichtigkeit am Geräteeinlassstopfen zu garantieren. Je nach Gerät presst angelegter Druck die Suspension aus dem Röhrchen in die Kürette des Zellsorters/Durchflusszytometers (Calibur) oder sie wird angesogen (Canto). Dort wird die Probe von der Trägerflüssigkeit erfasst, in einem laminaren Strom verdünnt und auf einen Konus hin hydraulisch fokussiert. So entsteht in der Messküvette ein Strom, in dem die Zellen einzeln und nacheinander die Messstelle durchlaufen. Anregungslicht wird hier auf die Zellen gerichtet und Sensoren (Photomultiplier) registrieren Vorwärtsstreuung (forward scatter = FSC), deren Grad mit der Größe der Zellen korreliert, und Seitwärtsstreuung (side scatter = SSC), über die Aussagen über die Granularität getroffen werden können. Das Fluoreszenzlicht wird durch Filter, die das Anregungslicht ausblenden, selektiv herausgefiltert und ebenfalls durch Photomultiplier vermessen.

7.11.3.1 Kompensation der Fluoreszenzsignale

Meist haben die oben genannten Filter eine bestimmte Bandbreite, die nicht ganz exakt dem Emissionsprofil der Farbstoffe entspricht. In Teilen wird die Fluoreszenz eines Farbstoffes dadurch auch von Bandfiltern anderer Kanäle hindurchgelassen und das Signal somit nicht von nur einem Photomultiplier registriert. Diese Signalanteile müssen aus den Nebkanälen herausgerechnet werden, um keine falsch-positiven Signale zu erhalten. Die Einstellung entsprechender Korrekturparameter wird als Kompensation bezeichnet und wird anhand von Einzelfärbungen eines Oberflächenmarkers mit verschiedenen Farbstoffen vorgenommen.

7.11.3.2 Auswertung

Die Messparameter (Streulicht- und Fluoreszenzsignale) eines jeden Messereignisses (einer Zelle) werden meist in graphischer Form dargestellt und ausgewertet. Zwei Parameter wurden in sogenannte Contourplots grafisch gegenübergestellt. Einzelne Parameter wurden als Histogramme mit der Signalintensität auf der Abszisse und der Anzahl Ereignisse auf der Ordinate dargestellt.

7.11.3.3 Selektion von Zellpopulationen („Gating“)

Um nur Zellen von Interesse zu beurteilen, können diese anhand ihrer Signalprofile von einzelnen oder von Kombinationen von Parametern selektiert werden. Beispielsweise können über die Auswahl von Größe und Granularität, das heißt über das FSC, SSC- Profil Lymphozyten selektiv dargestellt werden. Diese Auswahl oder diese „Gates“ wurden über die graphische Benutzeroberfläche der Zytofluorimetriesoftware FlowJo 9 definiert, indem eine Region mit Ereignissen mit dem passenden Parameterprofil umzeichnet wird. Dadurch kann festgelegt werden, dass nur Zellen innerhalb dieses Bereichs in der weiteren Auswertung berücksichtigt werden. Durch beliebige Kombination weiterer Messparameter können höherdimensionale Gates definiert werden und so, anhand von Markerprofilen Subpopulationen in der Auswertung dargestellt werden (s. Gatingstrategie Abb. 6 und 7).

7.12 Magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting = MACS)

Prinzipiell können bestimmte Zelltypen aus gemischten Populationen durch positive oder negative Selektion angereichert werden. Das Prinzip der immunomagnetischen Zellseparation, die hier verwendet wurde, beruht auf der Kopplung spezifischer Antikörper an magnetische Träger. Meist sind dies Nanopartikel (beads). Zellen, die Antigene exprimieren, die von so gekoppelten Antikörpern erkannt werden und diese binden, lassen sich in einem magnetischen Feld über Stahlwollsäulen anreichern. Dabei werden Zellen, die immunomagnetische Partikel gebunden haben, beim Durchlauf in der Säule gehalten, während alle anderen Zellen im Durchlauf zu finden sind. Wird die Säule aus dem magnetischen Feld genommen, lassen sich die zurückgehaltenen Zellen einfach mit Puffer aus der Säule auswaschen. Bei positiver Selektion werden die markierten Zellen, die in der Säule verbleiben und später herausgewaschen werden, weiterverwendet, während bei der negativen Selektion die gewünschten Zellen im Eluat gesammelt und analysiert werden. In dieser Arbeit wurden nur durch negative Selektionen sortiert, da so ein geringerer Schwund zu erwarten ist.

Es wurden Einzelzellsuspensionen, wie bereits in *Kapitel 8.11.1.3* geschildert, hergestellt. Das Zellpellet wurde in 100 μ l in einem 10 ml Röhrchen resuspendiert und auf Eis gestellt. Biotinylierte Antikörper, die spezifisch nicht-gewünschte Zellen markieren, wurden für die Anreicherung von B, bzw. T Helferzellen zu folgenden Mastergemischen zusammengestellt:

Folgende Antikörpermischungen wurden auf das Pellet gegeben. Diese inklusive dem Zellpellet in 90 μ l FACS-Medium resuspendiert und für 15 Minuten inkubiert (Volumenangaben sind pro Maus zu verstehen, nachdem Lymphknoten- und Milzsuspension gemischt worden waren).

7.12.1 B-Zell Aufreinigung

8 μ l	CD4	T Helferzellen
8 μ l	CD8	Zytotoxische T-Zellen
5 μ l	CD49	NK Zellen
5 μ l	GR-1	Granulozyten
5 μ l	CD11b	Makrophagen
5 μ l	CD11c	Dendritische Zellen
5 μ l	TER119	Erythrozyten

7.12.2 CD4⁺ T-Zell Aufreinigung

8 μ l	CD8	Zytotoxische T-Zellen
8 μ l	CD45R	B-Zellen
5 μ l	CD49	NK Zellen
5 μ l	GR-1	Granulozyten
5 μ l	CD11b	Makrophagen
5 μ l	CD11c	Dendritische Zellen
5 μ l	TER119	Erythrozyten

5 ml MACS Medium wurden hinzugefügt und fünf Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet erneut in 90 μ l MACS-Medium resuspendiert und 2 μ l für die spätere Analyse der Ursprungszellsuspension entnommen. Die Suspension wurde mit 10 μ l Streptavidinbeads gemischt und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen auf 5 ml mit MACS-Medium aufgefüllt, die Zellen mindestens zweimal mit 5 ml MACS-

Medium gewaschen, in 5 ml MACS-Medium resuspendiert und gezählt. Die MACS-Säule wurde in den Magneten geklemmt und zuerst mit 3 ml MACS-Medium äquilibriert. Jetzt wurden die Zellsuspensionen auf die Säule gebracht und mit 1 g (Schwerkraft) durch die Säule laufen gelassen. Der Durchfluss wurde gesammelt. Die Säulen wurden mit weiteren 3 ml FACS-Medium gespült und mit dem Ersteluat gesammelt. Die aufgefängene Suspension wurde wiederum 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Das Pellet in 5 ml FACS-Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

Das oben erwähnte 2- μ l-Aliquot und ein Aliquot der gereinigten, aufgefängenen Suspension wurde wie in *Kapitel 8.11.2.3 extrazelluläre Färbungen* beschrieben mit SA-PE und CD45R-PE-Cy5.5 für B-Zellen und SA-PE und CD4-AL647 für T-Zellen gefärbt und am Durchflusszytometer auf seine Reinheit überprüft.

7.13 Proteinkonjugation an SRBC und MRBC

Schafserythrozyten (sheep red blood cells = SRBC) sind ein beliebtes Immunogen, das starke T-Zell-abhängige Antikörperreaktionen hervorruft. Ihre Charakteristika wurden hier zum Teil mit Ergebnissen aus einem doppeltransgenen System verglichen. Wurden spezifische Immunantworten untersucht, wurden SRBC oder auch MRBC (Mauserythrozyten) nach Kipp & Miller mit den Antigenen gekoppelt, auf die transgenen Mauslinien spezifisch reagieren (Kipp et al., 1980; Phan et al., 2006).

ECDI führt zur Bildung von Carbonsäureamiden, die eine Bindung der Zellen an Proteine erlauben. Gekaufte SRBC waren in Alsevers Lösung gehalten. Nach Modifizierung ursprünglichen Protokolls wurden die Zellen vorbereitend viermal in PBS gewaschen (10 Minuten, 400g, 4°C). Nachfolgend einmal in Mannitol-Lösung gewaschen und wieder in dieser resuspendiert (Vol[*Pellet*/Vol[*Lösung*] = 5%). Die Proteine wurden zu einer 1 mg/ml-Lösung verdünnt und 0,1 ml Aliquots in Eppendorf Gefäße verteilt. 1 ml SRBC Suspension wurde hinzugefügt und nach zehnmütigem durchmischen (rotieren) bei 4°C zusätzlich 0,15 ml der ECDI-Lösung dazugegeben. Diese fertige Reaktionslösung wurde nochmals für 30 min bei 4°C rotiert. Nachfolgend wurde die Suspension in PBS gewaschen. Das Phosphat in PBS reagiert mit ECDI und unterbindet die Kopplung.

Zur Immunisierung wurden die SRBC oder MRBC auf eine Zellkonzentration von 2×10^9 Zellen/ml gebracht und davon 100 μ l intravenös injiziert.

7.14 Adoptiver Zelltransfer

Es wurden je Maus 100 μ l Zellsuspensionen in die laterale Schwanzvene injiziert. Genaue Zellzahlen sind den Beschreibungen der Experimente zu entnehmen.

7.15 Doxyzyklingabe

Doxyzyklin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml im Trinkwasser der Mäuse gelöst. Verwendet wurde Volvic Naturel Mineralwasser, da Doxyzyklin im Münchner Trinkwasser Präzipitate bildete und geringer verfügbar gewesen wäre. Zusätzlich wurden die Flaschen mit Alufolie gegen Licht geschützt und nach 4 - 5 Tagen ausgewechselt.

8. Ergebnisse

8.1 Typisierungen

Alle Zuchttiere wurden genotypisiert, um sicherzustellen, dass genetisch veränderte Mäuse für Experimente richtig ausgewählt werden konnten, d.h. die jeweiligen Transgene trugen. Gewebeproben wurden mit Proteinase K oder Natronlauge verdaut und via PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren und Agarose-Gelelektrophorese auf die entsprechenden genetischen Marker getestet (siehe *Materialien und Methoden Kapitel 8.10 Genotypisierungen*)

In Abb. 5 ist ein beispielhaftes Gelfoto einer Agarosegel-Analyse entsprechender DNA-Amplifikate zu sehen. DNA aller Mäuse (nummerierte Proben), sowie eine sicher positive Probe zeigen hier als Nachweis der Amplifikate die positive Bande der erwarteten Länge, während die Negativprobe diese nicht aufweist. Somit trugen alle diese Mäuse das entsprechende Transgen und konnten für die Experimente verwendet werden.

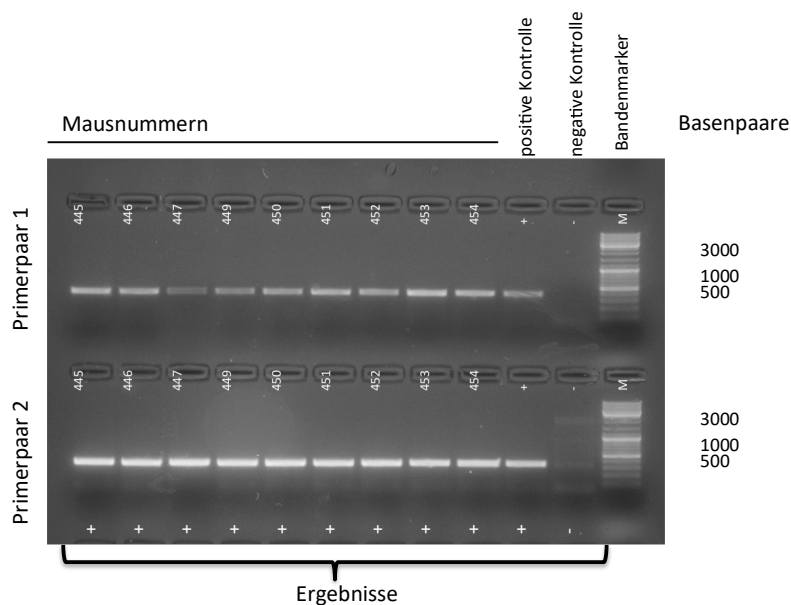


Abbildung 5: Typisierungen

Agarose-Gelelektrophorese eines PCR-Produkts in 1,5% Agarosegel. Getestet wurde auf ein Gen mittels zwei verschiedener Primerpaare. Die Mäuse 445-454, wie auch die positive Kontrolle zeigen allesamt eine positive (+) Bande der richtigen Länge. Die negative Kontrolle (-) enthielt die gleichen Primerpaare, jedoch keine andere DNA.

8.2 Charakterisierung von Zellen vor Transfer

Vor jedem Transfer wurden Aliquots der zu transferierenden Zellsuspension entnommen, bevor die Zellen mit CTV, bzw. CFSE gefärbt wurden. Diese Aliquots wurden auf das Vorhandensein von Zellen mit kongenen Markern, sowie das Tragen der transgenen T-Zell-Rezeptoren von AND-T-Zellen, bzw. B-Zell-Rezeptoren untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivierung der T-Zellen analysiert.

CD44 ist ein Glykoprotein, das in der Interaktion mit Hyaluron, am Leukozytenrolling beteiligt ist, es wird von T-Zellen bei Aktivierung heraufreguliert. CD62-L (L-Selektin), das ebenfalls beim Rolling und Homing eine Rolle spielt, wird parallel herabreguliert (Zimmermann et al., 1996; Zarbock et al., 2011). Nur wenige Prozent der zu transferierenden T-Zellen entsprachen jeweils dem aktivierten Phänotyp CD62^{lo} CD44^{hi} (Abb. 6 A). Auch die zu transferierenden B-Zellen wurden vor ihrem Transfer untersucht. Einerseits auf ihren Anteil an der Suspension, um den Transfer von relativ exakten Zellzahlen garantieren zu können, und auf den Anteil der Zellen mit HEL-spezifischem Oberflächenimmunoglobulin (s. Abb. 6B und Abb. 9, 13, 14, 17).

Waren die Zellen aus Splenozyten und/oder Lymphknotenzellen durch magnetische Sortierung aufgereinigt worden, musste zudem die Effektivität der Anreicherung geprüft werden. Wie in *Materialien und Methoden Kapitel 8.11.2.3 extrazelluläre Färbungen* beschrieben, wurden im Sortierungsprozess Aliquots gefärbt, die vor und nach der Aufreinigung der Zellsuspension entnommen worden waren. Eine Gegenüberstellung von CD4, bzw. CD45R positiven mit Streptavidin-positiven Zellen, stellt die Reinheit der Suspension dar (Abb. 6C). Nur Suspensionen, deren B-Zell-Gehalt über 95% betrug wurden transferiert.

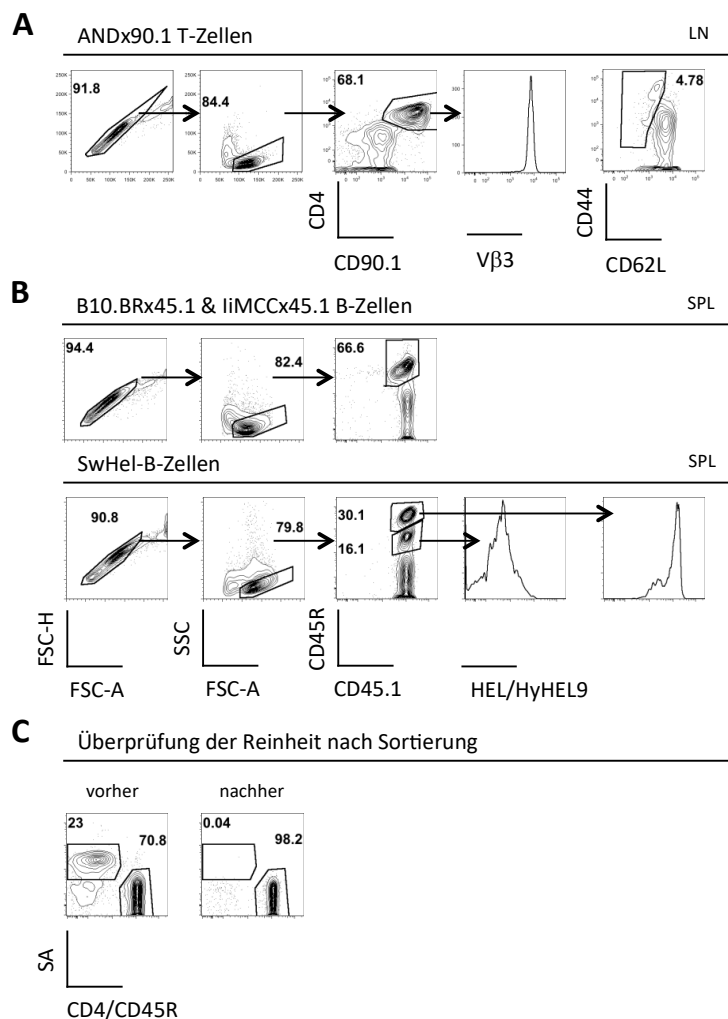


Abbildung 6: Zellcharakterisierung vor Transfer

Legende: LN = Lymphknoten, SPL = Spleen, FSC = Vorwärtsstreuung, SSC = Seitwärtsstreuung, SA = Streptavidin. Gezeigt sind Phänotypen und Aktivierungsmarker vor adoptivem Zelltransfer. Die Gatingstrategie ist durch Pfeile verdeutlicht. **(A)** Zellidentifikation und Aktivierungsanalyse von ANDx90.1 T-Zellen. CD4 als Marker für Helfer T-Zellen; CD90.1 als kongener Marker; V β 3 zum Nachweis des transgenen T-Zellrezeptors; CD62L ist hoch exprimiert auf naiven T-Zellen, CD44 gering. **(B&C)** Identifikation zu transferierender B-Zellen. CD45R als Marker für B-Zellen, CD45.1 als kongener Marker; SW B-Zellen wurden zusätzlich mit HEL inkubiert und anschließend mit HyHEL9 zum Nachweis einer HEL-Bindung gefärbt. **(D)** Reinheitsüberprüfung nach magnetischer Zellsortierung. Vor und nach Sortierung wurden Aliquots mit fluorochrom-konjugiertem Streptavidin, sowie dem Zellmarker, der aufzureinigenden Zellen gefärbt. Die gezeigten Plots sind repräsentativ für alle durchgeführten Experimente.

8.3 Durchflusszytometrische Identifizierung transferierter Zellen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden jeweils 10^6 Zellen adoptiv transferiert. Bei der späteren Endanalyse konnten sie aufgrund der Expressierung eines kongenen Markers und von zelltypspezifischen

Antigenen identifiziert werden. Die Gatingstrategie beinhaltet zunächst die Fokussierung der Analyse auf Einzelzellen (FSC-H gegen FSC-A), dann auf Lymphozyten (FSC-H gegen SSC), darin auf lebende Zellen (FSC-H gegen Fixable Viable Dye = FVD 780), auf Dump-negative (FSC-H gegen CD4 für die Bestimmung transferierter B-Zellen oder CD45R bei Untersuchung transferierter T-Zellen), auf kongene-Marker-positive Zellen (CD4 oder CD45R gegen CD90.1 oder CD45.1) (Abb. 7). Die Analyse weiterer Parameter ist jeweils den einzelnen Experimenten zu entnehmen.

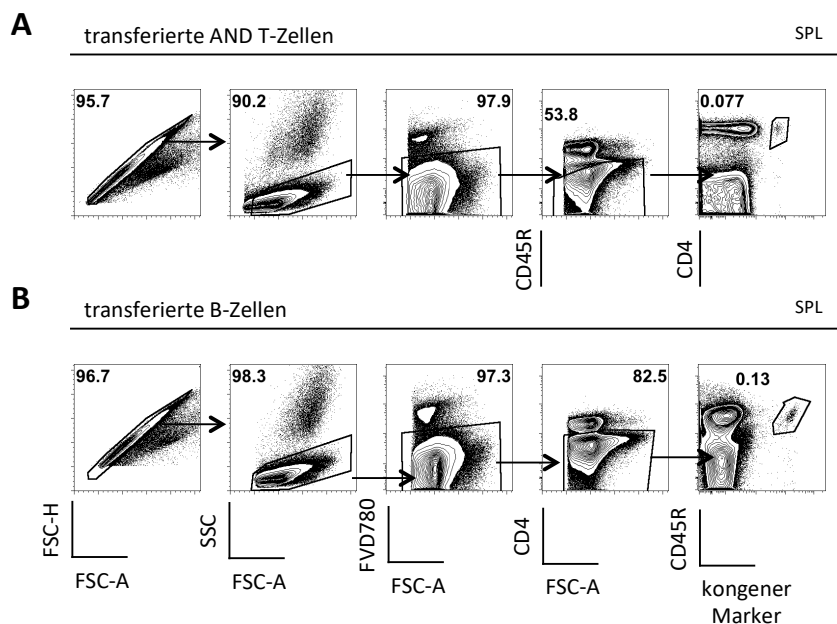


Abbildung 7: Identifizierung transferierter Zellen

Legende: SPL = Spleen, FSC = Vorwärtsstreuung, SSC = Seitwärtsstreuung, FVD = fixable viable dye.

Gezeigt sind Gatingstrategien zur Identifikation transferierter Zellen in Endanalysen von Experimenten. FSC-H (Peak-Intensität) und FSC-A (Flächen-Intensität) korrelieren bei runden Einzelzellen linear, Abweichungen entsprechen Zellklumpen. Einzelzellen wurden anhand dieses Profils ausgewählt und mittels der Granularität (SSC) und Größe (FSC) zum Teil als Lymphozyten identifiziert. Lebende Zellen wurden als Messereignisse erkannt, die den Farbstoff FVD780 nicht aufgenommen hatten. **(A)** Strategie zur Identifikation transferierter AND-T-Zellen. Wie oben beschrieben wurden Lymphozyten bestimmt und anhand von CD4 (Helfer-T-Zellen) und einem kongenen Marker (CD45.1 oder CD90.1), als die jeweils transferierten erkannt. **(B)** Identifikation transferierter B-Zellen. Alle transferierten B-Zellen wurden unter den Lymphozyten als CD45R⁺ (B-Zell-Marker) und CD45.1⁺ (kongener Marker) bestimmt.

8.4 Funktionelle Konsequenzen transienter versus permanenter Antigenpräsentation

Die im Labor etablierten Ii-rTAXTIM Mäuse erlauben es, die Präsentation von MCC auf MHC-Klasse-II durch Doxzyklingabe, bzw. -entzug an und abzuschalten (Obst et al., 2005). AND-T-Zellen erkennen diese Präsentation spezifisch sowohl auf dendritischen Zellen, als auch auf B-Zellen (*siehe Materialien und*

Methoden Kapitel 8.1.4). B-Zell-Antworten sind abhängig von T-Zell-Hilfe (MacLennan, 1994). Tfh-Zellen sind die auf die B-Zell-Hilfe spezialisierten T-Zellen (Crotty, 2011). Da der Einfluss der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen auf diese B-Zell-Hilfe durch differenzierte T-Zellen unklar ist, verglichen wir den Einfluss transienter und permanenter Antigenpräsentation durch dendritische Zellen auf die AND-T-Zell-abhängige liMCC-B-Zell-Proliferation in li-rTAXTIM-Mäusen.

Nur bei permanenter Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen waren AND-T-Zellen in der Lage liMCC-B-Zellen, die ebenfalls das T-Zell-Antigen (MCC) auf MHC-Klasse-II präsentierten (Abb. 8 C&D), zur Proliferation zu verhelfen. Diese Ergebnisse überraschten und sprechen gegen ein zweistufiges Differenzierungsmodell der Tfh-Zellen (Barnett et al., 2014; Goenka et al., 2011). T-Zellen wurden sowohl durch B-Zellen, als auch durch dendritische Zellen zur Proliferation angeregt, wobei sich die Wirkung der Präsentation durch die jeweiligen Zellen additiv auswirkte und die Wirkung der Interaktion mit dendritischen Zellen einen stärkeren Effekt auf die Proliferation hatte (Abb. 8C). Präsentierten nur liMCC-B-Zellen MCC auf MHC-Klasse-II teilten sich die AND-T-Zellen im Schnitt 2,2 mal, während eine transiente Präsentation auf dendritischen Zellen durchschnittlich 3,4 Teilungen und zusammen mit liMCC-B-Zellen 4 Teilungen hervorrief (Abb. 8 D). Wurden die Mäuse jedoch durchgehend mit Doxyzyklin behandelt und somit eine kontinuierliche Antigenpräsentation von MCC auf MHC-Klasse-II der dendritischen Zellen der Wirtstiere erreicht, unterschieden sich die Zahl der Zelldivisionen nicht wesentlich zwischen den Gruppen, denen liMCC- oder WT-B-Zellen transferiert worden waren (Abb. 8 C&D).

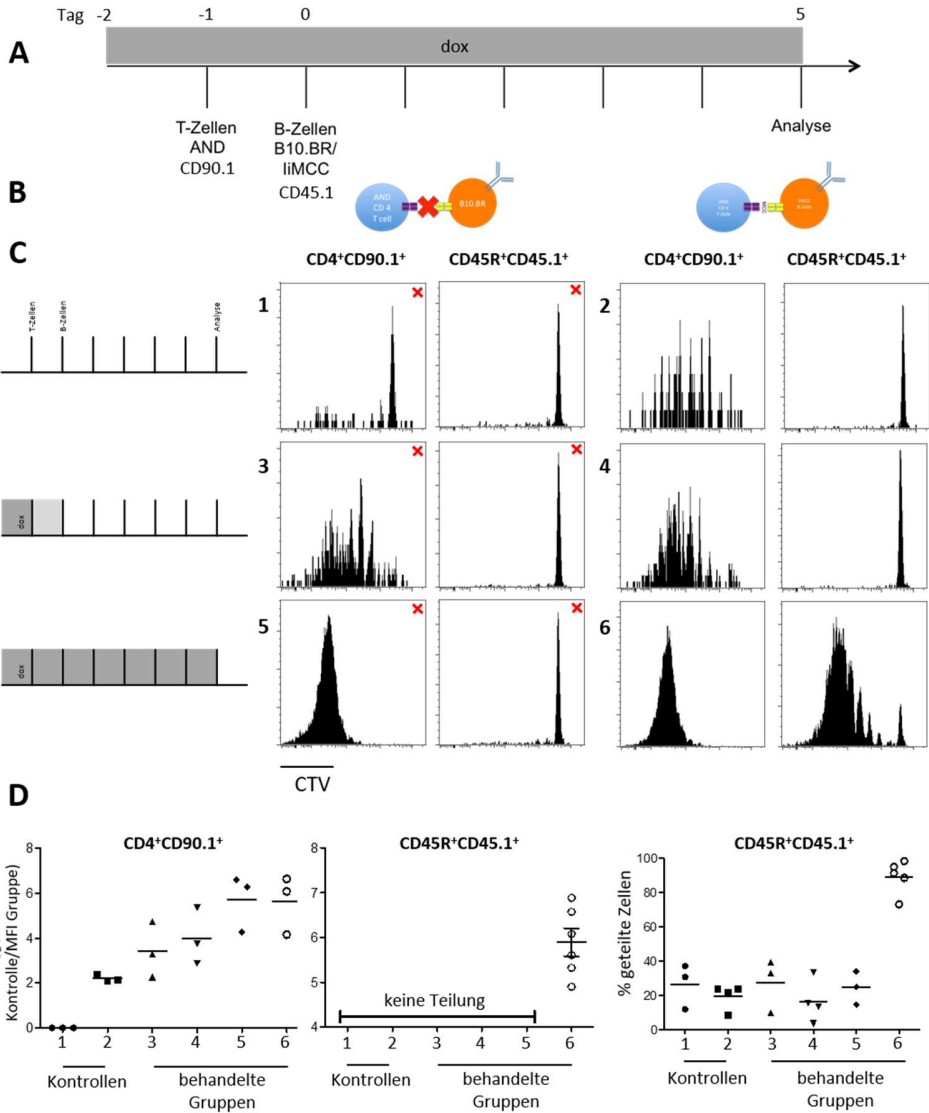


Abbildung 8: T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation benötigt kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.

Legende: dox = Behandlung mit Doxzyklin, CTV = cell trace violet, MFI = mittlere Intensität der Fluoreszenz, x = B10.BR B-Zellen transferiert

Doppelt transgene li-rTAXTIM Mäuse erlauben eine hauptsächlich auf dendritische Zellen beschränkte, durch Doxzyklin induzierbare MCC₈₈₋₁₀₃-Peptidpräsentation auf MHC-Klasse-II. CTV-markierte AND Lymphknotenzellen mit ca. 60% CD4⁺ transgenen Zellen und B10.BR, bzw. liMCC-B-Zellen wurden zu je 10⁶ Zellen adoptiv transferiert und nach keiner (Gruppen 1 & 2), eintägiger (Gruppen 3 & 4) oder durchgehender (Gruppen 5 & 6) Doxzyklinbehandlung an Tag 5 analysiert. **(A)** chronologischer Aufbau des Experiments **(B)** Interaktionsschemata der transferierten Zellen **(C)** Zellproliferation anhand von CTV-Verdünnungen. **(D)** Proliferationsanalyse: Anzahl der Zelldivisionen bezogen auf die Kontrollen (\log_2 MFI Kontrolle/MFI Gruppe) (Graphiken 1 und 2 von links) und Prozentsatz von Zellen, die eine CTV-Verdünnung aufwiesen (rechte Graphik). Graphiken zeigen Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD.

8.5 Expression von keimzentrumsspezifischen Oberflächenmarkern nach SRBC-Immunsierung

T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation benötigt also kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und in Follikeln sind Tfh-Zellen die auf B-Zell-Hilfe spezialisierten T-Zellen (Crotty, 2011). Unklar blieb jedoch, ob der Zelltransfer eine Keimzentrumsreaktion hervorgerufen hatten und die den B-Zellen helfenden T-Zellen tatsächlich zu Tfh-Zellen differenziert waren.

Um Interaktion von T und B-Zellen in li-rTAXTIM Mäusen beurteilen zu können, etablierten wir zunächst die Untersuchung keimzentrumsspezifischer Oberflächenmarker im Kontext der Keimzentrums-bildenden T-Zell-abhängigen Immunantwort gegen Schafserythrozyten (SRBC). Die Antigene der transgenen AND-T-Zellen und Ig-knock-in liMCCxSW-B-Zellen (PCC und HEL) wurden mithilfe von ECDI an SRBC gekoppelt. Sowohl T-Zellen, als auch B-Zellen sind über auf diese Weise der SRBC-gekoppelten Antigene erwiesenermaßen aktivierbar (Yi and Cyster, 2013; Phan et al., 2006). Am ersten Tag des Experiments wurden jeweils 10^6 Zellen AND-Lymphknotenzellen oder liMCCxSW-B-Zellen in B10.BR Mäuse transferiert. Am zweiten Tag wurden SRBC mit PCC und HEL oder BSA (einem irrelevanten Antigen) konjugiert und die Mäuse mit spezifischen (PCC und HEL) oder unspezifischen (BSA) Konjugaten immunisiert (Abb. 9 A).

GL-7 ist als Marker für B-Zell-Aktivierung beschrieben (Cervenak et al., 2001) und Peanut agglutinin (PNA) = Erdnussagglutinin bindende Proteine sind auf B-Zellen in Keimzentren zu finden (Rose et al., 1980).

Nur mit PCC und HEL konjugierte SRBC brachten die transferierten AND-T-Zellen oder liMCCxSW B-Zellen zum Proliferieren und zur Expression von Tfh-Markern, bzw. Keimzentrumsmarkern PNA^{hi} , $GL-7^{hi}$, IgD^{lo} und zum Antikörperklassenwechsel (Abb. 9 B,D,E). Während endogene T- und B-Zellen auch auf die ungekoppelten SRBC reagierten und sich zu Keimzentrumszellen differenzierten, war die Aktivierung und Differenzierung von AND-T-Zellen und liMCCxSW-B-Zellen auf ihr jeweiliges spezifisches Antigen angewiesen. AND T-Zellen proliferierten weniger stark, als in mit Doxyzyklin behandelten li-rTAXTIM. Eventuell muss ihr Antigen (PCC) erst von dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert werden, bevor es für die T-Zellen erkennbar wird. Sowohl endogene, wie auch transferierte analysierte T-Zellen enthielten mit $PD-1^+$, $CXCR5^+$ Zellen, den Phänotyp von T-Zellen in Keimzentren. Dieser Zelltyp konnte somit nachgewiesen werden und damit die Färbemethodik etabliert und auf die Analyse nach verschiedenen langen Präsentationszeiten in li-rTAXTIM Empfängertieren (z.B. Abb. 8) angewendet werden.

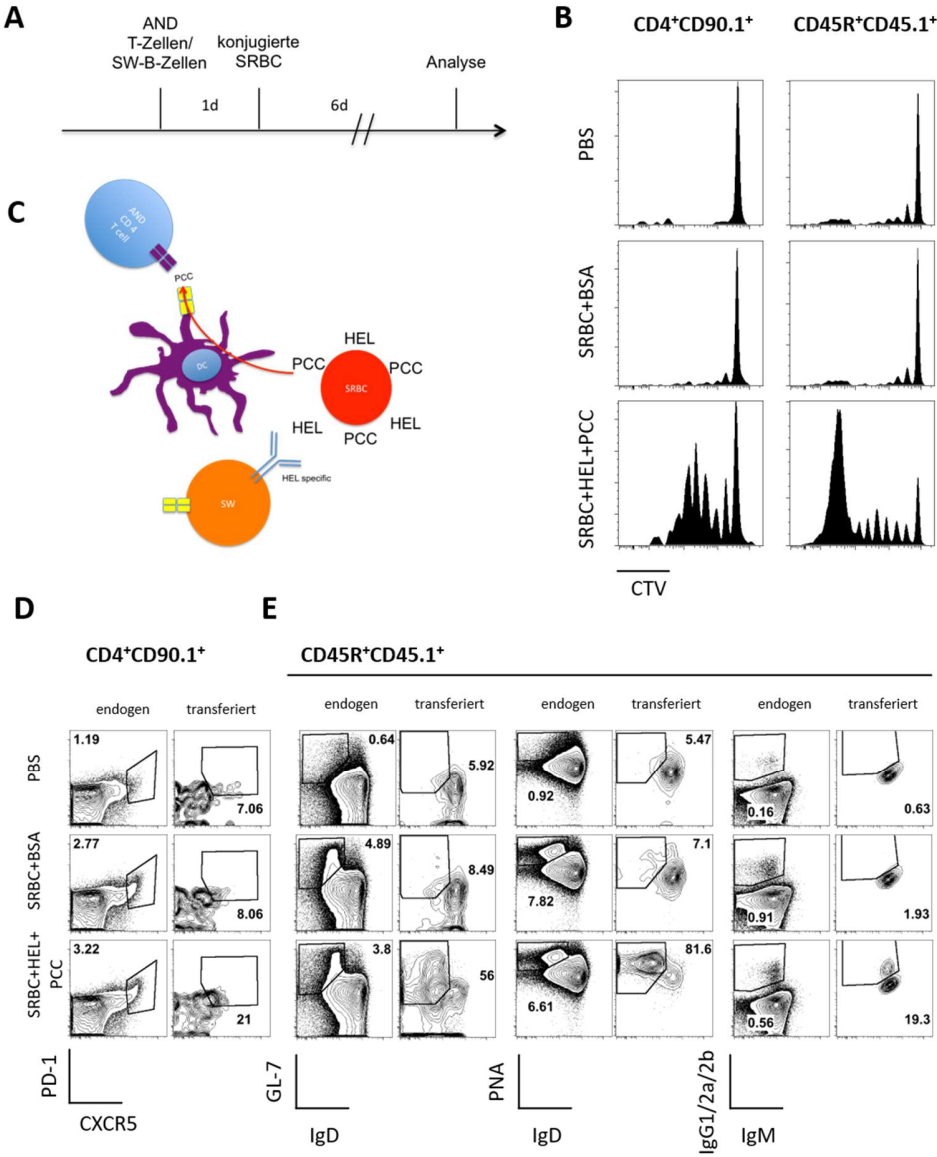


Abbildung 9: Keimzentrophänotyp von endogenen T-Zellen, sowie transferierten AND-T-Zellen entspricht PD-1⁺, CXCR5⁺ folliculäre T Helferzellen und der von liMCCxSW-B-Zellen IgD^{lo}, GI-7⁺, PNA⁺.

Legende: SRBC = Schafserythrozyten, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, BSA = bovines Serumalbumin, DC = dendritische Zelle, PCC = Tauben-Zytochrom c, HEL = Hühnerei Lysozym.

AND-T-Zellen oder liMCCxSW-B-Zellen wurden in Wildtyp Mäuse transferiert und am nachfolgenden Tag mit PCC- und HEL-gekoppelten Schafserythrozyten (SRBC), BSA-gekoppelten SRBC, oder PBS immunisiert. **(A)** chronologischer Aufbau des Experiments (Analyse an Tag 6 nach Immunisierung) **(B)** Zellproliferation anhand von CTV-Verdünnungen **(C)** Interaktionsschema der transferierten Zellen **(D)** Phänotypisierung und Antikörperklassenwechsel. PD-1⁺, CXCR5⁺ entsprechen folliculären T-Helfer-Zellen (Tfh-Zellen). Keimzentrum-B-Zellen sind IgD^{lo}, GI-7⁺, PNA⁺. Die gezeigten B-Zell-Daten und die T-Zell-Proliferation sind repräsentativ für 3 Experimente. Gating: transferierte Zellen: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD⁻, endogene Lymphozyten: Einzelzellen, lebende Lymphozyten, CD45R⁺, CD4⁺ oder CD4⁺, CD45R⁺.

8.6 Differenzierungsverhalten von AND-T-Zellen und liMCC-B-Zellen nach transienter und permanenter Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen

T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation benötigte kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (Abb. 8) und mit Antigen-konjugierten SRBC konnten AND-T-Zellen zu Tfh- und liMCC-B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen differenziert werden (Abb. 9). Weiterhin unklar blieb jedoch, welche Differenzierungswege AND-T-Zellen und liMCC-B-Zellen in ihrer produktiven Interaktion in li-rTAXTIM einschlagen.

Wir verglichen die Differenzierung von AND-T-Zellen zu Tfh-Zellen und die Expression von keimzentrumsspezifischen Oberflächenmarkern von liMCC-B-Zellen bei transienter und permanenter Antigenpräsentation durch dendritische Zellen in li-rTAXTIM-Mäusen. Diese wurden entweder von Tag -2 an durchgehend oder nur für einen Tag oder gar nicht mit Doxyzyklin behandelt. An Tag -1 wurden AND-Lymphknotenzellen und an Tag 0 liMCC B-Zellen adoptiv transferiert (Abb. 10 A). Um die Ergebnisse unabhängiger Experimente vergleichen zu können, wurden folgende Vergleichsgruppen festgelegt: gleiche transferierte Zellen, aber Tiere ohne Doxyzyklinbehandlung. Somit wurden die Gruppen 3 (dox transient) und 5 (dox kontinuierlich) mit Gruppe 1 (B10.BR-Zellen transferiert, kein dox) verglichen und die Gruppen 4 (dox transient) und 6 (dox kontinuierlich) mit Gruppe 2 (liMCC-B-Zellen transferiert, kein dox) (Gruppen wie Abb. 8).

AND-T-Zellen differenzierten sich unabhängig von der Möglichkeit zur Interaktion oder „Nicht-Interaktion“ mit den transferierten B-Zellen zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen, wenn sie permanent ihr Antigen auf dendritischen Zellen präsentiert bekamen (Abb. 10 C & D). Dagegen entwickelten sich nur liMCC-B-Zellen, die zur spezifischen Interaktion mit AND-T-Zellen fähig waren, zu B-Zellen mit dem Phänotyp von Zellen im Keimzentrum (d.h. GL-7^{hi}, PNA^{hi}, IgD^{lo}) (Abb. 10 C & D, Gruppe 6). B10.BR-B-Zellen entwickelten auch im Beisein von CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen keinen GL-7^{hi}, PNA^{hi}, IgD^{lo} Phänotyp (Abb. 10, C & D, Gruppe 5). Mit nur eintägiger Induktion der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen sind bereits einige Zellen zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen differenziert, jedoch mehr bei gleichzeitiger Antigenpräsentation durch B-Zellen.

Die Differenzierung zu Keimzentrums-B-Zellen scheint also von der antigenspezifischen Interaktion mit bereits differenzierten CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen abhängig zu sein, die über die gleiche Zeit ihr Antigen auf dendritischen Zellen präsentiert bekommen. Die Differenzierung der T-Zellen ist jedoch maßgeblich von der kontinuierlichen Antigenpräsentation durch dendritische Zellen abhängig (Abb. 10 C & D, Gruppen 5

& 6). Die Stimulationen durch Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und durch B-Zellen können sich bei transientser Präsentation eventuell addieren (Abb. 10 C & D, Gruppen 3 & 4).

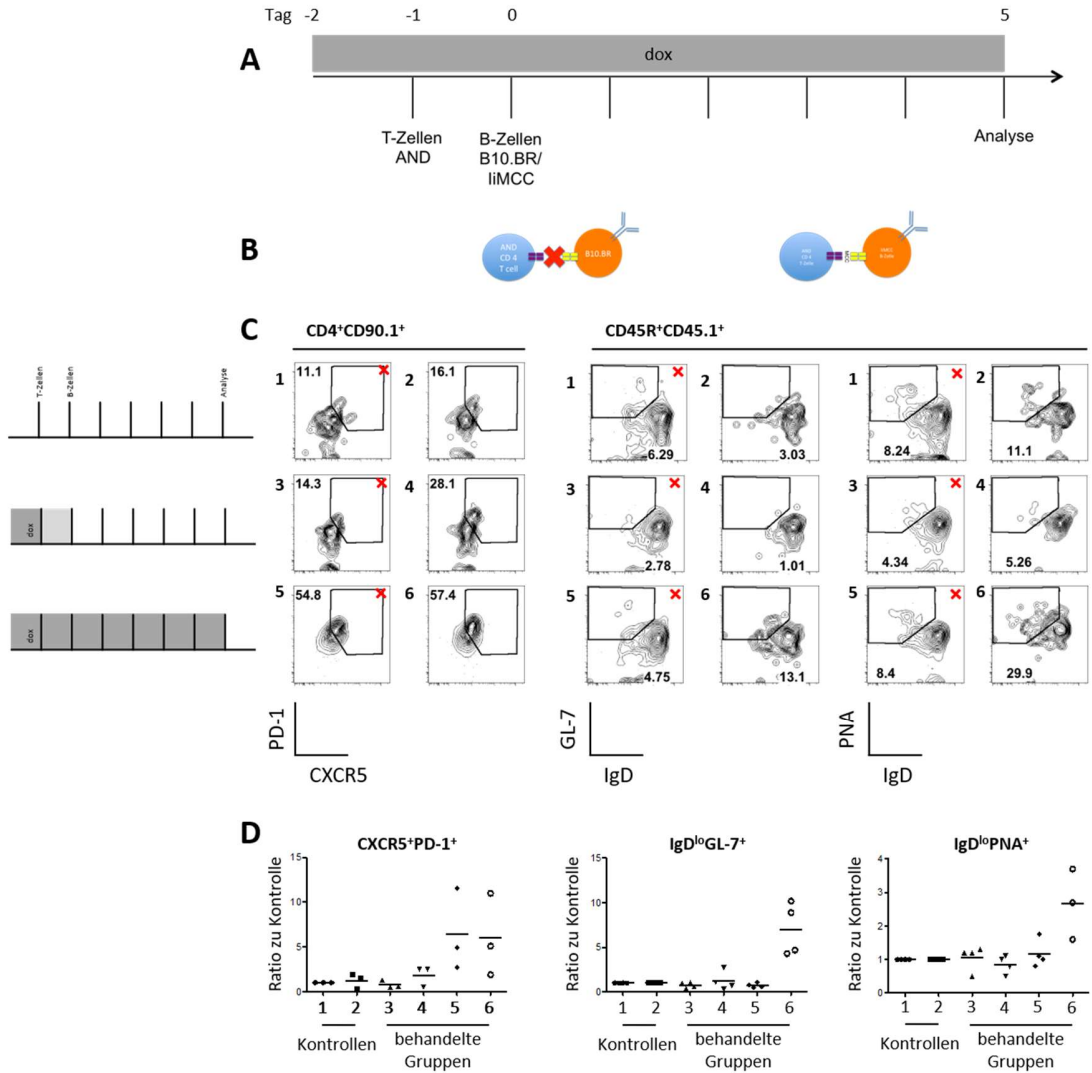


Abbildung 10: Bei kontinuierlicher Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, zeigen interagierende AND-T-Zellen und iiMCC-B-Zellen Keimzentrumspheänotypen.

Legende: dox = Behandlung mit Doxyzyklin, X = B10.BR B-Zellen transferiert.

Doppelt transgene li-rTaxTIM Mäuse erlauben eine hauptsächlich auf dendritische Zellen beschränkte, durch Doxyzyklin induzierbare MCC₈₈₋₁₀₃-Peptidpräsentation auf MHC-Klasse-II. CTV-markierte AND Lymphknotenzellen mit ca. 60% CD4⁺ transgenen Zellen und B10.BR, bzw. iiMCC-B-Zellen wurden zu je 10⁶ Zellen adoptiv transferiert und nach keiner (Gruppen 1 & 2), eintägiger (Gruppen 3 & 4) oder durchgehender (Gruppen 5 & 6) Doxyzyklinbehandlung an Tag 5 analysiert. **(A)** chronologischer Aufbau des Experiments **(B)** Interaktionsschemata der transferierten Zellen **(C)** Expression von Keimzentrumsspezifischen Oberflächenmarkern. **(D)** Gezeigt ist die statische Auswertung der Phänotypen. Die Änderung der Population ist jeweils bezogen auf die dox-negative Kontrolle. d.h. CXCR5⁺PD-1⁺ Änderung bezogen auf Gruppe 1. IgD^{lo} / GL-7⁺ / PNA⁺ bezogen auf Gruppe 1 für Gruppen 3 und 5, bzw. bezogen auf Gruppe 2 für Gruppen 4 und 6. Graphiken zeigen Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD.

8.7 Einfluss von antigenspezifischer Stimulation auf die Expression von CD90.1 auf T-Zellen

Es ist berichtet worden, dass Tfh-Zellen die Expression von CD90 herunterregulieren (Zheng et al., 1996). Auch in einigen unserer Experimente fiel auf, dass eine Population von CD4⁺ T-Zellen, die als CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen zu identifizieren waren, CD90.1 mäßig hoch exprimierte (Abb. 11 A). Wir konnten nicht ausschließen, dass die transferierten AND-T-Zellen nach Stimulierung den kongenen Marker CD90.1 herunterregulierten. Dies ist zwar selten als Tfh-Zell-Eigenschaft erwähnt, könnte aber die Interpretation unserer adoptiven T-Zell-Transfers beeinträchtigen, da dadurch ein unbestimmter Anteil transferierter AND-T-Zellen nach einer Woche nicht mehr aufzufinden wären.

Wir transferierten deswegen MACS-sortierte AND-T-Zellen, die den kongenen Marker CD45.1 exprimierten und quantifizierten die Expression von CD90.2 nach verschiedenen Stimulationen (SRBC, Antigen gekoppelt an SRBC, Doxyzyklin-behandelte li-rTAXTIM), um das Verhalten von CD90 zu evaluieren.

Weder nach Immunisierungen mit SRBC, noch mit SRBC gekoppelt an PCC, noch in mit Doxyzyklin behandelten li-rTAXTIM-Mäusen mit ebenfalls transferierten liMCC-B-Zellen wurde CD90.2 herunterreguliert (Abb. 11 B). Die Tfh-Population mit niedriger CD90 Expression bestand also höchstwahrscheinlich aus endogenen Zellen und der Effekt dürfte für die Interpretation der experimentellen Resultate irrelevant sein.

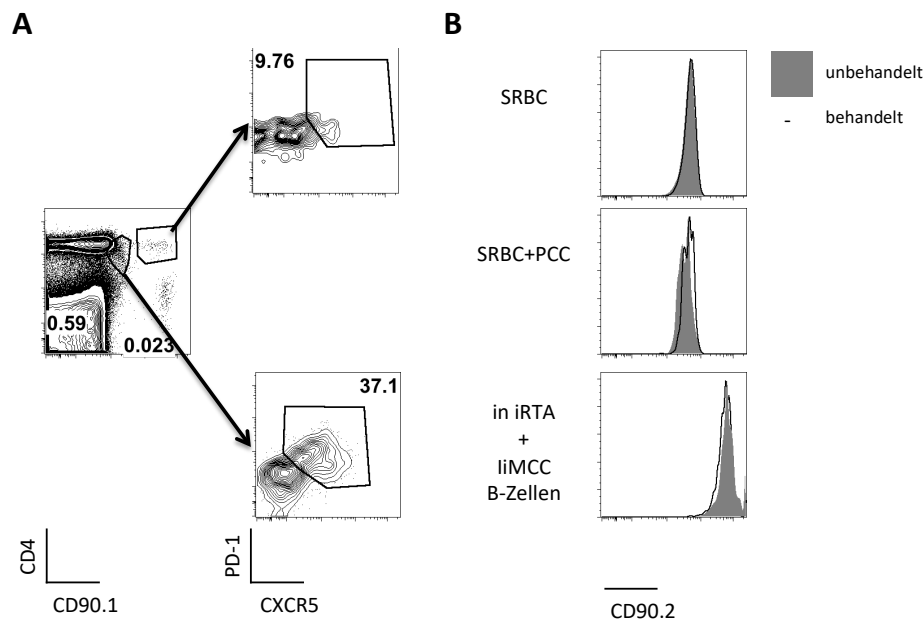


Abbildung 11: CD90 wird nach Stimulation und bei der Differenzierung zu Tfh-Zellen nicht herunterreguliert.
Legende: SRBC = Schafserythrozyten.

(A) Gezeigt ist das Auffinden von transferierten ANDx90.1-T-Zellen in li-rTAXTIM-Maus, die für das gesamte Experiment (5 Tage) Doxyzyklin im Trinkwasser hatte. (B) Quantifizierung der Expression von CD90.2 (für zweite und dritte Graphik nach Transfer von magnetisch isolierten ANDx45.1 T-Zellen) nach SRBC-Immunsierungen oder durchgehender Doxyzyklinbehandlung in einer li-rTAXTIM-Maus, in die auch liMCC-B-Zellen transferiert worden waren. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD.

8.8 Einfluss der durch den adoptiven Zelltransfer erhöhten Vorläuferfrequenz auf die T-B-Zell-Interaktion

Generell stellen adoptive Zelltransfers und die nachfolgende Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhalten der transferierten Zellen artifizielle Systeme dar. In einigen Publikationen werden bis zu 30 Millionen Zellen transferiert (Allen et al., 2007a; Allen et al., 2007b). Das stellt längst keine physiologische Vorläuferfrequenz mehr dar und erhöht die Chance zur Interaktion von transferierten Zellen abnorm. Zusätzlich wurden in unserem Labor Beobachtungen gemacht, die nahelegten, dass hohe transferierte Zellzahlen die Differenzierung zu Keimzentrumszellen nach SRBC-Immunsierungen hemmen können (nicht publizierte Daten: Masterthesis Berger K. (2013)).

Um näher zu untersuchen, inwiefern eine erhöhte Vorläuferfrequenz das Verhalten der AND-T-Zellen und liMCC-B-Zellen beeinflusst, titrierten wir die transferierte Zellzahl. $10^{6,5,4}$, oder 3 Antigen-Rezeptor-transgener T und B-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 (wie bei den anderen Experimenten)

transferiert und nach durchgehender Doxyzyklinbehandlung am Tag 5 nach B-Zell-Transfer bzgl. Proliferationsverhalten und Expression von Oberflächenmarkern analysiert (Abb. 12 A).

Die T-Zellen proliferierten auch bei geringeren Zellzahlen vor allem abhängig von der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und gingen nur dann eine produktive Interaktion mit B-Zellen ein, wenn diese das T-Zell-spezifische Antigen präsentierten. Diese T-B-Zell-Interaktion genügt bereits für einige Zyklen T-Zell-Proliferation (dox-negative Kontrolle). Die Differenzierung zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen fand unabhängig von der transferierten Zellzahl statt. liMCC-B-Zellen proliferierten bei geringerer Zahl transferierter Zellen ebenfalls T-Zell-abhängig (Abb. 12 B).

Durch physiologischere Vorläuferfrequenzen veränderte sich weder der Phänotyp der T-Zellen, noch die Interaktion der T und B-Zellen. Es war jedoch bemerkenswert, dass sich die transferierte Zahl an AND-T-Zellen praktisch problemlos reduzieren ließ, während B-Zellen schon bei Transfer von noch 10⁵ Zellen nach 5 Tagen nur noch schwer aufzufinden waren.

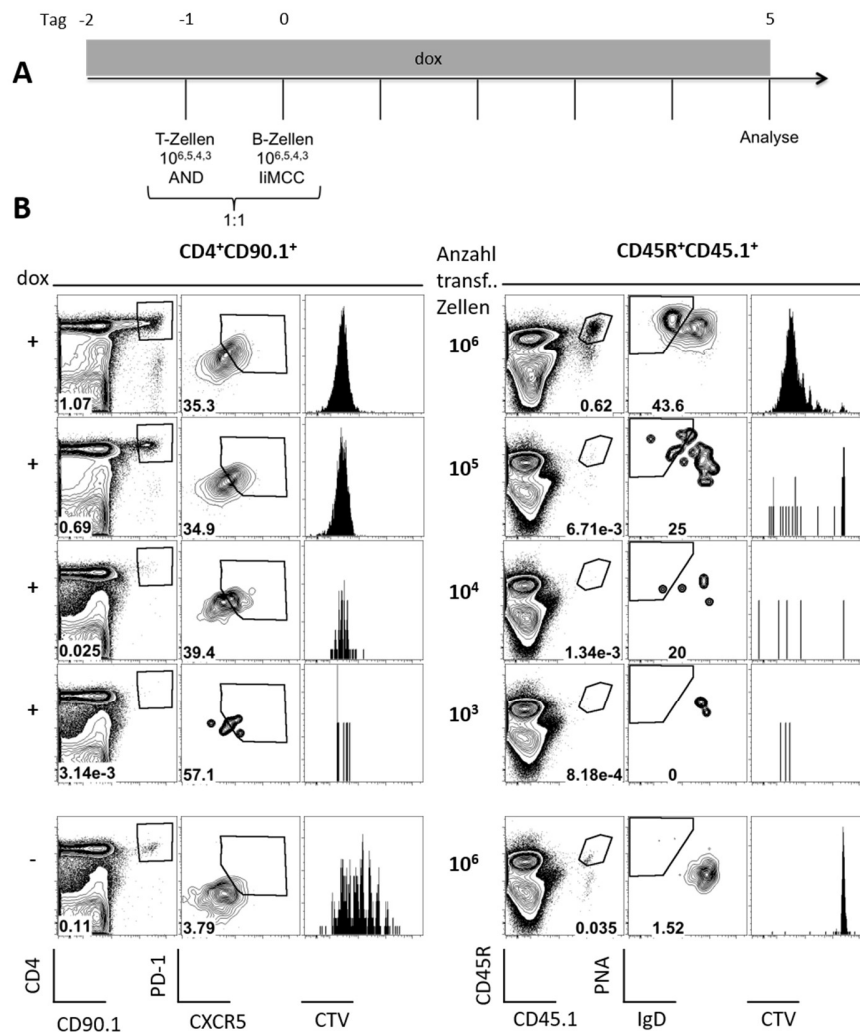


Abbildung 12: Die hohen Zahlen transferierter Zellen bilden Proliferationseffekte ab, die auch bei physiologischeren Vorläuferfrequenzen zu beobachten sind.

Legende: dox = Behandlung mit Doxzyklin, CTV = cell trace violet, transf. = transferierter.

10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 CTV-markierte AND-Lymphknoten-Zellen und B10.BR, bzw. liMCC-B-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 adoptiv transferiert und bei permanenter Doxzyklinbehandlung am Tag 5 nach B-Zell-Transfer analysiert. **(A)** chronologischer Aufbau des Experiments **(B)** Auffindbarkeit, Phänotyp und Proliferationsverhalten (anhand von CTV-Verdünnung) der transferierten T und B-Zellen. Graphiken sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD.

8.9 Einfluss verschiedener antigenspezifischer B-Zell-Rezeptor-Stimulationen auf die B-Zell-Proliferation und Differenzierung

Die T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation fand nur bei gleichzeitiger Antigenpräsentation durch dendritische Zellen statt (Abb. 8). Transiente Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen ließ zwar schon

einen Prozentsatz der T-Zellen zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen differenzieren, jedoch waren diese noch nicht zu suffizienter B-Zell-Hilfe fähig (Abb. 11). Es bleibt unklar, welcher Reiz den T-Zellen und/oder den B-Zellen für die Auslösung von B-Zell-Proliferation und Differenzierung fehlt. Dass der experimentelle Aufbau keine antigenspezifische Stimulation des B-Zell-Rezeptors ermöglicht, diese aber mitentscheidend sein kann, ist eine der möglichen Interpretationen, weil sowohl das Migrations-, wie auch das Differenzierungsverhalten von B-Zellen dadurch beeinflusst werden können (Mueller et al., 2015; Okada et al., 2005).

SW-B-Zellen tragen einen B-Zell-Rezeptor, der spezifisch für HEL ist (siehe *Materialien und Methoden Kapitel 8.1.3 Mäuse*). Wir verglichen deren Stimulation durch membrangebundenes, an Mauserythrozyten (mouse red blood cell = MRBC) gekoppeltes HEL (Abb. 13 A & B) und durch PBS-gelöstes HEL (Abb. 13 C & D). 10⁶ CTV-markierte SW-B-Zellen oder AND-T-Zellen wurden an Tag 0 transferiert. HEL und PCC wurden mithilfe von ECDI am nächsten Tag an MRBC, wie in *Materialien und Methoden Kapitel 8.13* beschrieben, konjugiert und das Volumenäquivalent von 2x10⁸ konjugierten SRBC oder MRBC intravenös injiziert. Nach weiteren drei Tagen wurde die Zellproliferation durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 13 A). Zudem wurden SW-B-Zellen in wildtyp Empfängertiere transferiert und einen Tag später verschiedene Dosierungen von in PBS-gelöstem HEL gespritzt (Abb. 13 C). Am Tag drei wurde in der Durchflusszytometrie die Expression von CD69 auf B-Zellen quantifiziert und an Tag 7 deren Proliferation (Abb. 13 D). CD69 ist ein Markermolekül, das auf aktivierten B-Zellen hochreguliert wird (Ziegler et al., 1994).

AND-T-Zellen reagierten nur auf die Immunisierung mit ihrem Antigen, wenn es an SRBC gekoppelt war. SW-B-Zellen proliferierten sowohl nach Immunisierungen mit HEL-SRBC, als auch mit HEL-MRBC (Abb. 13 B). Die Applikation von 10µg HEL in PBS führte am ersten Tag nach Injektion zur erhöhten Expression von CD69, aber selbst nach 6 Tagen war keine Proliferation der transferierten B-Zellen zu messen. Dies galt auch für die höchste untersuchte Dosis von 1 mg HEL (Abb. 13 D). Sie führte nicht einmal zur erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Eventuell evozierte die hohe Dosis Anergie. Auch dass AND-T-Zellen durch MRBC-gekoppeltes Antigen nicht zu stimulieren waren, war eine zunächst überraschende Beobachtung (Abb. 13 B). Die Gruppe von Jason Cyster klärte im Verlauf des Jahres 2015 allerdings auf, dass Mauserythrozyten CD47 fehlt. Dieses Fehlen verhindert, dass die MRBC phagozytiert werden und das an sie gekoppelte Antigen wird in der Folge nicht präsentiert. Es entgeht den T-Zellen schlichtweg (Yi et al., 2015).

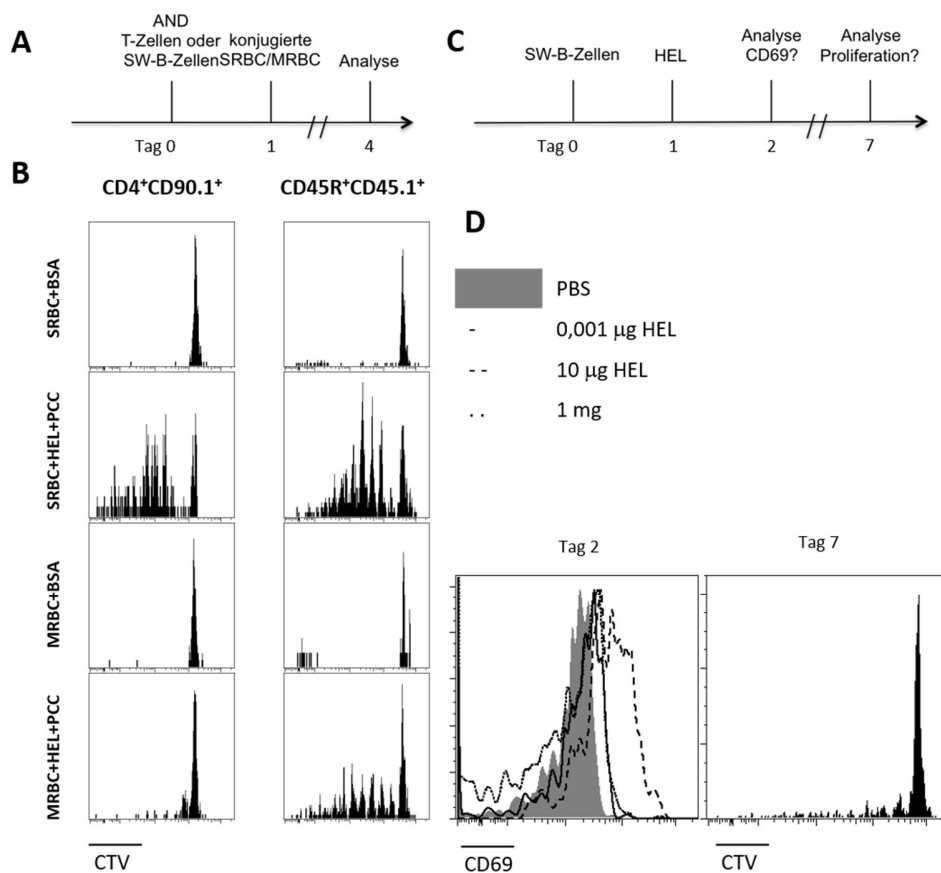


Abbildung 13: SW-B-Zellen proliferieren nach Immunisierungen mit SRBC-HEL und MRBC-HEL. 10 µg HEL in PBS aktivieren sie, ohne zur Proliferation zu genügen.

Legende: SRBC = Schafserythrozyten, MRBC = Mauserythrozyten, PCC = Tauben-Zytochrom c, HEL = Hühnerei Lysozym, CTV = cell trace violet.

Untersucht wurde die aktivierenden Wirkungen von spezifischen Antigenen, die Membrangebunden an MRBC, SRBC oder in gelöster Form einen Tag nach adoptivem Zelltransfer von SW-B-Zellen injiziert wurde. **(A)** chronologischer Aufbau eines Experiments zur Untersuchung von membrangebundenem Antigen **(B)** Zellproliferation anhand von CTV-Verdünnungen **(C)** chronologischer Aufbau des Experiments zur Untersuchung von frei gelöstem Antigen **(D)** Expression CD69 an Tag 2 und Proliferation an Tag 7 anhand der CTV-Verdünnung. Graphiken sind jeweils repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD⁻.

8.10 Einfluss des B-Zell-Rezeptor-Signals auf die T-B-Zell-Interaktion bei transienter und permanenter Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen

Bei transienter Antigenpräsentation durch dendritische Zellen differenziert bereits ein Teil der T-Zellen zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen. Jedoch waren diese noch nicht zu suffizienter B-Zell-Hilfe fähig (Abb. 8 und 11). Mit MRBC konjugiertes HEL regt SW-B-Zellen bereits zur Zellteilung an. Die Dosis von 10 µg intravenös appliziertem, in PBS gelöstem HEL aktiviert SW-B-Zellen zwar, führt aber nicht zu T-Zell-unabhängiger

Proliferation (Abb. 13). Damit ließ sich in PBS gelöstes HEL nutzen, um die eventuell additive Wirkung des B-Zell-Rezeptor-Signals und der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, in der T-Zell-Differenzierung und ihrer Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe zu untersuchen. Wir verglichen, wie bereits in den Abbildungen 8 und 11 beschrieben, kontinuierliche und transiente Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, ergänzten allerdings das Vorgehen durch die Applikation von 10 µg HEL in PBS am Tag 1 nach Transfer der liMCCxSW-B-Zellen.

Die fehlende Präsentation des Antigens auf dendritischen Zellen ließ sich jedoch nicht durch das B-Zell-Rezeptor-Signal kompensieren. Trotz der antigenspezifischen B-Zell-Stimulation waren die CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen bei nur transientser Induktion der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen durch Doxyzyklin nicht in der Lage den B-Zellen zu helfen. Wie zuvor war Tfh-Zell-Differenzierung nur von kontinuierlicher Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen getragen. Weder ihr Proliferationsverhalten, noch die Differenzierung zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen veränderten sich durch die Applikation des HEL (Abb. 14 B und C). Die transferierten B-Zellen proliferierten weder, noch veränderte sich ihr Phänotyp (Abb. 14 B & C). Wurde MCC jedoch kontinuierlich durch dendritische Zellen präsentiert und dadurch CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen generiert, so schien die Stimulation des B-Zell-Rezeptors mit HEL die Proliferation und auch die Differenzierung hin zu IgD^{lo}PNA⁺ Keimzentrums-B-Zellen zu verstärken (Abb. 14 B).

Das Signal durch den B-Zell-Rezeptor unterstützt also die T-Zell-Hilfe und erlaubt mehr B-Zellen die Proliferation. Entweder ist dies einer direkten Aktivierung der B-Zellen zuzuschreiben oder die Stimulation durch ihren B-Zell-Rezeptor verbesserte, z.B. die Migration hin zur T-Zell-Zone und damit den Zugang zu einer stimulierenden Interaktion von Tfh- und B-Zellen (Okada et al., 2005).

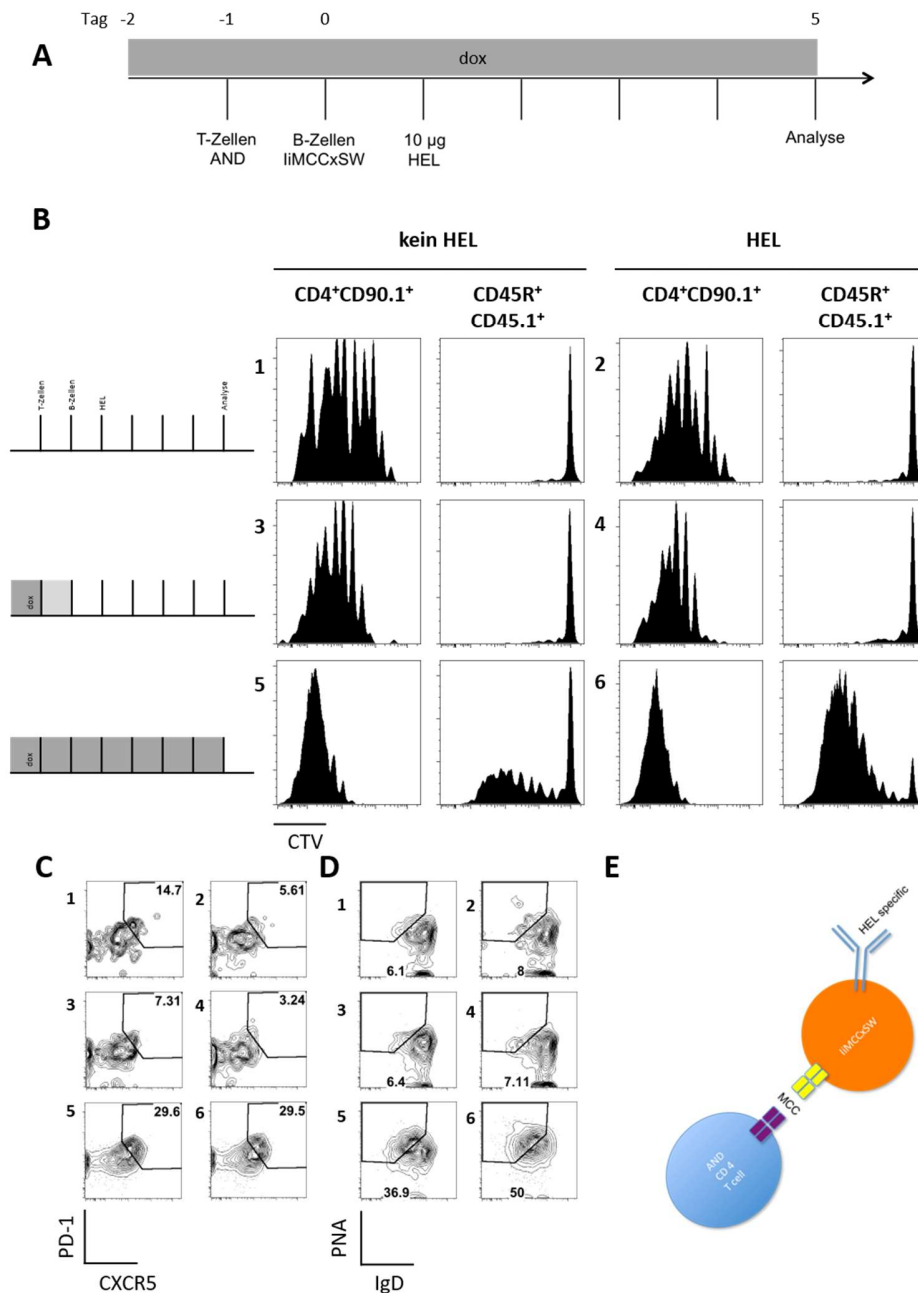


Abbildung 14: Kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen ist nötig für B-Zell-Hilfe durch T-Zellen. Ein Signal durch den B-Zell-Rezeptor verstärkt diese Wirkung.

Legende: HEL = Hühnerei Lysozym, CTV = cell trace violet.

CTV-markierte AND-Lymphknoten-Zellen und liMCCxSW B-Zellen wurden zu je 10^6 Zellen adoptiv transfertiert und nach keiner (Gruppen 1&2), eintägiger (Gruppen 3&4) oder durchgehender (Gruppen 5&6) Doxyzyklinbehandlung an Tag 5 analysiert. 10 µg HEL in PBS wurden an Tag 1 i.v. appliziert. **(A)** Chronologischer Aufbau des Experiments. **(B)** Zellproliferation anhand der CTV-Verdünnungen. **(C&D)** Phänotyp transferierter **(C)** AND-T-Zellen und **(D)** liMCC-B-Zellen. **(E)** Interaktionsschema der transfertierten Zellen und HEL. Graphiken sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD

8.11 Einfluss verlängerter transienter Antigenpräsentation durch dendritische Zellen auf die T-B-Zell-Interaktion

Beobachtet man die Differenzierung von transgenen OT-II-T-Zellen in Reaktion auf ihr Antigen Ovalbumin oder auch von Wildtyp-T-Zellen im Rahmen einer Infektion mit LCMV finden sich erste CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen am dritten Tag nach experimenteller Provokation (Baumjohann et al., 2011; Choi et al., 2011; Choi et al., 2013). Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich im hier untersuchten System die Frage, ob die vorher gewählte transiente Stimulation mit nur eintägiger Doxyzyklinbehandlung (Abb. 8 und 14), zu kurz gewählt war und die transiente Antigenpräsentation durch dendritische Zellen für eine Mindestzeit aufrechterhalten werden muss, damit AND-T-Zellen die Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe erlangen.

Deshalb untersuchten wir den Einfluss von transienten, aber verlängerten Doxyzyklinbehandlungen auf die antigenspezifische T-B-Zell-Interaktion, um Hinweise auf eine eventuelle Mindestzeit der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zu finden. li-rTAXTIM-Mäuse wurden mit Doxyzyklin für unterschiedlich lange Intervalle behandelt. An den Tagen -1 und 0 folgten der Transfer von 10⁶ AND-Lymphknoten-Zellen und liMCC-B-Zellen. Anschließend wurden die Behandlungsgruppen entweder an Tag 1 oder 3 wieder mit normalem Trinkwasser versorgt. Sowohl das Proliferationsverhalten, als auch die Phänotypen transferierter AND-T-Zellen und liMCC-B-Zellen wurden an Tag 7 (eine Woche nach B-Zell-Transfer) analysiert (Abb. 15 A).

Mit der Dauer der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen stieg der Anteil CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen kontinuierlich an. Auch nachdem sie, soweit mit CTV visualisierbar, bereits proliferiert hatten, entwickelten sich immer mehr T-Zellen zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen (Abb. 15 B & D). Die B-Zell-Proliferation - mit einer Ausnahme (sichtbar als Ausreißer in Abb. 15 D nach 5 Tagen) - und die Differenzierung zu Keimzentrums-B-Zellen war jedoch weiterhin nur relevant nachzuweisen, wenn dendritische Zellen das T-Zell-Antigen gleichzeitig und kontinuierlich präsentierten (Abb. 15 C & F).

Womöglich können sich T-Zellen erst nach einer gewissen Anzahl Zellteilungen, die höher liegt als durch CTV visualisierbar, zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen differenzieren. Zusammengenommen mit unseren früheren Beobachtungen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen ein funktionelles Dreigespann bilden, bei dem die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zu keinem Zeitpunkt seine Notwendigkeit einbüßt. So waren weder eine verlängerte, doch transiente Präsentation auf dendritischen Zellen (Abb. 8 & 15), noch physiologischere Vorläuferfrequenzen (Abb. 12), noch eine

Stimulation der B-Zellen über den B-Zell-Rezeptor (Abb. 14) in der Lage die T-B-Zell-Interaktion produktiv und unabhängig von dendritischen Zellen zu gestalten.

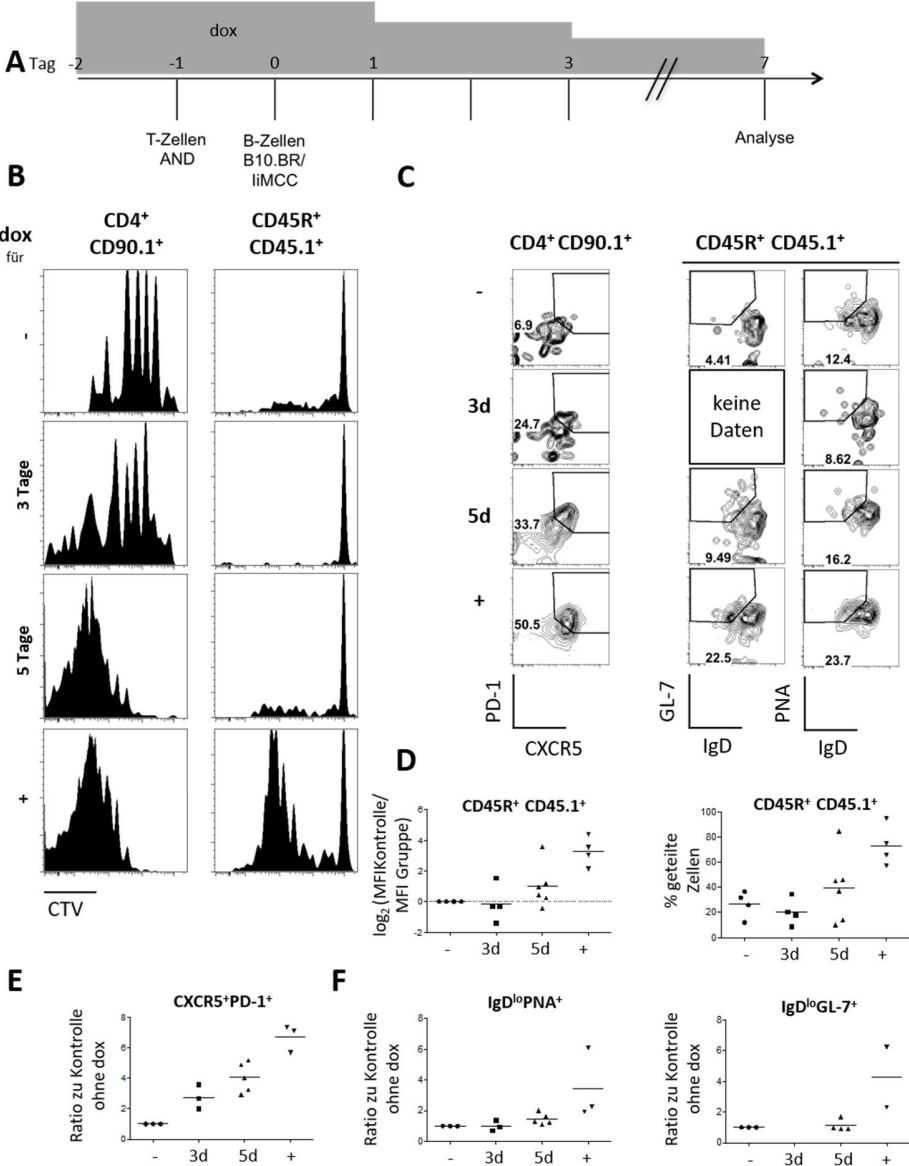


Abbildung 15: Kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen ist unabhkmmlich für T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation

Legende: dox = Doxzyklinbehandlung, + = durchgehende Doxzyklinbehandlung, - = keine Doxzyklinbehandlung, d = Tage, MFI = mittlere Intensität der Fluoreszenz.

AND-Lymphknoten-Zellen und liMCC-B-Zellen wurden zu je 10⁶ Zellen adoptiv transferiert und nach keiner, dreitägiger, fünftägiger, durchgehender Doxzyklinbehandlung an Tag 7 analysiert. **(A)** Chronologischer Aufbau des Experiments. **(B)** Zellproliferation anhand von CTV-Verdünnungen. **(C)** Phänotyp transferierter AND-T-Zellen und liMCC-B-Zellen. **(D)** Proliferationsanalyse mit Anzahl der Zelldivisionen bezogen auf die Kontrollen, Prozentsatz von Zellen, die eine CTV-Verdünnung aufwiesen. **(E&F)** Auswertung der Phänotypen der transferierten T-Zellen **(E)** und B-Zellen **(F)** im Verhältnis zur Kontrolle. Graphiken sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD

8.12 Beginn der T-Zell-abhängigen B-Zell-Proliferation

In den in Abb. 8 und 11 gezeigten Experimenten führten wir die Endanalysen 6 Tage nach T-Zell-Transfer durch. Somit war die Gesamtdauer der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen hier nur einen Tag länger, als die mit 5 Tagen längste transiente Doxyzyklinbehandlung in Abb. 15. Bedenkt man die Pharmakokinetik des Doxyzyklins und das ausschleichende Anhalten seiner Wirkung, dürfte sich zwischen den Resultaten der Experimente eigentlich kein Unterschied zeigen (Obst et al., 2005). Dessen ungeachtet zeigt sich in Abb. 15 deutlich, dass unter diesen Bedingungen weniger proliferierte B-Zellen mit durchschnittlich weniger Teilungen zu messen waren (Abb. 15 A und C). Entweder fingen B-Zellen erst nach diesem 5. Tag an zu proliferieren, da beispielsweise erst eine Mindestmenge an Tfh-Zellen generiert werden muss oder Tfh-Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe, sobald die Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen aussetzt und bereits proliferierende, bzw. proliferierte B-Zellen sterben ab.

Wir wollten deshalb genauer untersuchen, wann B-Zellen beginnen sich T-Zell-abhängig zu vermehren. li-rTAXTIM-Mäuse wurden dazu mit Doxyzyklin behandelt. An den Tagen -1 und 0 folgten der Transfer von 10^6 AND-Lymphknoten-Zellen und liMCC-B-Zellen und an den Tagen 1,3 und 5 analysierten wir das Proliferationsverhalten der transferierten Zellen (Abb. 16 A).

Es zeigte sich, dass die B-Zellen bereits nach 3 Tagen begannen zu proliferieren und je später der Analysezeitpunkt, desto mehr Zellteilungen durchliefen sie und desto mehr B-Zellen proliferierten überhaupt (Abb. 16 B und C).

AND-T-Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe, wenn sie ihr Antigen nicht mehr auf dendritischen Zellen präsentiert bekommen. Außerdem könnte diese Präsentation ebenso notwendig für das Überleben von, durch die T-Zellen, aktivierten B-Zellen sein.

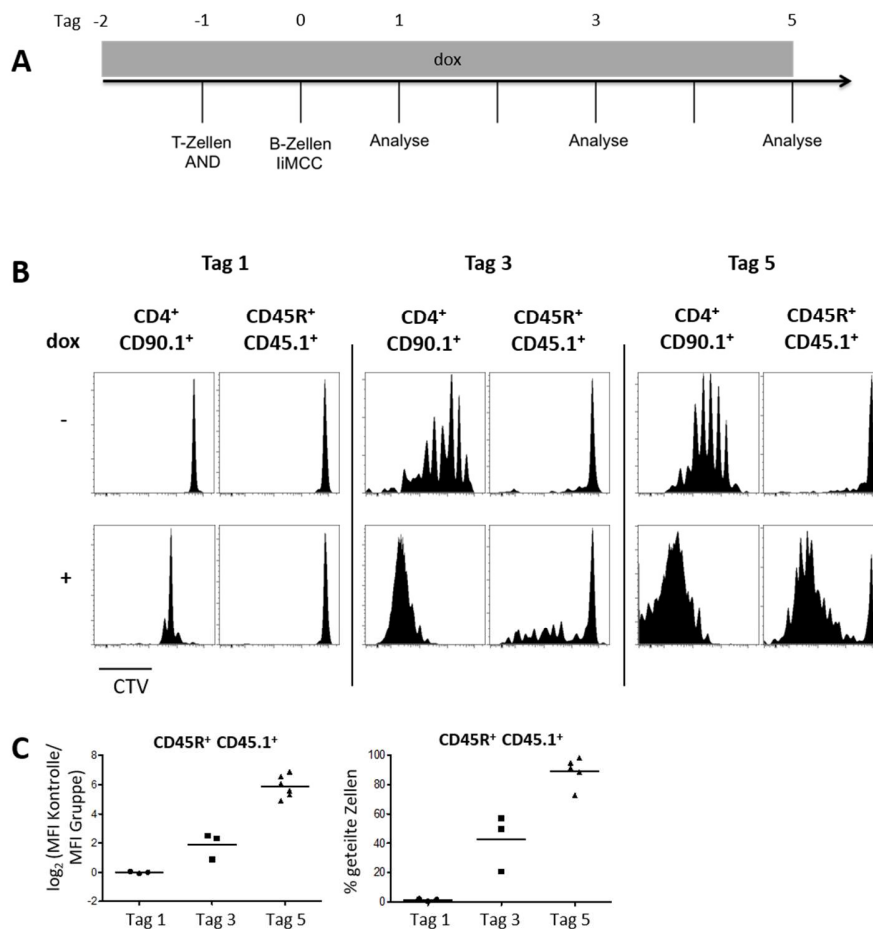


Abbildung 16: B-Zellen fangen nach 3 Tagen an T-Zell-abhängig zu proliferieren.

Legende: dox = Doxyzyklinbehandlung, + = durchgehende Doxyzyklinbehandlung, - = keine Doxyzyklinbehandlung, MFI = mittlere Intensität der Fluoreszenz.

AND-Lymphknoten-Zellen und liMCC-B-Zellen wurden zu je 10^6 Zellen adoptiv transferiert und nach durchgehender Doxyzyklinbehandlung an Tag eins, drei und fünf analysiert. **(A)** chronologischer Aufbau des Experiments. **(B)** B-Zell-Proliferation anhand CTV-Verdünnung. **(C)** Proliferationsanalyse der B-Zellen mit Anzahl der Zelldivisionen und Prozentsatz von Zellen, die eine CTV-Verdünnung aufwiesen. Graphiken sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FV D^- .

8.13 Systemvergleichende Analyse des Antikörperklassenwechsels

Die beobachteten B-Zell-Proliferationen sind abhängig von zu CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen enddifferenzierten, transferierten T-Zellen, die ihr Antigen gleichzeitig auf dendritischen Zellen präsentiert bekamen (Abb. 8, 11, 12, 14, 15). Inwieweit jedoch die stimulierten B-Zellen mit Keimzentrumsphänotyp, zu funktionierenden, Antikörper-sezernierenden und damit potenziell Pathogen-abwehrenden Zellen

geworden waren, blieb unsicher. Keimzentrums-B-Zellen, die eine ausreichende Affinitätsmaturation durchlaufen haben, wechseln durch Einfluss von Tfh-Zellen den Isotypen ihres Immunglobulins von IgM zu beispielsweise IgG. Nachfolgend sezernieren sie diese Antikörper, die bei entsprechender Spezifität Pathogene neutralisieren, opsonieren und das Komplementsystem aktivieren können. Erst dann erfüllen B-Zellen ihre wohl wichtigste Aufgabe im Rahmen der Pathogenabwehr.

Um Antikörperklassenwechsel und damit die Funktionalität der Interaktion von T- und B-Zellen einzuschätzen, wurden B-Zellen hinsichtlich eines Antikörperklassenwechsels von IgM zu IgG1, IgG2a und IgG2b analysiert. Vergleichend untersuchten wir SW-B-Zellen 6 Tage nach Injektion von Antigen-gekoppelten SRBC (wie Abb. 9), liMCCxSW-B-Zellen nach Interaktion mit AND-T-Zellen in li-rTAXTIM-Mäusen unter kontinuierlicher Doxyzyklinbehandlung mit zusätzlicher und ohne zusätzlicher Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch 10 µg HEL in PBS (wie Abb. 8 und 14).

Adoptiv transferierte liMCCxSW-B-Zellen vollzogen nur nach Immunisierungen mit Antigen-gekoppelten SRBC einen Antikörperklassenwechsel zu IgG1, IgG2a und IgG2b (Abb. 17 A & B). Die T-B-Zell-Interaktionen in kontinuierlich mit Doxyzyklin behandelten li-rTAXTIM erzeugt zwar Phänotypen von B-Zellen in Keimzentren (Abb. 11), einen Antikörperklassenwechsel führen diese B-Zellen aber nicht durch. Auch dann nicht, wenn die transferierten B-Zellen zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor stimuliert wurden (Abb. 17 A & B).

Entweder ist die Funktionalität der in li-rTAXTIM-Mäusen erzeugten Tfh-Zellen limitiert und sie entsprechen, ähnlich wie in *Goenka et al., 2011* beschrieben einem prä-Tfh-Zell-Phänotyp, der funktional eingeschränkt ist, oder membrangebundenes HEL gibt ein anderes B-Zell-Signals, als frei gelöstes oder es fehlt eine allgemeine Aktivierung des Immunsystems. In den Experimenten mit li-rTAXTIM findet nämlich keinerlei Aktivierung des angeborenen Immunsystems statt, dessen Kommunikation mit adaptiven Mechanismen weitreichende regulatorische Funktionen hat (Rivera et al., 2016).

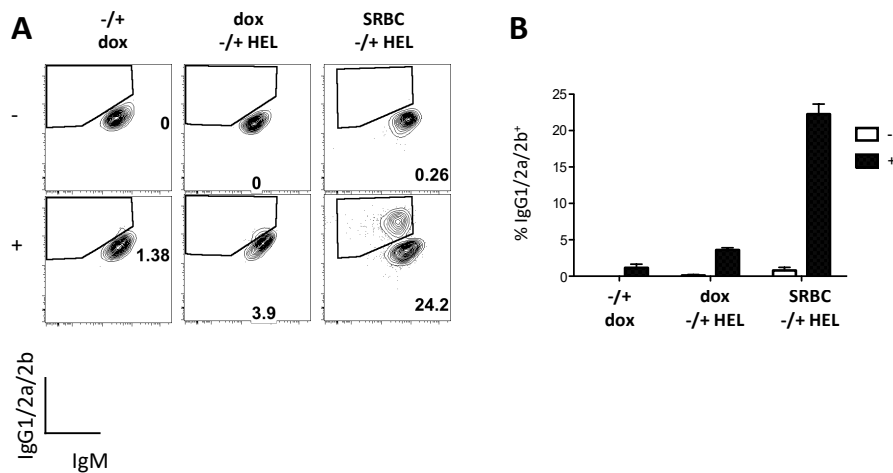


Abbildung 17: Nur die Immunisierung mit SRBC, die an HEL gekoppelt sind, evoziert einen Antikörperklassenwechsel der transferierten liMCCxSW-B-Zellen.

Legende: dox = Doxyzyklinbehandlung, HEL = Hühnerei Lysozym, + = durchgehende Doxyzyklinbehandlung/Injektion von 10 µg HEL in PBS/SRBC an HEL gekoppelt, - = keine Doxyzyklinbehandlung/keine Injektion von 10 µg HEL in PBS/SRBC nicht an HEL gekoppelt.

(A) Gezeigt sind CD45R⁺CD45.1⁺- Zellen. Oberflächenfärbungen gegen IgG1/2a/2b und IgM auf transferierten liMCCxSW-B-Zellen nach Interaktion mit AND-T-Zellen unter keiner oder permanenter Doxyzyklinbehandlung in li-rTAXTIM (linke Graphiken, Experiment wie Abb. 8), nach Stimulation durch 10 µg HEL in PBS i.v. und Interaktion mit AND-T-Zellen unter permanenter Doxyzyklinbehandlung in li-rTAXTIM (mittlere Plots, Experiment wie Abb. 13) und 6 Tage nach Immunisierung mit SRBC nicht konjugiert oder mit HEL konjugiert (rechte Plots, Experiment wie Abb. 10). **(B)** Statistische Auswertung des Anteils der Antikörperklassen-gewechselten B-Zellen unter den transferierten B-Zellen. n= 3 für -/+dox, n=2 für dox -/+ HEL, n=4 für SRBC -/+ HEL. Gating: Einzelzellen, Lymphozyten, FVD.

9. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Evidenz zum Differenzierungsverhalten von T-Zellen hin zu B-Zell-helfenden PD-1⁺, CXCR5⁺ Tfh-Zellen. Nach 3 Tagen der Interaktion fingen B-Zellen an T-Zell-abhängig zu proliferieren. Um ihre helfende Tätigkeit aufrechtzuerhalten benötigten T-Zellen allerdings eine durchgehende Antigenpräsentation durch dendritische Zellen. Nur dann entwickelten die proliferierten B-Zellen mit IgD^{lo}, Gl-7⁺, PNA⁺ auch einen Phänotyp von B-Zellen in Keimzentren. Eine Stimulation der B-Zellen durch ihren B-Zell-Rezeptor mit frei gelöstem Antigen verstärkte diese Wirkung nur, ließ die kontinuierliche Antigenpräsentation durch dendritische Zellen aber nicht weniger notwendig werden. Zuletzt entwickelten sich zwar PD-1⁺, CXCR5⁺ Tfh-Zellen und IgD^{lo}, Gl-7⁺, PNA⁺ Keimzentrums-B-Zellen in transgenen li-rTAXTIM Mäusen, doch nur die Immunisierung mit SRBC, die an spezifische Antigene gekoppelt waren, ließ die B-Zellen auch ihre Antikörperklassen wechseln. Im Folgenden möchten wir die Bedeutung der verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen und Dauer der Antigenpräsentation für die Tfh-Zell-Differenzierung, den Einfluss einer Stimulation durch den antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor, die Auswirkung des Wegfalls der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen, sowie den fehlenden Antikörperklassenwechsel im transgenen System im Kontext der Literatur diskutieren.

9.1 Bedeutung der Dauer der Antigenpräsentation für die Tfh-Zell-Differenzierung

Die Differenzierung und Funktionalität von CXCR5⁺PD-1⁺ AND-T-Zellen in li-rTAXTIM Wirten ist abhängig von Signal 1 (Peptid-Antigen auf MHC-Klasse-II). Dieses musste persistent auf dendritischen Zellen verfügbar sein. Es war sowohl für die gesamte Expansionsphase, als auch für die Helferefunktion der CD4⁺ Zellen notwendig (Abb. 8 & 10). Transiente Antigenpräsentation durch dendritische Zellen ruft keine ausreichende Tfh-Zell-Differenzierung hervor, um deren Funktion der B-Zell-Hilfe zu garantieren (Vergleich Abb. 8 Gruppen 4 und 6). Bei kontinuierlicher Antigenpräsentation hingegen ist sogar die antigenspezifische Interaktion mit B-Zellen nicht länger notwendig, um CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen aus naiven T-Zellen zu differenzieren (Abb. 8 Gruppe 5). Prolifizierte Tfh-Zellen akkumulierten nach mindestens 3-tägiger Antigenpräsentation. Wird diese auf den dendritischen Zellen jedoch unterbrochen bleiben sie in ihrer B-Zell-Hilfe dysfunktional (Abb. 15).

Zum Teil bestätigen sich unsere Ergebnisse in der Literatur. *Deenick et al., 2010* sahen eine Abhängigkeit der Differenzierung von Tfh-Zellen von kontinuierlicher und langlebiger Antigenpräsentation in Modell-Immunisierungen. *Benson et al., 2015* beschreiben im Rahmen von Influenza Infektionen ebenfalls, dass

die Dauer der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen entscheidend für die Tfh-Zell-Differenzierung ist und nach *Baumjohann et al., 2013* verschwinden CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen nach dem Transfer in nicht immunisierte Mäuse rasch wieder. *Benson et al., 2015* beschrieben auch in ihrem Modell eine gehemmte Tfh-Zell-Differenzierung, wenn die Interaktion der T-Zellen mit dendritischen Zellen nach 3 Tagen blockiert wurde (transiente Antigenpräsentation). Gleichzeitig beobachteten sie jedoch nach geblockter T-B-Zell-Interaktion nur eine eingeschränkte Differenzierung der T-Zellen, während diese weiter ungehemmt proliferieren. In li-rTAXTIM Tieren lässt sich keine antigenunabhängige Proliferationsphase von CD4⁺ T-Zellen finden (Rabenstein et al., 2014). Nach dem Entzug von Doxzyklin und damit des T-Zell-Antigens auf dendritischen Zellen hält auch die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen inne (Obst et al., 2005).

9.2 Bedeutung der Antigen-präsentierenden Zelle für die Tfh-Zell-Differenzierung

Die Differenzierung und Funktionalität von AND-T-Zellen in li-rTAXTIM Wirten ist von Antigen-präsentierenden Zellen abhängig. Das Antigen muss persistent auf dendritischen Zellen präsentiert werden und ist sowohl für die gesamte Expansionsphase, als auch zum Ausführen der Helferfunktion der CD4⁺ T-Zellen nötig (Abb. 8 & 10). Somit sprechen unsere Ergebnisse gegen ein zweistufiges Differenzierungsmodell von folliculären Helfer-T-Zellen. Dieses fordert, dass das T-Zellen zuerst mit dendritischen Zellen und nachfolgend mit B-Zellen interagieren müssen, um aus naiven T-Zellen Tfh-Zellen zu differenzieren.

1984 wurde in gemischten Lymphozytenreaktionen beschrieben, dass T-Zellen erst mit B-Zellen interagieren und B-Zell-helfende Faktoren exprimieren, wenn sie vorher von Antigenen auf dendritischen Zellen sensitiviert wurden (Inaba and Steinman, 1984). Auch in der Differenzierung zu Tfh-Zellen ist die Rolle der dendritischen Zelle als Antigen-präsentierende Zellen in Antikörperantworten entscheidend (Caminschi und Shortman, 2012). Im Einklang mit unseren Daten sind auch *Deenick et al., 2010*. In ihren Immunisierungen sehen sie die Tfh-Differenzierung unabhängig von B-Zell-Signalen und einzig die permanente Antigenpräsentation durch dendritische Zellen als entscheidenden Faktor.

Nach anderen Arbeiten ist eine auf dendritische Zellen beschränkte Antigenpräsentation jedoch nicht im Stande funktionstüchtige Tfh-Zellen hervorzubringen. Erst durch eine kombinierte antigenspezifische Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen und B-Zellen konnte deren vollständige Differenzierung zu Tfh-Zellen erreicht werden (Goenka et al., 2011, Barnett et al., 2014). Diese Tfh-Zellen (Goenka et al., 2011; Barnett et al., 2014), die durch die konsekutive Interaktion mit dendritischen Zellen und B-Zellen

generiert werden, könnten jedoch von den unseren verschieden sein. Nach Interaktion mit dendritischen Zellen exprimieren diese vor allem CXCR5, während in unseren Experimenten die Erhöhung von PD-1 dominiert (Abb. 10 C). Zudem konnten wir BCL-6, als Masterregulator von Keimzentrums-B-Zellen und Tfh-Zellen, weder in den transferierten und differenzierten B-Zellen, noch in den T-Zellen nachweisen (Cattoretti et al., 1995; Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Die Gründe könnten in verschiedenen Färbeprotokollen, aber auch AND-T-Zell-intrinsisch liegen. Trotzdem deutet es auf einen Unterschied unserer Keimzentrums-ähnlichen Phänotypen und „echten“ Tfh-Zellen hin.

In der Differenzierung von CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen war kein Unterschied zwischen der alleinigen, kontinuierlichen Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und einer zusätzlichen durch B-Zellen erkennbar. Unabhängig davon, ob Wildtyp (B10.BR) oder MCC-präsentierende B-Zellen im Empfängertier gegenwärtig waren (Abb. 8 C Vergleich zwischen Gruppen 5 & 6) entwickelten sich CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen in alleiniger Abhängigkeit von der gleichzeitigen Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen. Somit stellt sich die Frage, ob in der Differenzierung von Tfh-Zellen die Rolle der B-Zellen unter bestimmten Voraussetzungen komplett von dendritischen Zellen übernommen werden kann.

Einerseits kann die alleinige Antigenpräsentation durch dendritische Zellen in Modell-Immunsierungen und viralen Infektionen mit LCMV zur Tfh-Zell-Differenzierung ausreichen (Deenick et al., 2010; Fahey et al., 2011). Andererseits sind B-Zellen in anderen Modellen nötig gewesen um eine gebahnte Tfh-Zell-Differenzierung zu vervollständigen (Barnett et al., 2014; Baumjohann et al., 2013; Goenka et al., 2011). In der T-B-Zell-Interaktion scheint zum Beispiel die Expression von PD-L2 und ICOS auf B-Zellen erforderlich für die Tfh-Zell-Differenzierung zu sein (Choi et al., 2011; Good-Jacobson et al., 2010). In T-Zell-Co-Kultur konnten sogar nur B-Zellen und nicht dendritische Zellen die Tfh-Zell-typische Expression von CXCR5 induzieren (Qi et al., 2008). *Haynes et al., 2007* und *Johnston et al., 2009* finden in kompletter Abwesenheit von B-Zellen oder auch nur der Unmöglichkeit zur spezifischen Interaktion (kein passender Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex auf B-Zellen) – kein Signal 1 – jeweils verringerte Zahlen von Tfh-Zellen. Das spricht wiederum für eine wichtige Rolle der B-Zellen in der Tfh-Zell-Differenzierung. Die Abhängigkeit der Differenzierung von Tfh-Zellen von B-Zellen kann jedoch wohl gelöst werden, wenn das T-Zell-Antigen als Peptid im Verlauf intravenös injiziert wird (Deenick et al., 2010).

Nach Depletion der B-Zellen sinkt die Zahl der Tfh-Zellen stark (Baumjohann et al., 2013). Wir konnten hingegen keine Abhängigkeit des Überlebens der T-Zellen von der Interaktion mit B-Zellen feststellen.

Obwohl *Deenick et al., 2010* zwar die Differenzierung von Tfh-Zellen beschreiben, weisen sie weder die Bildung von Keimzentren, noch einen Antikörperklassenwechsel nach. Ihre Tfh-Zellen sind somit nicht bewiesenermaßen funktionstüchtig. Auch die Funktionalität der hier beschriebenen Tfh-Zellen bleibt unklar. Die CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen, die nicht mit B-Zellen interagierten, unterscheiden sich im Phänotyp nicht von T-Zellen, die antigenspezifisch mit transferierten B-Zellen in Interaktion standen (Abb. 8C 5&6). Ob sie jedoch nachfolgend liMCC-B-Zellen spezifisch helfen könnten oder ob sie sich erst noch weiter differenzieren müssten, um diese Hilfe leisten zu können, bleibt zu beweisen.

9.4 Abhängigkeit der B-Zell-Proliferation von der T-Zell-Hilfe

In keinem unserer Experimente konnten T-Zellen durch eine transiente Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen zu stabilen B-Zell-Helfern werden. Diese Funktion war absolut abhängig von zur gleichen Zeit stattfindender kontinuierlicher Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen. Dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen scheinen ein funktionelles Dreigespann zu bilden. Interessanterweise war nicht nur die B-Zell-Proliferation, sondern auch das Überleben schon proliferierter B-Zellen in gleicher Weise davon abhängig, dass die T-Zellen ihr Antigen zur gleichen Zeit auf dendritischen Zellen präsentiert bekamen (Abb. 8 und 15 – in Abbildung 15 sind schon früh proliferierte B-Zellen zu sehen, die sich z.B. in Abb. 8 nicht finden lassen, obwohl die im Verlauf abgeschaltete Antigenpräsentation vorher gleich lang war.). Der Regulation der B-Zell-Proliferation kommt eine wichtige Schutzfunktion zu. Zum Beispiel entwickeln sich die meisten B-Zelllymphome aus einer entarteten Proliferation von Keimzentrum-B-Zellen (Küppers et al., 1999).

Die B-Zellen scheinen nach der Differenzierung zu Keimzentrumzellen in einen Zustand überzugehen, der absolut von der T-Zell-Hilfe abhängt. Für eine Immunisierung mit NP-Ficoll wurde gezeigt, dass Keimzentren entstehen, die in Abwesenheit von T-Zellen sehr kurzlebig sind. Ihre Entwicklung bricht nach 3 Tagen ab (de Vinuesa et al., 2000). Dieser Abbruch wird eventuell durch das Abschalten der Expression des anti-apoptotischen Faktors BCL-2 verursacht (Zhang et al., 2016). Seine Aktivität unterstützt normalerweise die folliculäre Proliferation (McDonnell et al., 1989) und verlängert Antikörperantworten (Strasser et al., 1991). Die Keimzentrumreaktion bricht ebenfalls ab, wenn die CD40-CD40L Kontakte zwischen T- und B-Zellen blockiert werden (Han et al., 1995; Takahashi et al., 1998). Die Bindung von CD40 auf B-Zellen aktiviert unter anderem NF- κ B-Signalwege (Coope et al., 2002). NF- κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor des Immunsystems. Seine Aktivierung ist sowohl mit dem Überleben von gesunden Plasmazellen, als auch dem von Zelllinien des multiplen Myeloms assoziiert (O'Connor et al., 2004; Annunziata et al., 2007). Bei bis zu 17% der Patienten mit multiplen Myelom zeigen sich aktivierende

Mutationen des NF- κ B Signalwegs (Keats et al., 2007). Auch nach Mutationen, die den Funktionsverlust von inhibitorischen Mechanismen der NF- κ B-Expression verursachen (TRAF 2 und 3, sowie cIAP 1 und 2), sind ein verlängertes B-Zell-Überleben und eine größere Population von Keimzentrums-B-Zellen beobachtet worden (Gardam and Brink, 2014; Grech et al., 2004; Xie et al., 2007). Eventuell imitieren diese Mutationen einen der Effekte der T-B-Zell-Interaktion und die B-Zellen überleben.

Die Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen und somit ein möglicher Kompensationsmechanismus für mangelhafte T-Zell-Hilfe findet auch im Rahmen von Infektionen statt. Hier führen Signalwege des angeborenen Immunsystems, wie Liganden von Toll-like-Rezeptoren und/oder Sekretion des B-Zell-aktivierenden Faktors (B cell activating factor = BAFF) durch Monozyten, Makrophagen und/oder Neutrophilen Granulozyten, zur Aktivierung von NF- κ B (Hemmi et al., 2000; Do et al., 2000).

In unseren Experimenten ist einzig die Antigenpräsentation - Signal 1- für T-Zellen variiert worden und es fand keine Aktivierung des Immunsystems statt. So sind höchstwahrscheinlich keinerlei Kompensationsmechanismen aktiviert. Eventuell wurde dadurch die Abhängigkeit von der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen noch absoluter. Trotzdem wirken die Schwankungen der B-Zell-Proliferation eigenartig. In Abb. 8 C 6 und 11 B wurde Proliferationspotential gezeigt, dass in Abb. 14 nur noch durch zusätzliche Stimulation des B-Zell-Rezeptors abgerufen werden konnte. Ungleichheiten in der Reinheit des Tierstalls könnten in unterschiedlicher Stärke die Abhängigkeit von der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen hervorgerufen haben. Denn sowohl ein verändertes Mikrobiom, als auch eine Voraktivierung des Immunsystems durch Pathogene könnten wie bereits diskutiert weitreichende Folgen haben (Do et al., 2000; Hemmi et al., 2000; Molloy et al., 2012).

Offen bleibt, ob eine transiente Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen bei gleichzeitiger Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen, wie es physiologisch im Rahmen von Immunantworten zu erwarten wäre, doch in der Lage wäre aus naiven T-Zellen Tfh-Zellen zu differenzieren, die die charakteristischen Zytokine sezernieren und Antikörperklassenwechsel ermöglichen.

9.5 Möglichkeit des T-Zell-Priming durch alleinige Antigenpräsentation auf B-Zellen

Bei kontinuierlicher Doxyzyklinbehandlung und damit kontinuierlicher Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen ist die Tfh-Differenzierung unabhängig davon, ob Wildtyp (B10.BR) oder MCC-präsentierende B-Zellen mit AND-T-Zellen interagieren (Abb. 8 C Vergleich zwischen 5 & 6), jedoch war

auch eine alleinige Antigenpräsentation durch B-Zellen in der Lage T-Zellen zumindest zur Proliferation anzustoßen (Abb. 8 C Gruppe 2). Dies widerspricht der gegenwärtigen Lehrmeinung, dass naive T-Zellen nur von dendritischen Zellen aktiviert werden können.

Es gibt Studien, die zeigen, dass voraktivierte B-Zellen naive T-Zellen in Abwesenheit anderer professionell Antigen-präsentierender Zellen primen können (Rodriguez-Pinto and Moreno, 2005). Auch in gemischten Lymphozytenreaktionen sind LPS-stimulierte B-Zellen in der Lage T-Zellen zu aktivieren (Inaba and Steinman, 1984). An gleicher Stelle wird jedoch beschrieben, dass unstimulierte B-Zellen – wie sie es in unseren Experimenten vorliegen sollten – nicht der Lage sind T-Zellen zu aktivieren. Außerdem wird gezeigt, dass T-Zellen erst mit B-Zellen interagieren, wenn sie vorher von Antigenen auf dendritischen Zellen sensibilisiert wurden. Auch Polly Matzinger und Kollegen beschrieben das Unvermögen unstimulierter B-Zellen T-Zellen zu aktivieren (Fuchs and Matzinger, 1984, Lassila et al., 1988).

Hier ist es wichtig die technischen Hintergründe zu hinterfragen, unter denen T-Zell-Priming durch die verschiedenen Zellen in den genannten Studien untersucht wurde. So ist zu beachten, dass die T-Zell-Aktivierung durch B-Zellen in *Rodriguez-Pinto and Moreno, 2005* in Mäusen Rag knock-out beobachtet worden ist. In diesen stark lymphopänischen Tieren herrschen fördernde Bedingungen für eine homöostatische Lymphoproliferation (Bell et al., 1987). Diese Bedingungen existieren in li-rTAxTIM nicht.

Offen bleibt unter welchen Bedingungen B-Zellen die Fähigkeit zum T-Zell-Priming erlangen und warum sie in li-rTAxTIM zwar T-Zell-Proliferationen, aber keine Differenzierung auslösen konnten, bzw. welche Eigenschaften oder Signale ihnen dazu fehlten.

9.6 Einfluss physiologischerer Vorläuferfrequenzen auf die T-B-Zell-Interaktion

Selbst für Epitope, die sehr breit abgedeckt sind, finden sich zu Beginn von Immunantworten nicht mehr als 1500 naive Vorläufer-T-Zellen in einer Maus. Nur 20-250 davon sind spezifisch für einen Peptid-MHC-Komplex (Jenkins and Moon, 2012). Um die Chancen zu erhöhen adoptiv transferierte Zellen bei der Endanalyse wiederzufinden und in aussagekräftigen Zellzahlen analysieren zu können, injizierten wir 10^6 Zellen. Speziell für Proliferationsanalysen mittel CFSE oder CTV sind ausreichende Zellzahlen immer noch unerlässlich. Somit transferierten wir jedoch 10.000-fach mehr antigenspezifische T-Zellen, als in einem naiven endogenen Repertoire zu finden wären. Die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Resultate aus solchen Experimenten ist deswegen zu hinterfragen. Geringere transferierte Zellzahlen und somit

physiologischere Vorläuferfrequenzen ergaben keine erkennbare Verfälschung, bzw. Unterschätzung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens über den getesteten Bereich (Abb. 12).

Bisher nicht publizierte Daten unseres Labors suggerieren, dass hohe transferierte Zellzahlen die Differenzierung zu Keimzentrumzellen (Tfh-Zellen, sowie Keimzentrums-B-Zellen) nach SRBC-Immunisierungen hemmen können (Masterthesis: Berger K., (2013)). Zudem ist die Populationsexpansion und Differenzierung von T-Zellen monoklonaler CD4⁺ T-Zell-Repertoires, verglichen mit polyklonalen CD4⁺ T-Zell-Repertoires im Modell einer Listerieninfektionen eingeschränkt (Foulds and Shen, 2006). Andere Studien beschreiben, dass die Größe der Vorläuferpopulation auch einen fördernden Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von T-Zellen haben kann. Die Populationsgröße der Vorläuferzellen beeinflusst die Stärke der T-Zell-Expansion positiv, beschreiben *Moon et al., 2007* im Rahmen von Peptid-Immunisierungen und auch in der Programmierung des Zellschicksals spielen sie eine Rolle. Für CD8⁺ T-Zellen wurde gezeigt, dass die primären Vorläuferpopulationen nicht nur die primäre, sondern auch die sekundäre Antwort aus Gedächtniszellen in Untersuchungen von Infektionen mit dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) beeinflussen (Obar et al., 2008). Die Vorläuferfrequenz hat auch Einfluss auf die Effektorfunktionen und Zell-Zell-Kommunikationen. Die Abstoßung von Hauttransplantaten läuft mit steigender Anzahl T-Zellen rascher ab und ist unabhängiger von einer Ko-Stimulation durch CD28 und CD40 (Ford et al., 2007). Im gleichen Artikel wird jedoch auch beschrieben, dass die absoluten Zellzahlen von Effektor CD8⁺ T-Zellen bei der Endanalyse unabhängig von den Ausgangspopulationen sind. Kleinere Populationen proliferierten stärker und glichen den zahlenmäßigen Nachteil aus. Vielleicht erstellt das Immunsystem selbstregulierend eine optimale Effektorpopulationsgröße, um diese unabhängig von der individuellen Vorläuferfrequenz zu erreichen. Damit wären auch seltene Pathogene, bzw. Epitope effektiv zu bekämpfen. Eine ausgleichende stärkere Proliferation kleiner Populationen können wir mit unseren Experimenten zwar nicht bestätigen, zumindest aber schien T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation (die hier gemessene Effektorfunktion der T-Zellen) nicht abhängig von der Vorläuferfrequenz zu sein. Zuletzt wird auch das Langzeitüberleben durch die Häufigkeit eines Klons beeinflusst. Um möglichst breite Repertoires aufrechtzuerhalten, haben CD4⁺ T-Zellen eines seltenen Klons auf lange Sicht Überlebensvorteile (Hataye et al., 2006). Mit dem Lebensalter schrumpft im Menschen das Gesamtrepertoire der T-Zellen wiederum, was vielleicht die abnehmende Influenzaimmunität im Alter erklären kann (Yager et al., 2008).

Im Gegensatz zu T-Zell-Vorläuferfrequenzen und ihren Implikationen, ist über die Bedeutung der Ausgangspopulationsgröße antigenspezifischer B-Zellen weniger bekannt. Speziell bei niedrigeren Zahlen spezifischer Vorläuferzellen scheinen jedoch Immunantworten zu einer eher geringen Follikelbildung zu

führen. So müssen mindestens 10^5 spezifische Vorläufer B-Zellen vor der Applikation von NP-Ficoll transferiert werden, um Keimzentren überhaupt hervorzurufen (de Vinuesa et al., 2000). Je mehr B-Zellen gespritzt werden, desto größer das relative Volumen der Keimzentren. Bei Transfer von höchstens $0,3 \times 10^5$ Zellen waren durch diese Autoren nur noch extrafollikuläre Antworten zu beobachten. In der vorliegenden Arbeit war es schwierig bei Transfer von weniger als 10^5 B-Zellen diese überhaupt in ausreichender Zahl wiederzufinden, um Aussagen über ihren Phänotyp und ihre Lokalisation zu machen. Ihr Proliferationsverhalten war aber dem in Experimenten mit höheren Zahlen ähnlich.

Mit höheren transferierten Zellzahlen erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit, dass die transferierten Zellen mit den passenden Antigen-präsentierenden Zellen interagieren, eventuell sogar an eigentlich unphysiologischen Orten mit anderen Mikromilieus. Es bleibt unklar, wo genau die T-B-Zell-Interaktion stattgefunden hat. Hier könnten histologische Studien mehr Klarheit über die tatsächliche Lokalisation unserer T-B-Zell-Interaktion und Proliferationen und auch den eventuellen Einfluss verschiedener Vorläuferfrequenzen darauf bringen.

9.6 Einfluss eines B-Zell-Rezeptor-Signals auf die T-B-Zell-Interaktion

Wir transferierten stets unstimulierte liMCC-B-Zellen. Zwar präsentieren diese das T-Zell-Antigen auf MHC-Klasse-II, doch sie selbst wurden in den Experimenten, die in Abb. 8, 11 und 12 dargestellt sind, nicht durch ihr eigenes Antigen stimuliert. Durch die Applikation eines B-Zell-Antigens wollten wir untersuchen, ob die absolute Abhängigkeit der T-Zell-Hilfe von dendritischen Zellen durch die B-Zell-Stimulation zu entschärfen ist. In diesem Fall wären stimulierte B-Zellen als führende Antigen-präsentierende Zelle im Rahmen von physiologischen Immunantworten denkbar. Es zeigte sich allerdings nur eine verstärkende Wirkung auf die schon beobachteten Proliferationen und Differenzierungen der B-Zellen und keine Veränderung der Abhängigkeit von der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (Abb. 14).

Ein Signal durch den antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor, d.h. membranständiges Immunglobulin, hat verschiedenste Wirkungen auf das Zellschicksal. Es führt z.B. zur Endozytose des Antigen-Rezeptor-Paares. Dieses wird endosomal prozessiert und Teilpeptide werden auf MHC-Klasse-II präsentiert, um an die T-Zell-Hilfe zu gelangen. Für diese Interaktion müssen sich T und B-Zellen begegnen. Sie treffen sich an der Grenze ihrer jeweiligen Zellzonen in den sekundär lymphatischen Organen. Die B-Zellen steigern in Reaktion auf ein B-Zell-Rezeptor-Signal die Expression von CCR7 und migrieren zur T-Zell-Zone (Okada et al., 2005; Reif et al., 2002). CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der in der T-Zell-Zone essenziell ist und ohne den sich in sekundären lymphatischen Organen keine T-Zell-Zone findet. Auch IgG-Antikörperantworten

nach Immunisierung mit Dinitrophenylat gebunden an das oft genutzte Trägerprotein Schlitzschnecken-Hämocyanin werden verzögert (Förster et al., 1999). Die Intensität des B-Zell-Rezeptor-Signals, bestimmt durch dessen Affinität, steuert zudem die Dichte von MHC-Klasse-II Molekülen auf der Oberfläche der B-Zellen, wodurch diese verstärkt mit selektierenden T-Zellen interagieren (Schwickert et al., 2011). Die Präsentation von mehr Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexen durch B-Zellen könnte für bessere T-Zell-Hilfe und stärkere B-Zell-Proliferation verantwortlich gewesen sein.

CXCR5 ist der Rezeptor für das Chemokin CXCL13, dessen Konzentration in Richtung der Follikel ansteigt (Breitfeld et al., 2000; Haynes et al., 2007; Schaerli et al., 2000). Signale durch CXCR5 im Follikel verstärken die Polarisierung der B-Zellen und ihre Aktivierbarkeit durch den B-Zell-Rezeptor (Saez de Guinoa et al., 2011). Zudem werden Antigene auf der Oberfläche von follikulären dendritischen Zellen rezykliert und bleiben für längere Zeit für die Aktivierung von B-Zellen verfügbar (Heesters et al., 2013). So entfaltet sich die Signalwirkung des Antigens für B-Zellen erst im Follikel zur vollen Stärke. Eine vorhergehende Keimzentration wäre Voraussetzung für das optimale Ansprechen auf B-Zell-Antigene. Fehlende Keimzentren bei Applikation des HEL (Tag 1) könnten erklären, warum dieses keine Wirkung hatte. So ist es möglich, dass ein Teil der Wirkung verpuffte. Außerdem transferierten wir transgene, monoklonale, hochaffine liMCCxSW-B-Zellen und eliminierten damit gleichzeitig Unterschiede in Antigenpräsentation und Stimulierbarkeit, die bei normaler klonaler Selektion auf Affinitätsunterschieden beruhen. Es fand kein Wettbewerb verschiedener Klone um die T-Zell-Hilfe statt.

Es bleibt offen, ob und wann ein B-Zell-Rezeptor-Signal die Rolle der B-Zellen in der Differenzierung von Tfh-Zellen verändern kann, da wir nur ein einzige experimentelle Anordnung untersuchten, die B-Zellen zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor zu stimulieren und diese Wirkung größtenteils verpufft sein könnte.

9.6 Fehlender Antikörperklassenwechsel der B-Zellen im transgenen System

Das Ziel einer Antwort des adaptiven Immunsystems ist die Produktion von hochspezifischen Antikörpern. Damit sich B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren und diese Antikörper sezerniert werden, muss ein Klassenwechsel der Immunglobuline vollzogen werden. Einen solchen konnten wir nur nach SRBC-Immunisierungen und nicht in den transgenen li-rTAXTIM Mäusen beobachten. Obwohl wir in beiden Experimenten ähnliche Keimzentrationstypen fanden und zum Teil die B-Zellen zusätzlich durch ihr eigenes Antigen stimulierten, vollzogen sie keinen Antikörperklassenwechsel (Abb. 16).

Wir variierten in unseren Experimenten mit transgenen li-rTAxTIM Mäusen einzig die Antigenpräsentation - Signal 1- für T-Zellen. Es fand keine Aktivierung des Immunsystems statt und somit fehlte auch eine Aktivierung der dendritischen Zellen. Ohne vorherige Aktivierung befinden sich dendritische Zellen in einem ruhenden Stadium, in dem sie ohne zusätzliche Adjuvanzen zwar T-Zellen kurzzeitig antigenspezifisch zur Proliferation anregen können, nachfolgend aber Anergie und teilweise T-Zell-Depletionen induzieren (Hawiger et al., 2001). Eine etablierte Aktivierung von dendritischen Zellen durch eine Injektion von anti-CD40 (wie in *Han et al., 2010*) unterließen wir, da sie B-Zellen ebenfalls aktivieren kann (Clark et al., 1985). An anderer Stelle sind unstimulierte dendritische Zellen durchaus in der Lage gewesen Antikörperantworten zu induzieren. Nur finden diese verlangsamt statt und sind abhängig davon, über welche Moleküle das T-Zell-Antigen gezielt auf dendritische Zellen gebracht wird (Corbett et al., 2005).

Die Begrenzung der Keimzentrumsreaktionen könnte durch die Entwicklung von regulatorischen Tfh-Zellen begründet sein (Alexander et al., 2011). Ob unsere T-Zellen aber regulatorische Charakteristika, wie die Sekretion von IL-10 aufweisen, bleibt abzuklären.

Wir fanden keinen Einfluss eines Signals über den B-Zell-rezeptors auf den Antikörperklassenwechsel. Eine Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch Antigen kann der entscheidende Faktor sein, Keimzentrums-B-Zellen für die Weiterentwicklung zur Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu selektionieren (Mueller et al., 2015). Antigene werden opsoniert und auf follikulären dendritischen Zellen als Immunkomplexe abgelagert. So stellen sie einen „Antigenvorrat“ im Keimzentrum zu Verfügung (Heesters et al., 2013). Die höchstaffinen B-Zell-Klone präsentieren im Verlauf immer mehr Peptid-MHC-II-Komplexe, was wieder ihre Interaktion mit Tfh-Zellen intensiviert (Schwickert et al., 2011; Gitlin et al., 2014). Tfh-Zellen steigern nach dem Kontakt mit B-Zellen die Produktion von IL-4 und IL-21 (Shulman et al., 2014). IL-4 ist eines der wichtigsten Zytokine für den Antikörperklassenwechsel und spielt auch eine Rolle in der Entstehung von Keimzentren (Toellner, 2014; Turqueti-Neves et al., 2014). Eine IL-Defizienz könnte den Mangel an Antikörperklassen-wechselnden Zellen erklären. Ihre Differenzierung ist von IL-21 abhängig (Ozaki et al., 2004). Interessanterweise wurden solche IL-21 defizienten Tfh-Zellen beobachtet, wenn Tfh-Zellen Peptid-MHC-II –Komplexe nur durch dendritische Zellen präsentiert bekamen (Barnett et al., 2014; Goenka et al., 2011). Dass die fehlende späte Selektion durch eine Antigen-abhängige, intensivierete Tfh-B-Zell-Interaktion für das absolute Fehlen des Antikörperklassenwechsels verantwortlich war, ist aber unwahrscheinlich. Schon bevor Keimzentren entstehen und sogar schon zum Zeitpunkt der ersten

Interaktion an der Grenze der T- und B-Zell-Zone wechseln bereits erste B-Zellen die Antikörperklasse (Pape et al., 2003; Marshall et al., 2011).

Durch den Transfer von hochaffinen B-Zell-Klonen fehlte eine Dynamik der Antigenpräsentation. Dies verhinderte eventuell die Selektion eines höchaffinen B-Zell-Klons durch Tfh-Zellen. Die Veränderung des zytoplasmatischen Endes der membranständigen Igs während des Antikörperklassenwechsels übt regulatorische Funktionen aus. Die Antigenpräsentation für T-Zellen kann durch eine höhere Affinität verbessert werden, was wiederum zu einer verstärkten Plasmazelldifferenzierung führen kann (Kaisho et al., 1997, Martin und Goodnow, 2002, Zhang et al., 2016,). So könnte eine Selektionsdynamik über die Affinität den Antikörperklassenwechsel verstärken.

Vielleicht begann die primäre Antwort in unseren Experimenten auch mit zu hoher anfänglicher Affinität der transgenen B-Zellen und verhinderte einen späteren Klassenwechsel. Antikörper von sehr hoher Affinität beenden Keimzentrumsreaktionen nach Modell-Immunisierungen (Zhang et al., 2013). Im klinischen Alltag wird z.B. im Rahmen einer Rhesus-Prophylaxe die Bildung von Antikörper gegen Rhesus-positives kindliches Blut durch die Injektion von hochaffinen Antikörpern unterbunden.

Ob die in unserem System erzeugten Tfh-Zellen Defizienzen in der Zytokinproduktion – wie IL-21 und IL-4 – zeigen, bleibt zu klären.

9.7 Limitationen und Forschungsausblick

Wir waren in der Lage T-Zell-abhängige B-Zell-Proliferation in li-rTAXTIM hervorzurufen und durch die i.v. Applikationen von in PBS gelöstem Antigen zu verstärken. Ein Antikörperklassenwechsel oder auch die Verringerung der Abhängigkeit von der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen blieb aber aus. Es bleibt unklar, ob unsere Tfh-Zellen Zytokineffizienzen aufweisen, ob dendritischen Zellen wirklich sämtliche Schritte in der Tfh-Zell-Differenzierung kontrollieren, wo genau die T-B-Zell-Interaktion stattfand, ob wir folliculäre oder extrafolliculäre Antworten beobachten konnten und ob die Aktivierung des angeborenen Immunsystems die Abhängigkeit von der Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen entschärfen kann oder auch der Schlüssel zum Antikörperklassenwechsel ist.

Die von uns beobachtete B-Zell-Proliferation beweist zwar eine Funktionalität der transferierten AND-T-Zellen und auch die Oberflächenmarkerprofile sprechen für Keimzentrumsreaktionen, doch fehlt uns der Nachweis des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6, um sowohl die B-Zellen als Keimzentrums-B-Zellen, als auch die T-Zellen als Tfh-Zellen eindeutig zu definieren.

Die fehlende Dynamik der Antigenpräsentation durch B-Zellen und damit wechselnder Zugang zur selektierenden T-Zell-Hilfe zu evaluieren, wäre ein weiterer interessanter Aspekt zukünftiger Untersuchungen. Mit SW-B-Zellen könnte die Notwendigkeit für die Dynamik untersucht werden. In li-rTAXTIM könnten MRBC gekoppelt an ein Konjugat aus HEL und PCC den B-Zell-Rezeptor stimulieren und gleichzeitig auf natürlichere und dynamischere Weise präsentiert werden, als im transgenen liMCC-Konstrukt.

SW-B-Zellen weisen eine sehr hohe Affinität zum HEL auf. Bisher fehlt diesen B-Zellen also der Anreiz zur Affinitätsmaturation, um den Zugang zu selektierender T-Zell-Hilfe zu bekommen. Die anfängliche Affinität zu verringern und damit den Wettbewerb zu steigern, könnte durch die Injektion von verändertem HEL oder von Enteneier Lysozym (duck egg lysozyme = DEL) erreicht werden (Paus et al., 2006; Idee auch in Masterthesis Berger K., 2013).

Wir applizierten HEL frei in PBS gelöst intravenös. Für diese Verabreichungsart von Proteinantigen ist allerdings schon beschrieben worden, dass sie spezifische Toleranz initiierten (Verbeek et al., 2007). Eine subkutane Applikation und Analyse des drainierenden Lymphknotens wäre vergleichend durchzuführen,

um auszuschließen, dass der intravenöse Applikationsweg für die Dysfunktionalität der Antikörperantwort verantwortlich war.

Zuletzt wäre es aufschlussreich, die Funktionalität der Keimzentrumsreaktionen in li-rTAXTIM mit einem Pathogen und so während einer Infektion zu testen. Die Aktivierung des Immunsystems könnte ein bisher fehlender Baustein zur funktionalen Antikörperantwort sein. Ein T-Zell-abhängiger HEL-tragender Erreger, ist nach unserer Kenntnis jedoch noch nicht verfügbar.

Jeder experimentelle Aufbau kann unterschiedliche Arten von T-Zellen, bzw. unterschiedliche Tfh-ähnliche Zellen hervorrufen, da T-Zell-Differenzierung und Entwicklung eine außerordentlich hohe Plastizität aufweisen (Sallusto, 2016). In vivo oder in vitro generierte Tfh-ähnliche Zellen können unter polarisierenden Bedingungen die charakteristischen Zytokine von Th1, Th2 oder auch Th17 Zellen sezernieren und umgekehrt waren diese T-Zelllinien auch in Tfh-ähnliche Zellen umprogrammierbar (Lu et al., 2011). Jegliche Zwischen- und Endstufen von differenzierten T-Zellen sind demnach unter verschiedenen experimentellen Bedingungen vorstell- und eventuell beobachtbar.

10. Zusammenfassung

Die Produktion von hochaffinen Antikörpern durch differenzierte B-Zellen ist ein schlagkräftiges variables Schutzsystem unseres Körpers gegen Pathogene und wird z.B. im Rahmen von Impfungen klinisch genutzt. In Keimzentren findet die Affinitätsreifung der Antikörper unter Regulation durch T-Helfer-Zellen statt. Differenzierte folliculäre T-Helfer-Zellen (Tfh-Zellen) sind die auf diese B-Zell-Hilfe spezialisierte T-Zell-Subpopulation. Die Bedingungen, unter denen sich naive T-Zellen zu Tfh-Zellen differenzieren, sind jedoch noch nicht ausreichend aufgeklärt.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass die kontinuierliche Präsentation des T-Zell-Antigens auf dendritischen Zellen unabkömmlich für die Differenzierung von Tfh-Zellen und das Aufrechterhalten der produktiven Interaktion von T-Zellen und B-Zellen ist. Bisher wurde in der Literatur diskutiert, ob eine alleinige kontinuierliche Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen schon hinreichend für die Tfh-Zell-Differenzierung und Antikörperantwort ist oder ob eine konsekutive Interaktion der T-Zellen mit dendritischen Zellen und nachfolgend mit B-Zellen zur vollständigen Differenzierung vonnöten ist. In einigen Untersuchungen gelang es dendritische Zellen allein nur Zytokin-defiziente Tfh-Zellen zu erzeugen. Erst die zusätzliche Interaktion mit B-Zellen führte zur Enddifferenzierung. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der dendritischen Zellen als wichtigste und unabkömmliche Antigen-präsentierende Zellen im Rahmen von Antikörperantworten. Um die physiologischen Keimzentrumsreaktionen zu verstehen bilden sie jedoch nur einen kleinen Baustein. In der Pathogenabwehr sind sowohl Teile des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems aktiviert und kommunizieren untereinander. Nachdem wir die Bedeutung der Antigen-präsentierenden Zellen und Dauer der Antigen-Präsentation untersuchten, bleiben die Auswirkungen von anderen stimulatorischen Signalwegen, die physiologisch aktiv wären, auf die Abhängigkeiten der Tfh-Zell-Differenzierung weitestgehend unklar. Ein umfassendes Verständnis der verschiedenen Interaktionen in Keimzentren und der Differenzierung von Keimzentrums-Zellen kann helfen Impfungen zu verbessern und ihr Einsatzgebiet z.B. auf verschiedene Tumorerkrankungen auszudehnen.

11. Literatur

- Alexander, C.M., Tygrett, L.T., Boyden, A.W., Wolniak, K.L., Legge, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2011). T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. *Immunology* *133*, 452-468.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007a). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* *27*, 190-202.
- Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007b). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528-531.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., *et al.* (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* *12*, 115-130.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* *181*, 1767-1779.
- Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* *36*, 847-856.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Barnett, L.G., Simkins, H.M., Barnett, B.E., Korn, L.L., Johnson, A.L., Wherry, E.J., Wu, G.F., and Laufer, T.M. (2014). B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation. *J Immunol* *192*, 3607-3617.
- Barquet, N., and Domingo, P. (1997). Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med* *127*, 635-642.
- Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., *et al.* (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* *115*, 975-984.
- Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1998). Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* *8*, 751-759.
- Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (2000). B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J* *19*, 513-520.
- Baumjohann, D., Okada, T., and Ansel, K.M. (2011). Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *J Immunol* *187*, 2089-2092.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* *38*, 596-605.
- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* *10*, 167-175.
- Bell, E.B., Sparshott, S.M., Drayson, M.T., and Ford, W.L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. *J Immunol* *139*, 1379-1384.

- Benson, R.A., MacLeod, M.K., Hale, B.G., Patakas, A., Garside, P., and Brewer, J.M. (2015). Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *eLife* 4.
- Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121-1129.
- Berger K. (2013). Conditions of T cell priming by dendritic cells for B cell help. Masterthesis Biochemische Fakultät der LMU München
- Bevan, M.J. (2004). Altered self, altered world. *J Immunol* 173, 2897-2898.
- Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, 303-313.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192, 1545-1552.
- Burnet, F.M. (1976). The clonal selection theory of acquired immunity (Nashville: Vanderbilt University Press).
- Burnet, F.M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austral. J. of Science* 20.67-69. Reprinted in: *CA Cancer J Clin* 26, 119-121.
- Caminschi, I., and Shortman, K. (2012). Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends Immunol* 33, 71-77.
- Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 32, 253-265.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.
- Cervenak, L., Magyar, A., Boja, R., and Laszlo, G. (2001). Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol Lett* 78, 89-96.
- Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189, 1639-1648.
- Choi, Y.S., Gullicksrud, J.A., Xing, S., Zeng, Z., Shan, Q., Li, F., Love, P.E., Peng, W., Xue, H.H., and Crotty, S. (2015). LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat Immunol* 16, 980-990.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932-946.
- Choi, Y.S., Yang, J.A., and Crotty, S. (2013). Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (Tfh) cells. *Curr Opin Immunol* 25, 366-372.
- Claman, H.N., Chaperon, E.A., and Triplett, R.F. (1966). Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations. *J Immunol* 97, 828-832.

- Clark, E.A., Shu, G., and Ledbetter, J.A. (1985). Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 1766-1770.
- Coffey, A.J., Brooksbank, R.A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G.R., Bye, J.M., Cahn, A.P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., *et al.* (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* *20*, 129-135.
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G., Johnston, L.H., and Ley, S.C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* *21*, 5375-5385.
- Corbett, A.J., Caminschi, I., McKenzie, B.S., Brady, J.L., Wright, M.D., Mottram, P.L., Hogarth, P.M., Hodder, A.N., Zhan, Y., Tarlinton, D.M., *et al.* (2005). Antigen delivery via two molecules on the CD8- dendritic cell subset induces humoral immunity in the absence of conventional "danger". *Eur J Immunol* *35*, 2815-2825.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* *29*, 621-663.
- Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* *11*, 114-120.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* *421*, 282-287.
- Cyster, J.G. (2010). Shining a light on germinal center B cells. *Cell* *143*, 503-505.
- de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G., and MacLennan, I.C. (2000). Germinal centers without T cells. *J Exp Med* *191*, 485-494.
- de Wit, J., Jorritsma, T., Makuch, M., Remmerswaal, E.B., Klaasse Bos, H., Souwer, Y., Neefjes, J., ten Berge, I.J., and van Ham, S.M. (2015). Human B cells promote T-cell plasticity to optimize antibody response by inducing coexpression of T(H)1/T(FH) signatures. *J Allergy Clin Immunol* *135*, 1053-1060.
- Deenick, E.K., Chan, A., Ma, C.S., Gatto, D., Schwartzberg, P.L., Brink, R., and Tangye, S.G. (2010). Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* *33*, 241-253.
- Delves, P.J., and Roitt, I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* *343*, 37-49.
- Di Niro, R., Lee, S.J., Vander Heiden, J.A., Elsner, R.A., Trivedi, N., Bannock, J.M., Gupta, N.T., Kleinstein, S.H., Vigneault, F., Gilbert, T.J., *et al.* (2015). Salmonella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed by Extrafollicular Affinity Maturation. *Immunity* *43*, 120-131.
- Dinc, G., and Ulman, Y.I. (2007). The introduction of variolation 'A La Turca' to the West by Lady Mary Montagu and Turkey's contribution to this. *Vaccine* *25*, 4261-4265.
- Do, R.K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M.R., Hilbert, D., and Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med* *192*, 953-964.
- Fagraeus, A. (1948). The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol* *58*, 1-13.
- Fahey, L.M., Wilson, E.B., Elsaesser, H., Fistonich, C.D., McGavern, D.B., and Brooks, D.G. (2011). Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* *208*, 987-999.

- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* *10*, 375-384.
- Ferguson, S.E., Han, S., Kelsoe, G., and Thompson, C.B. (1996). CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* *156*, 4576-4581.
- Ford, M.L., Koehn, B.H., Wagener, M.E., Jiang, W., Gangappa, S., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2007). Antigen-specific precursor frequency impacts T cell proliferation, differentiation, and requirement for costimulation. *J Exp Med* *204*, 299-309.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33.
- Foulds, K.E., and Shen, H. (2006). Clonal competition inhibits the proliferation and differentiation of adoptively transferred TCR transgenic CD4 T cells in response to infection. *J Immunol* *176*, 3037-3043.
- Foy, T.M., Laman, J.D., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R.J. (1994). gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* *180*, 157-163.
- Fuchs, E.J., and Matzinger, P. (1992). B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* *258*, 1156-1159.
- Gardam, S., and Brink, R. (2014). Non-Canonical NF- κ B signaling initiated by BAFF influences B cell biology at multiple junctures. *Front Immunol* *4*, 509.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., and Jenkins, M.K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* *281*, 96-99.
- Giles, J.R., Kashgarian, M., Koni, P.A., and Shlomchik, M.J. (2015). B cell-specific MHC Class II deletion reveals multiple nonredundant roles for B cell antigen presentation in murine lupus. *J Immunol* *195*, 2571-2579.
- Gitlin, A.D., Mayer, C.T., Oliveira, T.Y., Shulman, Z., Jones, M.J., Koren, A., and Nussenzweig, M.C. (2015). T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science* *349*, 643-646.
- Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* *509*, 637-640.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J Immunol* *187*, 1091-1095.
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* *11*, 535-542.
- Grech, A.P., Amesbury, M., Chan, T., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2004). TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF- κ B activation in mature B cells. *Immunity* *21*, 629-642.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dräger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A.A., Mages, H.W., *et al.* (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* *4*, 261-268.
- Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* *384*, 364-367.

- Habs, H. (1982). Immunological concepts in Thucydides' works. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 252, 143-146.
- Han, S., Asoyan, A., Rabenstein, H., Nakano, N., and Obst, R. (2010). Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20453-20458.
- Han, S., Hathcock, K., Zheng, B., Kepler, T.B., Hodes, R., and Kelsoe, G. (1995). Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 155, 556-567.
- Harker, J.A., Lewis, G.M., Mack, L., and Zuniga, E.I. (2011). Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 334, 825-829.
- Hastey, C.J., Elsner, R.A., Barthold, S.W., and Baumgarth, N. (2012). Delays and diversions mark the development of B cell responses to *Borrelia burgdorferi* infection. *J Immunol* 188, 5612-5622.
- Hataye, J., Moon, J.J., Khoruts, A., Reilly, C., and Jenkins, M.K. (2006). Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 312, 114-116.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1^{High} Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology* 179, 5099-5108.
- Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., and Carroll, M.C. (2013). Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38, 1164-1175.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 20, 165-196.
- Inaba, K., and Steinman, R.M. (1984). Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* 160, 1717-1735.
- Jenkins, M.K., Chu, H.H., McLachlan, J.B., and Moon, J.J. (2010). On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annu Rev Immunol* 28, 275-294.
- Jenkins, M.K., and Moon, J.J. (2012). The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol* 188, 4135-4140.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Kaisho, T., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1997). The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 276, 412-415.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., *et al.* (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med* 209, 2079-2097.

- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R., and Hedrick, S.M. (1989). Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* **341**, 746-749.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**, 131-144.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* **193**, 1373-1381.
- Kipp, D.E., Adorini, L., Hill, S., Miller, A., and Sercarz, E.E. (1980). Partial overlap of Ir gene-controlled responses to two proteins of limited relatedness: hen egg-white lysozyme and human lysozyme. *Ann Immunol (Paris)* **131c**, 311-325.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2639-2644.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**, 1520-1529.
- Lassila, O., Vainio, O., and Matzinger, P. (1988). Can B cells turn on virgin T cells? *Nature* **334**, 253-255.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* **207**, 353-363.
- Linterman, M.A., Denton, A.E., Divekar, D.P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espeli, M., *et al.* (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* **3**.
- Lu, K.T., Kanno, Y., Cannons, J.L., Handon, R., Bible, P., Elkahlon, A.G., Anderson, S.M., Wei, L., Sun, H., O'Shea, J.J., *et al.* (2011). Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity* **35**, 622-632.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). Taschenlehrbuch Histologie 3. Auflage (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart). Seite 350 & 353
- Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S.E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., *et al.* (2012). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* **2012**, 827480.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117-139.
- MacLennan, I.C., Toellner, K.M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M., Zuniga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* **194**, 8-18.
- Marshall, J.L., Zhang, Y., Pallan, L., Hsu, M.C., Khan, M., Cunningham, A.F., MacLennan, I.C., and Toellner, K.M. (2011). Early B blasts acquire a capacity for Ig class switch recombination that is lost as they become plasmablasts. *Eur J Immunol* **41**, 3506-3512.
- Martin, S.W., and Goodnow, C.C. (2002). Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* **3**, 182-188.

- Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26, 133-169.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79-88.
- Molloy, M.J., Bouladoux, N., and Belkaid, Y. (2012). Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol* 24, 58-66.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203-213.
- Mueller, J., Matloubian, M., and Zikherman, J. (2015). Cutting edge: An in vivo reporter reveals active B cell receptor signaling in the germinal center. *J Immunol* 194, 2993-2997.
- Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2008). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., *et al.* (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.
- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.
- Obar, J.J., Khanna, K.M., and Lefrancois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28, 859-869.
- Obst, R., van Santen, H.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4+ T cell response. *J Exp Med* 201, 1555-1565.
- Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med* 205, 2873-2886.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 3, e150.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., *et al.* (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173, 5361-5371.
- Pape, K.A., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H.L., Cyster, J.G., Tze, L.E., Hippen, K.L., Behrens, T.W., and Jenkins, M.K. (2003). Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med* 197, 1677-1687.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* 203, 1081-1091.

- Pereira, J.P., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2010). Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol* **22**, 413-419.
- Phan, T.G., Amesbury, M., Gardam, S., Crosbie, J., Hasbold, J., Hodgkin, P.D., Basten, A., and Brink, R. (2003). B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells. *J Exp Med* **197**, 845-860.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med* **203**, 2419-2424.
- Poholek, A.C., Hansen, K., Hernandez, S.G., Eto, D., Chandele, A., Weinstein, J.S., Dong, X., Odegard, J.M., Kaech, S.M., Dent, A.L., *et al.* (2010). In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* **185**, 313-326.
- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* **455**, 764-769.
- Rabenstein, H., Behrendt, A.C., Ellwart, J.W., Naumann, R., Horsch, M., Beckers, J., and Obst, R. (2014). Differential kinetics of antigen dependency of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **192**, 3507-3517.
- Racine, R., Jones, D.D., Chatterjee, M., McLaughlin, M., Macnamara, K.C., and Winslow, G.M. (2010). Impaired germinal center responses and suppression of local IgG production during intracellular bacterial infection. *J Immunol* **184**, 5085-5093.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758.
- Rasheed, A.U., Rahn, H.P., Sallusto, F., Lipp, M., and Muller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5^{hi}ICOS^{hi} CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* **36**, 1892-1903.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94-99.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* **10**, 385-393.
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **18**, 21-25.
- Rivera, A., Siracusa, M.C., Yap, G.S., and Gause, W.C. (2016). Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nat Immunol* **17**, 356-363.
- Rodriguez-Pinto, D., and Moreno, J. (2005). B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *Eur J Immunol* **35**, 1097-1105.
- Rohlich K. Beitrag zur Cytologie der Keimzentren der Lymphknoten. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 1930; **20**:287–297.
- Rose, M.L., Birbeck, M.S., Wallis, V.J., Forrester, J.A., and Davies, A.J. (1980). Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* **284**, 364-366.
- Saez de Guinoa, J., Barrio, L., Mellado, M., and Carrasco, Y.R. (2011). CXCL13/CXCR5 signaling enhances BCR-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics. *Blood* **118**, 1560-1569.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol* **34**, 317-334.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M.G., *et al.* (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462-469.

- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* *192*, 1553-1562.
- Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med* *208*, 1243-1252.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* *5*, 230-242.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* *247*, 52-63.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* *345*, 1058-1062.
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., *et al.* (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* *62*, 234-244.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* *137*, 1142-1162.
- Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., and Cohn, Z.A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* *149*, 1-16.
- Stimpfling, J.H., and Richardson, A. (1965). Recombination within the Histocompatibility Locus of the Mouse. *Genetics* *51*, 831-846.
- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., and Harris, A.W. (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 8661-8665.
- Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* *12*, 136-148.
- Takahashi, Y., Dutta, P.R., Cerasoli, D.M., and Kelsoe, G. (1998). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J Exp Med* *187*, 885-895.
- Talmage, D.W. (1957). Diversity of antibodies. *J Cell Physiol Suppl* *50*, 229-246.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* *13*, 412-426.
- Tangye, S.G., and Tarlinton, D.M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* *39*, 2065-2075.
- Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Dorner, T. (2008). Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* *20*, 162-169.
- Toellner, K.M. (2014). Cognate interactions: extrafollicular IL-4 drives germinal-center reactions, a new role for an old cytokine. *Eur J Immunol* *44*, 1917-1920.

- Turqueti-Neves, A., Otte, M., Prazeres da Costa, O., Hopken, U.E., Lipp, M., Buch, T., and Voehringer, D. (2014). B-cell-intrinsic STAT6 signaling controls germinal center formation. *Eur J Immunol* *44*, 2130-2138.
- van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* *200*, 1221-1230.
- Verbeek, R., van der Mark, K., Wawrousek, E.F., Plomp, A.C., and van Noort, J.M. (2007). Tolerization of an established alphaB-crystallin-reactive T-cell response by intravenous antigen. *Immunology* *121*, 416-426.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592-605.
- Viisanen, T., Ihanola, E.L., Nanto-Salonen, K., Hyoty, H., Nurminen, N., Selvenius, J., Juutilainen, A., Moilanen, L., Pihlajamaki, J., Veijola, R., *et al.* (2017). Circulating CXCR5+PD-1+ICOS+ Follicular T Helper Cells Are Increased Close to the Diagnosis of Type 1 Diabetes in Children With Multiple Autoantibodies. *Diabetes* *66*, 437-447.
- Wang, C.J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E.M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D.M., and Walker, L.S. (2015). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 524-529.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., *et al.* (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med* *212*, 217-233.
- Wu, T., Shin, H.M., Moseman, E.A., Ji, Y., Huang, B., Harly, C., Sen, J.M., Berg, L.J., Gattinoni, L., McGavern, D.B., *et al.* (2015). TCF1 is required for the T follicular helper cell response to viral infection. *Cell reports* *12*, 2099-2110.
- Xie, P., Stunz, L.L., Larison, K.D., Yang, B., and Bishop, G.A. (2007). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity* *27*, 253-267.
- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., *et al.* (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* *496*, 523-527.
- Xu, L., Cao, Y., Xie, Z., Huang, Q., Bai, Q., Yang, X., He, R., Hao, Y., Wang, H., Zhao, T., *et al.* (2015). The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of T(FH) cells during acute viral infection. *Nat Immunol* *16*, 991-999.
- Yager, E.J., Ahmed, M., Lanzer, K., Randall, T.D., Woodland, D.L., and Blackman, M.A. (2008). Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *J Exp Med* *205*, 711-723.
- Yamashiro, H., Hozumi, N., and Nakano, N. (2002). Development of CD25⁺ T cells secreting transforming growth factor-beta1 by altered peptide ligands expressed as self-antigens. *Int Immunol* *14*, 857-865.
- Yi, T., and Cyster, J.G. (2013). EB12-mediated bridging channel positioning supports splenic dendritic cell homeostasis and particulate antigen capture. *eLife* *2*, e00757.
- Yi, T., Li, J., Chen, H., Wu, J., An, J., Xu, Y., Hu, Y., Lowell, C.A., and Cyster, J.G. (2015) Splenic dendritic cells survey red blood cells for missing self-cd47 to trigger adaptive immune responses. *Immunity* *43*, 764-775.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* *402*, 827-832.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* *31*, 457-468.

Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A., and Lennon-Dumenil, A.M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* *13*, 475-486.

Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* *185*, 190-202.

Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* *118*, 6743-6751.

Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., and Toellner, K.M. (2016). Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* *270*, 8-19.

Zhang, Y., Meyer-Hermann, M., George, L.A., Figge, M.T., Khan, M., Goodall, M., Young, S.P., Reynolds, A., Falciani, F., Waisman, A., *et al.* (2013). Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J Exp Med* *210*, 457-464.

Zheng, B., Han, S., and Kelsoe, G. (1996). T helper cells in murine germinal centers are antigenspecific emigrants that downregulate Thy-1. *J Exp Med* *184*, 1083-1091.

Ziegler, S.F., Ramsdell, F., and Alderson, M.R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells* *12*, 456-465.

Zimmermann, C., Rawiel, M., Blaser, C., Kaufmann, M., and Pircher, H. (1996). Homeostatic regulation of CD8+ T cells after antigen challenge in the absence of Fas (CD95). *Eur J Immunol* *26*, 2903-2910.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974a). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* *251*, 547-548.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974b). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701-702.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., *et al.* (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* *207*, 365-378.

12. Weblinks

#1: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/press.html
letztmals abgerufen am 13.04.2019, 13:00 Uhr

Die Informationen der Mouse Genome Informatics (MGI) Datenbank (siehe *Kapitel 7.1 Mäuse*) wurden letztmals am 13.04.2019, 13:00 Uhr abgerufen.