

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

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

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

„Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems als wichtiger  
Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns“

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

von

**Iris Morgenroth**

aus München

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der**

**Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Kaspers
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 20. Juli 2007



Sprach der Rabe: "Nimmermehr!"

Edgar Allan Poe

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Überblick über das Immunsystem des Säugers.....	3
2.1.1	Entwicklung .....	3
2.1.2	Angeborenes Immunsystem .....	3
2.1.3	Erworbene Immunantwort.....	4
2.2	Besonderheiten des Immunsystems des Huhns.....	7
2.2.1	Die B-Zellentwicklung des Huhns .....	8
2.2.1.1	Präbursale und bursale Entwicklung.....	9
2.2.1.2	Postbursale B-Zellentwicklung .....	11
2.2.2	Das Huhn als Modell.....	13
2.3	Die TNF-Familie .....	14
2.3.1	Funktionen.....	15
2.3.2	Strukturelle Charakteristika.....	15
2.3.2.1	Liganden.....	15
2.3.2.2	Ligand-Rezeptor-Komplex .....	16
2.3.2.3	Rezeptoren.....	17
2.3.3	TNF-Familienmitglieder in verschiedenen Spezies .....	18
2.3.3.1	TNF-Familienmitglieder im Huhn .....	18
2.3.4	BAFF-BAFF-R.....	19
2.3.4.1	Struktur.....	19
2.3.4.2	Funktionen.....	20
2.3.4.3	BAFF im Huhn.....	21
2.3.5	CD40-CD40L .....	22
2.3.5.1	Struktur.....	22
2.3.5.1.1	CD40L.....	23
2.3.5.1.2	CD40 .....	24
2.3.5.2	Signaltransduktion.....	25
2.3.5.3	Funktionen im Säuger .....	28
2.3.5.3.1	Rolle des CD40-CD40L-Systems in der Aktivierung von B-Zellen.....	29
2.3.5.3.2	Bildung und Erhaltung von germinalen Zentren.....	31
2.3.5.3.2.1	Proliferation.....	33
2.3.5.3.2.2	Apoptotische und antiapoptotische Wirkung .....	33
2.3.5.3.3	Affinitätsreifung und Klassenwechsel .....	34

---

2.3.5.3.3.1	Somatische Hypermutation .....	35
2.3.5.3.3.2	Klassenwechsel .....	35
2.3.5.4	CD40-CD40L im Huhn .....	36
<b>3</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
4.1	Tiere und Haltung .....	39
4.1.1	Hühner .....	39
4.2	Gewinnung von primären Hühnerlymphozyten .....	39
4.2.1	Material .....	39
4.2.2	Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) .....	40
4.2.3	Gewinnung von Lymphozyten aus Organen .....	40
4.3	Kultivierung von Zellen .....	41
4.3.1	Medien und Zusätze .....	41
4.3.2	Kultivierung von Zellen .....	43
4.3.2.1	Zelllinien .....	43
4.3.2.2	Primäre Zellen .....	43
4.3.2.2.1	Kurzzeitkulturen (bis 72h) .....	43
4.3.2.2.2	Langzeitkulturen .....	43
4.3.2.3	Gewinnung und Kultur von Makrophagen aus Lymphozyten .....	44
4.4	Gewinnung von polyklonalem Antiserum gegen KLH .....	44
4.5	Gewinnung von gereinigtem IgG aus Eidotter .....	45
4.5.1	Material .....	45
4.5.2	Durchführung .....	46
4.6	SDS-PAGE .....	46
4.6.1	Material .....	46
4.6.2	Durchführung .....	48
4.7	Coomassie-Färbung .....	49
4.7.1	Material .....	49
4.7.2	Durchführung .....	49
4.8	ELISA .....	49
4.8.1	Material .....	49
4.8.2	Ch-Immunglobulin-ELISA .....	52
4.8.3	Anti-KLH-ELISA .....	53
4.9	IL-6 Nachweis (7TD1-Assay) .....	53

---

4.9.1	Material .....	53
4.9.2	Durchführung .....	54
4.10	Durchflusszytometrie .....	55
4.10.1	Material .....	55
4.10.2	Einfachfärbung .....	57
4.10.3	Doppelfärbung.....	57
4.10.4	Fixierung .....	57
4.10.5	Zytoplasmatische und Zelloberflächen-Doppelfärbung.....	58
4.11	B-Zellseparation mittels MACS®.....	58
4.11.1	Material .....	58
4.11.2	Durchführung .....	59
4.12	<i>In vitro</i> Funktionstests .....	60
4.12.1	Bestimmung der Überlebensrate .....	60
4.12.1.1	Material .....	60
4.12.1.2	Durchführung .....	60
4.12.2	Bestimmung der Proliferation .....	61
4.12.2.1	Material .....	61
4.12.2.2	Durchführung .....	61
4.12.3	Generierung antigen-spezifischer Antikörper .....	62
4.12.3.1	KLH-immunisierte Hühner .....	62
4.12.3.2	Durchführung .....	62
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
5.1	Expression von CD40.....	63
5.1.1	Expressionsmuster von CD40 für primäre Lymphozyten.....	63
5.1.1.1	B-Zellen.....	63
5.1.1.2	T-Zellen.....	64
5.1.1.3	Myeloide Zellen .....	66
5.1.1.4	Zelllinien .....	67
5.2	Biologische Funktionen.....	68
5.2.1	Überleben .....	69
5.2.1.1	B-Zellen.....	69
5.2.1.2	T-Zellen.....	70
5.3	Proliferation.....	71
5.4	Aktivierung von B-Zellen .....	73

---

5.4.1	Expression von MHCII .....	73
5.4.2	Sekretion von IL-6 .....	75
5.5	Etablierung von Langzeitkulturen .....	76
5.5.1	Optimierung des Zellkulturmediums .....	77
5.5.2	Proliferation.....	78
5.5.3	Phänotypisierung der B-Zellen.....	79
5.5.3.1	Größenzunahme .....	80
5.5.3.2	Oberflächenmarker.....	80
5.5.4	Stimulation der Antikörperproduktion.....	82
5.5.4.1	Generierung eines Standards für den anti-KLH-spezifischen ELISA .....	83
5.5.4.1.1	Gewinnung des polyklonalen Serums gegen KLH .....	83
5.5.4.1.2	Gewinnung von gereinigtem anti-KLH-IgG .....	83
5.5.4.1.3	Einfluss von rChCD40L auf die Antikörperproduktion <i>in vitro</i> .....	84
5.5.4.1.4	Klassenwechsel .....	86
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
6.1	CD40 Expression.....	88
6.1.1	B-Zellen.....	89
6.1.2	T-Zellen.....	89
6.1.3	Myeloide Zellen .....	91
6.2	Biologische Funktionen.....	92
6.2.1	Überleben .....	92
6.2.1.1	B-Zellen.....	92
6.2.1.2	T-Zellen.....	94
6.2.2	Proliferation.....	94
6.2.3	Aktivierung von B-Zellen .....	96
6.2.3.1	Expression von MHCII .....	97
6.2.3.2	Induktion von IL-6 .....	98
6.2.4	Langzeitkulturen.....	99
6.2.4.1	Einfluss des Mediums auf das Überleben von B-Zellen <i>in vitro</i> .....	100
6.2.4.2	Bestimmung der Proliferation in Langzeitkulturen.....	100
6.2.4.3	Phänotypisierung der B-Zellen.....	102
6.2.4.4	Generierung KLH-spezifischer Antikörper.....	103
6.2.4.5	Klassenwechsel .....	105
6.3	Ausblick .....	106

---

<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>110</b>

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Gene der schweren Kette des Menschen.....	6
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Generierung des B-Zellrezeptors .....	6
Abbildung 2.3: Überblick über die Entwicklung der B-Zellen von Maus und Mensch .....	9
Abbildung 2.4: Überblick über die B-Zellentwicklung der GALT-Spezies .....	9
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Genkonversion des Huhns.....	11
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der frühen B-Zellentwicklung des Huhns .....	11
Abbildung 2.7: Überblick über die TNF-Familie.....	14
Abbildung 2.8: Skizze der Signaltransduktion durch CD40.....	27
Abbildung 2.9: Schema der Aktivierung von B- und T-Zellen.....	29
Abbildung 2.10: Schema einer immunologischen Synapse .....	30
Abbildung 2.11: Aufbau eines germinalen Zentrums .....	32
Abbildung 5.1: CD40 Expression auf bursalen und peripheren B-Zellen .....	63
Abbildung 5.2: CD40 <sup>+</sup> T-Zellen in einer CD3-Färbung .....	64
Abbildung 5.3: Frequenz CD40 <sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen.....	65
Abbildung 5.4: Expression von CD40 auf Monozyten und Makrophagen aus Blut und Milz	66
Abbildung 5.5: LPS-induzierte CD40-Expression.....	67
Abbildung 5.6: Expression von CD40 in verschiedenen Zell-linien .....	68
Abbildung 5.7: Erhöhung der Zahl lebender B-Zellen durch rChCD40L .....	70
Abbildung 5.8: Lebende bursale B-Zellen in rChCD40L stimulierten Kulturen.....	70
Abbildung 5.9: Lebende T-Zellen in rChCD40L-stimulierten Milzlymphozytenkulturen.....	71
Abbildung 5.10: Dosisabhängige Proliferation von Lymphozyten durch rChCD40L.....	72
Abbildung 5.11: rChCD40L-induzierte Proliferation in gereinigten B-Zellsuspensionen .....	73
Abbildung 5.12: rChCD40L-induzierte MHCII-Expression von Lymphozyten .....	74
Abbildung 5.13: rChCD40L-induzierte Erhöhung der MHCII-Expression von B-Zellen .....	75
Abbildung 5.14: IL-6-Sekretion in rChCD40L-stimulierten Kulturen .....	76
Abbildung 5.15: Einfluss verschiedener Kulturmedien auf das Überleben von B-Zellen.....	77
Abbildung 5.16: rChCD40L-induzierte B-Zellproliferation in reinen Milz-B-Zellkulturen ...	78
Abbildung 5.17: rChCD40L-induzierte B-Zellproliferation der Zäkaltonsille.....	79
Abbildung 5.18: Zunahme der Zellgröße in Langzeitkulturen .....	80
Abbildung 5.19: Phänotypisierung von Milz-B-Zellen in Langzeitkulturen mit rChCD40L..	81
Abbildung 5.20: KLH-spezifische IgM-Titer in Immun- und Präimmunseren .....	83
Abbildung 5.21: Titrationskurve des gereinigten, KLH-spezifischen Dotter-IgG.....	84
Abbildung 5.22: Induktion KLH-spezifischen Antikörpertiter KLH-immunisierter Hühner..	85
Abbildung 5.23: Frequenz der B-Zellisotypen in Langzeitkulturen .....	86

---

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	43
Tabelle 2: Verwendete Antikörper für den Ch-Immunglobulin-ELISA.....	51
Tabelle 3: Primäre Antikörper für die FACS-Färbungen.....	56
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für die FACS-Färbung.....	56
Tabelle 5: Prozentualer Anteil der CD40 <sup>+</sup> Subpopulationen in T-Zellpopulationen.....	66
Tabelle 6: Phänotypisierung der B-Zellen in Langzeitkulturen.....	81

---

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
AID	„ <i>activation-induced-cytidine-deaminase</i> “
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	„ <i>Activator protein 1</i> “
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAFF	„ <i>B cell activating factor belonging to the TNF-family</i> “
BALT	„ <i>bronchus associated lymphoid tissue</i> “
BCM	B-Zellmedium
BCMA	„ <i>B cell maturation antigen</i> “
BSA	Bovines Serumalbumin
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “, komplementäre DNA
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester
Ch	„ <i>chicken</i> “, Huhn
cIgM	zytoplasmatisches IgM
CRD	„ <i>cystein-rich-domain</i> “, zysteinreiche Domäne
DcR3/5/6	Decoy Rezeptor 3/5/6
DD	„ <i>death domain</i> “
D-Gen	Gen für den „ <i>diversity</i> “-Teil des B-Zellrezeptors
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDA	Ektodysplasin
EDAR	Ektodysplasinrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>enzyme linked immunosorbant assay</i> “
ELISPOT	„ <i>enzyme linked immuno spot assay</i> “
EST	„ <i>expressed sequence tag</i> “
ET	Embryonaltag
FACS	„ <i>fluorescence activated cell sorter</i> “, Durchflusszytometer
Fas-L	Fas-Ligand
FBS	„ <i>fetal bovine serum</i> “, fetales Kälberserum

---

FCA	„ <i>Freund's complete adjuvant</i> “, komplettes Freund'sches Adjuvans
FIA	<i>Freund's incomplete adjuvant</i> “, inkomplettes Freund'sches Adjuvans
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GALT	„ <i>gut associated lymphoid tissue</i> “
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
ICAM	„ <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> “
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig $\alpha$ (CD79 $\alpha$ )	$\alpha$ -Kette des B-Zellrezeptors
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco's Medium
J-Gen	Gen für den „Verbindungsteil des B-Zellrezeptors zum konstanten Teil
JNK	Januskinasen
KLH	„ <i>Keyhole limpet hemocyanin</i> “
LFA-1	„ <i>Lymphocyte Function Associated Antigen-1</i> “
LITAF	„ <i>lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor</i> “
LPS	Lipopolysaccharid
LSL	„ <i>Lohmann's selected Leghorn</i> “
LT- $\alpha$	Lymphotoxin- $\alpha$
MACS	„magnetic -activated cell sorting“, magnetische Zellseparation
MALT	„ <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> “
MAPK	„ <i>mitogen -activated protein kinases</i> “
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHCII	„ <i>major histocompatibility complex II</i> “
M $\emptyset$	Makrophagen
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NF- $\kappa$ B	„ <i><math>\kappa</math>-Immunglobulin enhancer element binding nuclear factor</i> “
NF-AT	„ <i>Nuclear factor of activated T cells</i> “
NK-Zelle	„ <i>natural killer cell</i> “
OPG	Osteoprotegerin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “, Polymerase Ketten Reaktion

---

PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformalehyd
p.h.	„ <i>post hatch</i> “, nach dem Schlupf
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PLAD	„ <i>pre-ligand-association-domain</i> “
PMA	Phorbol-12-myristat -13-acetat
PMS	Phenazin-Methosulfat
POD	Meerrettich - Peroxidase
rChCD40L	rekombinanter Hühner CD40 Ligand
rChIL-6	rekombinantes Hühner Interleukin 6
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sIg	„ <i>surface immunoglobulin</i> “, B-Zellrezeptor
sIgM	„ <i>surface IgM</i> “, membrangebundenes IgM
STAT3	„ <i>signal transducer and activator of transcription</i> “
TACI	„ <i>Transmembran activator and calcium modulator and cyclophilin Ligand interactor</i> “
TBS	„ <i>Tris buffered saline</i> “. trisgepufferte Salzlösung
TD-Ag	„ <i>thymus dependent antigen</i> “, thymusabhängige Antigene
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	„ <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> “
Th-1/Th-2	Th-1/Th-2-Helferzelle
THD	„ <i>TNF-homology-domain</i> “
TI-Ag	„ <i>thymus independent antigen</i> “, thymusunabhängiges Antigen
TIMs	„ <i>TRAF interacting motifs</i> “
TLR	„ <i>Toll-like-receptor</i> “
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TNF-R, TNF-R II	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (II)
TRAIL	„ <i>TNF related apoptosis inducing Ligand</i> “

---

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V-Gen	Gen für den variablen Teil des B-Zellrezeptors
XTT	(2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl) -5-((phenylamino) carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid))
β-ME	β-Mercaptoethanol

# 1 Einleitung

Das Huhn ist ein klassisches Tiermodell in der immunologischen Forschung, das an der Entstehung der modernen Immunologie maßgeblich beteiligt war. Obwohl die Bursa fabricii schon seit 1621 bekannt ist, wo sie in anatomischen Beschreibungen das erste Mal Erwähnung fand, war ihre Funktion bis 1956 unbekannt. Erst als Glick und sein Student durch Zufall versuchten, bursektomierte Hühner zu immunisieren und dabei die damals erstaunliche Beobachtung machten, dass ein Teil der Tiere starb und die überlebenden Tiere keinen Antikörpertiter aufwiesen, wurde die Rolle der Bursa als zentrales Organ der B-Zellentwicklung und der Antikörperproduktion erstmals ersichtlich. Dies war der Grundstein für die heute gültige Unterteilung des adaptiven Immunsystems, die zwischen B-Zellen („*bursa derived cells*“) als antikörpersezernierenden Zellen und T-Zellen („*thymus derived cells*“) als Teil der zellulären Immunantwort unterscheidet, die beide in einem komplexen Zusammenspiel die adäquate Immunantwort auf eine Vielzahl von Antigenen sichern. Für weitere Studien wurde die Maus das Tiermodell der Wahl und das Huhn geriet in Vergessenheit.

Neuere Studien zeigten allerdings, dass etliche der Haussäugetiere hinsichtlich der B-Zellentwicklung dem Huhn näher stehen als der Maus: ihre B-Zellentwicklung läuft ebenso wie im Huhn in darmassoziiertem Lymphgewebe ab, während bei Maus und Mensch die Neubildung von B-Zellen im Knochenmark stattfindet. Solche Bursaäquivalente sind z.B. das Zäkum des Kaninchens oder die ilealen Peyerschen Platten des Schafs. Diese Tatsache führte zu der Bezeichnung „GALT-Spezies“ („*gut-associated-lymphoid tissue*“), zu der neben dem Huhn auch Schafe, Kaninchen, Schweine und Rinder gehören. Bei Hund und Pferd wird ebenfalls eine Zugehörigkeit vermutet. Sogar für den Menschen konnten mittlerweile B-Zellpopulationen nachgewiesen werden, die Charakteristika der GALT-Spezies aufweisen.

Wie bereits angedeutet, stellt die große Variabilität der antigenerkennenden Rezeptoren, welche es ermöglichen, möglichst effektiv auf ein Antigen zu reagieren, eine essentielle Eigenschaft des erworbenen Immunsystems dar. Diese Diversität ist also bereits vor Antigenkontakt vorhanden. Auch hier zeigen sich große Unterschiede in der Entwicklung: sowohl Maus als auch Mensch erreichen diese Variabilität durch das Kombinieren einer Vielzahl von Genen, die für verschiedenen Abschnitte der Rezeptoren kodieren („*gene rearrangement*“). Die GALT-Spezies verfügen nur über wenige solcher Gene, so dass durch

das „*gene rearrangement*“ nur eine geringe Variabilität zustande kommt. Die Diversität wird hier durch spätere Modifikationen der Rezeptoren erzielt.

Ein weiterer Unterschied zwischen den GALT-Spezies und dem Maussystem ist die zeitlich begrenzte B-Zellentwicklung, die sich erheblich von der kontinuierlichen Neubildung von B-Zellen von Maus und Mensch unterscheidet. Während die Maus in der Lage ist, das ganze Leben über B-Zellen nachzubilden, findet die Rekrutierung des B-Zellpools bei den GALT-Spezies nur einmalig statt, da die Bursaäquivalente mit Erreichen der Geschlechtsreife in Apoptose gehen, beziehungsweise zu sekundären lymphatischen Organen werden.

Während im Mausmodell die Regulation der B-Zellentwicklung und Reifung nahezu vollständig geklärt ist, ist bei den GALT-Spezies mit dem Huhn als Modell sehr wenig darüber bekannt. Man nimmt an, dass auch hier Zytokinen eine essentielle Rolle zukommt, allerdings gab es bis vor kurzem kaum Möglichkeiten dies nachzuweisen. Mithilfe von EST-Datenbanken und des 2004 veröffentlichten Hühnergenoms bot sich die Möglichkeit, entsprechende Sequenzen zu suchen und zu exprimieren. So wurde neben IL-6 und BAFF rekombinanter chCD40L generiert, da diesem Zytokin im Mausmodell eine Schlüsselfunktion in der späten B-Zellentwicklung zukommt. Zielsetzung dieser Arbeit ist es, mithilfe von *in vitro* Untersuchungen die Funktion dieses Zytokins für B-Zellen zu klären und damit gleichzeitig Einblick in die B-Zellentwicklung des Huhns zu erhalten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Überblick über das Immunsystem des Säugers

#### 2.1.1 Entwicklung

Nahezu alle Immunzellen des Säugersystems entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und werden zeitlebens kontinuierlich nachgebildet. Dabei entstehen die Zellen des angeborenen Immunsystems hauptsächlich aus der myeloiden Reihe (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten), während die B- und T-Zellen sich aus lymphoiden Vorläufern entwickeln. Im Gegensatz dazu stellen NK-Zellen („*natural-killer-cells*“) wahrscheinlich eine Subpopulation der lymphoiden Zellen dar, die funktionell dem unspezifischen Immunsystem zugerechnet werden. Sehr heterogen ist jedoch die Herkunft der sogenannten dendritischen Zellen, denen eine große Rolle in der Präsentation von Antigen zukommt.

Im Gegensatz zu den Zellen des unspezifischen Immunsystems, welche vom Knochenmark direkt ins Blut abgegeben werden, müssen T- und B-Zellen (Lymphozyten) erst mehrere weitere Reifungsschritte durchlaufen, um letztendlich zu immunkompetenten Zellen zu werden, welche in der Lage sind, Antigen spezifisch über ihren Rezeptor zu erkennen. Diese Reifung findet für T-Zellen im Thymus, für B-Zellen im Knochenmark statt und umfasst Selektionsprozesse, welche einerseits verhindern, dass körpereigene Antigene erkannt werden und andererseits sicherstellen, dass jeder Rezeptor fähig ist, Antigen zu binden. Jede Zelle verfügt dabei über je eine Antigen-spezifität. Der B-Zellrezeptor stellt ein membranständiges Immunglobulin dar, welches nach Aktivierung auch als Antikörper sezerniert wird. Nach der Reifung in den primären lymphatischen Organen wandern die naiven Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten), von denen aus ein Großteil wieder über den Blutstrom rezirkuliert.

#### 2.1.2 Angeborenes Immunsystem

Funktionell lässt sich das Immunsystem in zwei Hauptgruppen einteilen: das angeborene Immunsystem und das sogenannte erworbene Immunsystem, welches auch als adaptives Immunsystem bezeichnet wird.

Das angeborene Immunsystem ist bereits ab dem Tag der Geburt aktiv und stellt einen zuverlässigen und schnellen Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen dar. Dabei reagieren die Komponenten des angeborenen Immunsystems im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem unspezifisch auf Krankheitserreger. Dies kommt durch die Generierung der Rezeptoren zustande: ihre Struktur und damit ihre Fähigkeit, Pathogene zu erkennen, ist genetisch fixiert und wird auch im weiteren Verlauf nicht verändert. Da das Genom aber nicht groß genug ist, um für jedes Pathogen einen spezifischen Rezeptor zu kodieren, erkennen verschiedene Rezeptoren jeweils ganze Pathogenklassen, um der Fülle von Pathogenen zu begegnen. So kann zum Beispiel der TLR („*Toll-like-receptor*“) 4 Lipopolysaccharide binden, jedoch findet keine spezifische Erkennung einzelner Arten von Bakterien statt [1, 2].

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, innerhalb kürzester Zeit auf Pathogene zu reagieren und stellt somit die erste Verteidigung des Organismus dar. Auf zellulärer Ebene werden je nach Pathogen Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten und Mastzellen aktiviert, welche die Pathogene entweder durch Phagozytose (Makrophagen) oder durch Freisetzung chemischer Stoffe (NK-Zellen) bzw. Sauerstoffradikale (Granulozyten) eliminieren. Darüber hinaus sezernieren diese Zellen Botenstoffe, welche weitere Entzündungszellen anlocken (Chemokine, z.B. IL-8 [3]) oder die Aktivität anderer Zellen modulieren (Zytokine [4]). Eine weitere Gruppe von Proteinen, das Komplementsystem, wird ebenfalls über unspezifische Rezeptoren aktiviert und trägt sowohl durch Opsonisierung der Pathogene als auch mit der Bildung von Membranangriffskomplexen auf der Pathogenoberfläche zur Abwehr bei [5]. Zusammen mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade gelingt es dem angeborenen Immunsystem so eine Infektion lokal begrenzt zu halten und oft sogar gänzlich zu eliminieren.

### 2.1.3 Erworbene Immunantwort

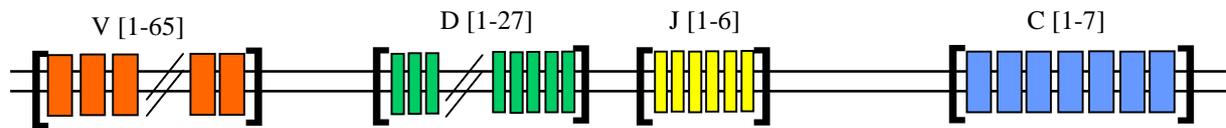
Eng verzahnt mit der angeborenen Immunantwort läuft die erworbene Immunantwort ab. Sie wird auch adaptive Immunantwort genannt, da deren Grundprinzip die antigenspezifische Entwicklung der Effektorzellen, nämlich den B- und T-Zellen, ist. Daher ist dieser Teil der Immunantwort zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht voll ausgebildet, da die Entwicklung der Effektorzellen auf exogenes Antigen angewiesen ist [6].

Die adaptive Immunantwort beginnt, indem dendritische Zellen Pathogene aufnehmen und den sogenannten CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren [7]. Kann ein Pathogen durch den T-

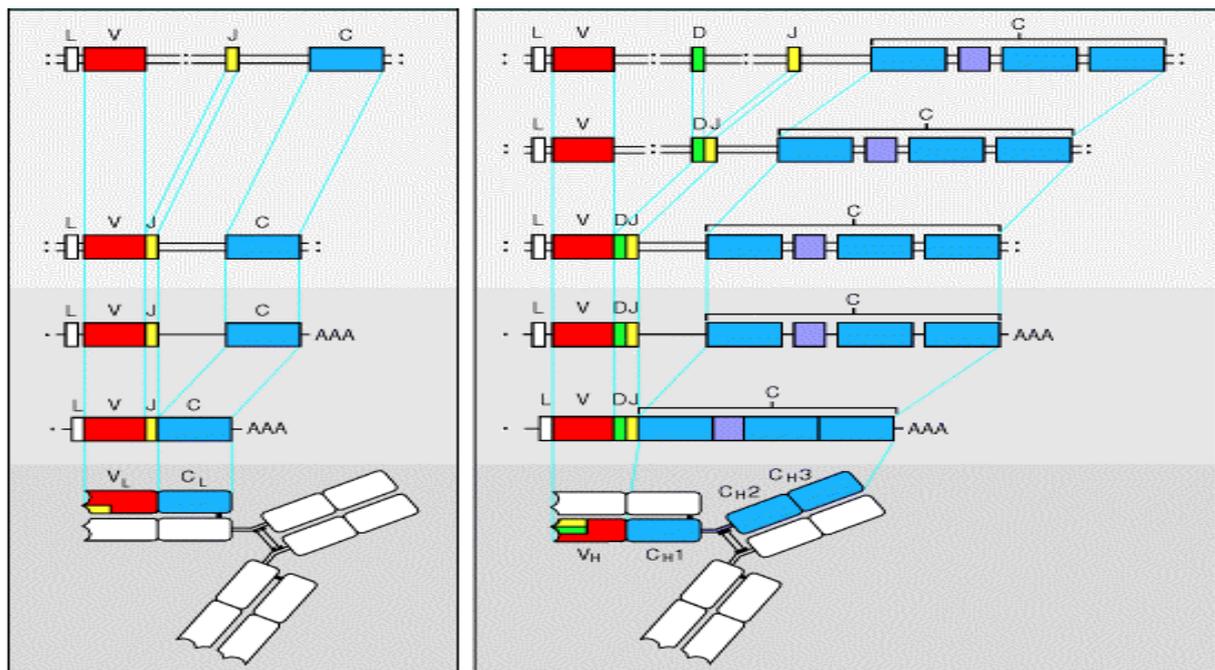
Zellrezeptor spezifisch erkannt werden, wird die  $CD4^+$  T-Zelle aktiviert und kann ihrerseits über kostimulatorische Signale andere Zellen aktivieren. So können vor allem durch CD40L neben Makrophagen [8] auch für das Pathogen spezifische B-Zellen, welche das Antigen wiederum über ihren B-Zellrezeptor erkennen, aktiviert werden [9]. Daraufhin kommt es zu einer klonalen Expansion dieser B-Zellen, welche nach mehreren Selektionsschritten, der sogenannten Affinitätsreifung, zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Darüber hinaus werden auch sogenannte B-Gedächtniszellen gebildet, welche im Gegensatz zu den Plasmazellen lebenslang erhalten bleiben und Ausgangspunkt für eine spezifische Immunantwort nach einer erneuten Infektion mit dem selben Erreger darstellen. Pathogene, welche über die Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen zur B-Zellaktivierung führen, sind sogenannte Thymus-abhängige Pathogene (TD-Ag) [10]. Allerdings gibt es auch eine Gruppe, die direkt über eine spezifische Erkennung durch den B-Zellrezeptor ohne T-Zellhilfe B-Zellen aktivieren kann (TI-Ag) [11]. Die Aktivierung von B-Zellen und damit die Bildung von Antikörpern ist in erster Linie bei bakteriellen Geschehnissen am effektivsten, während virale Infektionen in der Regel durch eine Kombination aus angeborenem und erworbenem Immunsystem bekämpft werden. Dies geschieht einerseits durch die Aktivierung spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen, die in der Lage sind, nach spezifischer Erkennung von Antigenbruchstücken auf der Wirtszelloberfläche durch den T-Zellrezeptor sowohl viral als auch mit intrazellulären Bakterien infizierte Zellen mittels Ausschüttung zytotoxischer Granula zu töten, um so die Verbreitung des Virus beziehungsweise des Bakteriums zu verhindern [12]. Zum Anderen ist die Generierung von neutralisierenden Antikörpern essentiell.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist für das adaptive Immunsystem die Spezifität der Rezeptoren ausschlaggebend. Dabei gibt es für jede Zelle nur eine Antigenpezifität. Um diese große Diversität der Rezeptoren zu erreichen, werden einzelne Abschnitte des Rezeptors separat in mehreren unterschiedlichen Kopien kodiert und während der Reifung in den primären lymphatischen Organen miteinander kombiniert. Im Fall des B-Zellrezeptors und damit auch der Antikörper, da der B-Zellerezeptor ein membranständiges Immunglobulin darstellt, sind dies die V-Gensegmente für den variablen Teil, D-Gensegmente für den sogenannten „*diversity*“-Abschnitt, J-Segmente („*joining-segment*“), welche für den Verbindungsteil kodieren sowie die Gensegmente für den konstanten Teil (C-Gensegmente), die den Isotyp definieren. Durch die genetische Rekombination („*gene rearrangement*“) der einzelnen Genabschnitte wird bereits ein hohes Maß an verschiedenen Spezifitäten erreicht, welche durch die variable Verknüpfung der einzelnen Segmente noch gesteigert wird. Dies gilt jedoch nur für murine und humane B-Zellen, da eine Vielzahl

unserer Haussäugetiere einschließlich dem Huhn eine andere Strategie zur Erzeugung der Rezeptordiversität verfolgen, welche unter 2.2.1.1. näher beschrieben wird.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Gene der schweren Kette des Menschen**  
(aus Janeway: "Immunobiology" [13])



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Generierung des B-Zellrezeptors**

Gezeigt ist das „gene rearrangement“ für die leichte Kette (links) und die schwere Kette (rechts) des Menschen

(aus Janeway: "Immunobiology" [13])

Nach Antigenkontakt in der Peripherie werden im Zuge der bereits erwähnten Affinitätsreifung in den sekundären lymphatischen Organen eine Reihe von Punktmutationen in die V-Gensegmente eingeführt (somatische Hypermutation). Anschließend werden die so entstanden Rezeptoren nach der Affinität zum Antigen selektiert. Ausschließlich B-Zellen mit einem hochaffinen Rezeptor teilen sich im Zuge der Entwicklung weiter (klonale Expansion), während B-Zellen mit einem gering affinen Rezeptor in Apoptose gehen. Weiterhin erfolgt in diesem Reifungsstadium der Klassenwechsel, bei dem durch die Neukombination der variablen Anteile (VDJ) mit verschiedenen C-Gensegmenten neue Antikörperisotypen entstehen. So erfolgt ein Wechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE [14]. Beide Schritte sind neben der spezifischen Erkennung von Antigen abhängig von Zytokinen, in besonderem

Maße von der Interaktion von CD40L mit seinem Rezeptor CD40 (siehe 2.3.5.3.3.). Die klonale Expansion, die somatische Hypermutation und der Klassenwechsel werden auch unter dem Begriff „germinale Zentrumsreaktion“ zusammengefasst, da das sogenannte germinale Zentrum mit seiner speziellen Struktur der Ort dieser Vorgänge ist [15].

Für die T-Zellrezeptorreifung gilt Ähnliches wie für die Generierung des B-Zellrezeptors. Auch hier werden verschiedene Gensegmente miteinander kombiniert, allerdings wird der T-Zellrezeptor nicht durch somatische Hypermutation modifiziert und es erfolgt keine weitere Affinitätsreifung nach Antigenkontakt [16]. Da sich diese Arbeit vorrangig mit der B-Zellentwicklung beschäftigt, soll die T-Zellentwicklung an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden.

## 2.2 Besonderheiten des Immunsystems des Huhns

Das Immunsystem des Huhns weist trotz der großen phylogenetischen Entfernung zwischen der Klasse der Vögel und der Mammalier viele Gemeinsamkeiten mit dem der Säuger auf. Auch beim Huhn lassen sich zum Beispiel die lymphatischen Organe in primäre und sekundäre unterteilen.

Zu den primären lymphatischen Organen des Huhns zählt analog zu den Säugetieren der für die T-Zellentwicklung essentielle Thymus [17, 18] sowie die für Vögel spezifische Bursa Fabricii als Ort der B-Zellentwicklung [19]. Dieses spezielle Organ befindet sich dorsal des Proctodaeums als taschenförmige Ausstülpung und weist beim Huhn ca. 11 Primärfalten auf, die ihrerseits weiter in Sekundärfalten unterteilt werden können [20]. Diese Sekundärfalten enthalten ihrerseits die B-Zell-Follikel, in denen die Expansion der B-Zellen erfolgt.

Als prominentestes Merkmal der sekundären Lymphorgane des Huhns ist das Fehlen von Lymphknoten zu nennen. Allerdings verfügt das Huhn mit dem sogenannten MALT („*mucosa associated lymphoid tissue*“) über eine Reihe sekundärer lymphatischer Aggregate, die in dieser Form nur teilweise im Säuger existieren [21]. Je nach Lokalisation lassen sie sich in das GALT („*gut associated lymphoid tissue*“), zu denen die Oesophageal- und Zäkaltonsillen zählen [22, 23], und das BALT („*bronchus associated lymphoid tissue*“) unterteilen [24]. Dem MALT kommt eine wichtige Rolle im Rahmen der Vakzinierung von Geflügelbeständen zu, da diese oftmals über ein Aerosol (Aviäre infektiöse Bursitis, Aviäre Rhinotracheitis) oder oral (Salmonellen) immunisiert werden. Darüber hinaus wurde mit den am Tränenkanal lokalisierten Haderschen Drüsen ein weiteres lymphatisches Organ

identifiziert [25]. Während das MALT hauptsächlich mit lokal begrenzten Pathogenen interagiert, werden Pathogene im Blutstrom analog zum Säuger auch beim Huhn in der Milz gefiltert und leiten dort die adaptive Immunantwort ein.

Auch die funktionelle Einteilung des Immunsystems des Huhns ist in weiten Teilen vergleichbar mit dem des Säugers und kann in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem unterteilt werden.

Das angeborene Immunsystem ist zum Großteil mit dem der Maus vergleichbar, allerdings unterscheiden sich die aviären neutrophilen Granulozyten nicht nur histochemisch durch die heterophile Färbung der Granula, sondern auch durch deren Inhalt von den vergleichbaren Zellen der Säuger [26, 27]. Einen weiteren Unterschied stellt die Zahl der NK-Zellen dar: diese sind im Vergleich zum Säuger im Huhn unterrepräsentiert [28].

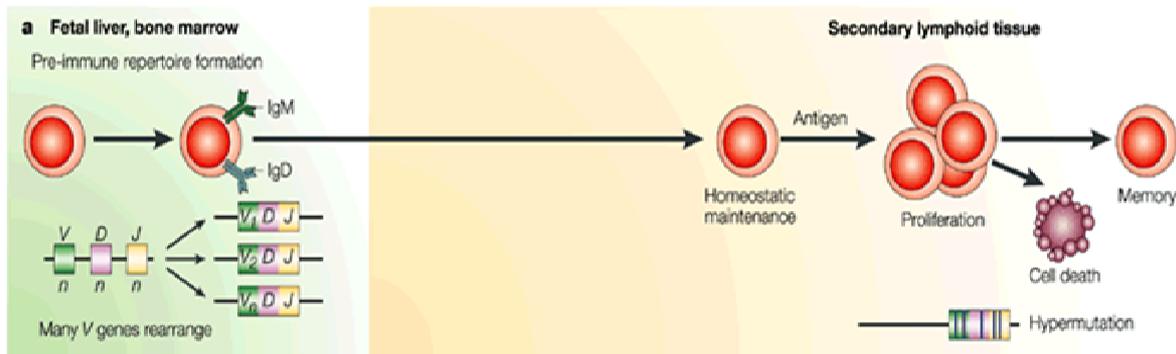
Auch die Unterteilung der Zellen des erworbenen Immunsystems erfolgt analog zum Säuger in T- und B-Zellen [29]. So konnten sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  Zellen identifiziert werden [28, 30]. Weiterhin konnte auch die Unterteilung in Th-1 und Th-2 T-Zellen postuliert werden [31].

Die Entwicklung und Funktion des B-Zellrezeptors beim Huhn unterscheiden sich jedoch in wesentlichen Merkmalen von denen bei Mensch und Maus beschriebenen Mechanismen.

### **2.2.1 Die B-Zellentwicklung des Huhns**

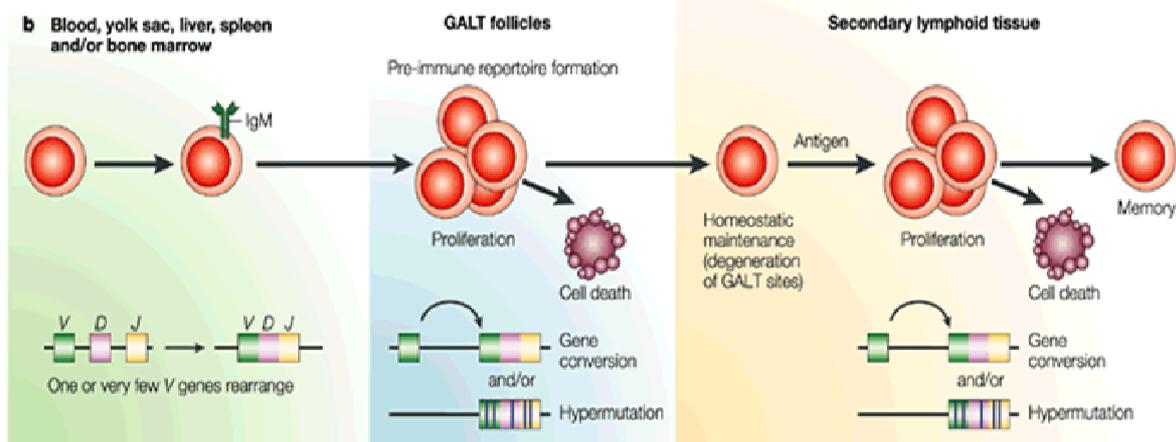
Da die B-Zellentwicklung des Huhns bis auf wenige Ausnahmen in darmassoziiertem Gewebe stattfindet, zählt es zu den so genannten GALT-Spezies, zu denen auch eine Reihe unserer Haussäugetiere wie das Schaf und das Kaninchen gehören. Für das Huhn ist die Bursa das zentrale Organ der B-Zellentwicklung [32, 33]. Hier werden die B-Zell-Vorläufer expandiert und es findet bereits die Generierung der Diversität durch spezielle Mechanismen, die sich grundlegend von denen der Maus unterscheiden, statt. Über die Aufrechterhaltung des peripheren B-Zellpools des Huhns ist bis heute fast nichts bekannt, allerdings werden auch hier, ausgehend vom Mausmodell, verschiedene Regulationsmechanismen vermutet [34], obwohl durch die Involution der Bursa und damit der einmaligen Generierung des B-Zellpools eine völlig andere Situation als im Säugersystem vorliegt. Somit ergeben sich zwei essentielle Unterschiede zwischen dem Maus/Mensch-System und dem Huhn: während bei Maus und Mensch das Knochenmark der Ort der B-Zellentwicklung ist, findet dies für das Huhn in der Bursa statt. Darüber hinaus ist auch der zeitliche Ablauf verschieden, da das

Knochenmark kontinuierlich B-Zellen generiert, wohingegen dies für die GALT-Spezies und somit auch für das Huhn ein zeitlich begrenzter Vorgang ist, der mit Involution des primären lymphatischen Organs endet.



**Abbildung 2.3: Überblick über die Entwicklung der B-Zellen von Maus und Mensch**

(aus Flajnik: „Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents“ [35])



**Abbildung 2.4: Überblick über die B-Zellentwicklung der GALT-Spezies**

(aus Flajnik: „Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents“ [35])

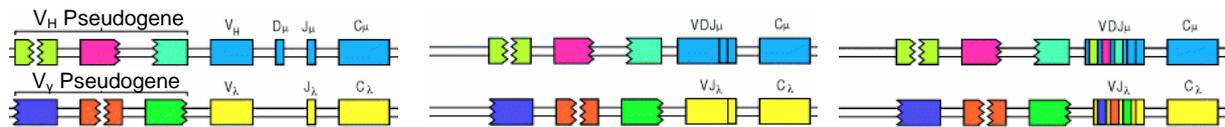
### 2.2.1.1 Präbursale und bursale Entwicklung

Die ersten hämatopoetischen Vorläuferzellen können ab Embryonaltag 5 entlang der Aorta und im Dottersack, später auch in der Region um die Aorta, sowie in Blut und Milz gefunden werden. Interessanterweise findet in einem Teil dieser Zellen bereits vor dem Einwandern in die Bursa das „gene rearrangement“ des D und J Gens statt, was die bis dahin pluripotenten Zellen als B-Zellvorläufer definiert. Ab dem 9. Embryonaltag beginnt dann die Besiedlung der Bursa, dem einzigen Organ der B-Zellentwicklung, durch einige wenige B-Zellvorläufer im Zuge einer einphasigen Immigration in das Bursamesenchym [36, 37]. Der gesamte B-Zellpool wird daraufhin aus diesen wenigen Vorläuferzellen mittels massiver Expansion der

Zellen in den Bursafollikeln generiert [38]. Dabei besiedeln bis zu fünf Zellen je ein Follikel: es kommt also zu einer oligoklonalen Expansion [39]. Gleichzeitig wird das „*gene rearrangement*“ zu VDJ Sequenzen fortgesetzt.

Die Proliferation dieser Zellen ist abhängig von der Ausbildung des B-Zellrezeptors (sIg), welcher letztendlich für die spätere Antigenerkennung zuständig ist, dem aber auch schon während der bursalen Entwicklung wichtige Aufgaben zukommen [32, 40]. So sind die präbursalen Vorläuferzellen noch sIg negativ, erst kurz vor der Einwanderung in die Bursa sind diese Zellen bereits sIg<sup>+</sup>. Die Expression von sIg ist somit bursaunabhängig und die Voraussetzung für die Besiedlung des Organs [41]. B-Zellvorläufer ohne sIg gehen folgerichtig in Apoptose [42]. Demzufolge sind in der Bursa proliferierende Zellen durchweg sIg positiv, es wird also in der Bursa auf sIg-Expression selektiert [43]. Dabei kommt dem B-Zellrezeptor eine wichtige Aufgabe in der Vermittlung von positiven Signalen zu [44]. Diese kommen jedoch nicht durch eine Bindung eines speziellen Liganden zustande, vielmehr beruht die Selektion auf der Expression bestimmter Anteile des B-Zellrezeptorkomplexes. Dies konnte durch Pike und Ratcliffe mittels retroviral transformierten B-Zellvorläufern eindeutig bewiesen werden: so war die alleinige Expression von *Iga* (CD79a) ausreichend, um die Proliferation dieser Zellen zu induzieren [45].

Der B-Zellrezeptor ist allerdings zunächst auf jeder Zelle gleich, da es im Huhn anstatt einer Fülle von verschiedenen Genen, die jeweils für verschiedene Abschnitte des Rezeptors (V, D und J) kodieren, nur je 1 Gen für jeden Abschnitt gibt und somit durch deren Kombination keine Variabilität erreicht wird. Diese kommt beim Huhn durch einen speziellen Mechanismus zustande, welcher während und nach der klonalen Expansion der B-Zellvorläufer stattfindet. Die so genannte „*gene conversion*“ verändert nachträglich die kodierende Sequenz des Rezeptors, indem Teile von „*upstream*“ gelegenen Pseudogenen eingefügt werden [46-48]. Somit verfügen alle naiven B-Zellen, welche die Bursa später verlassen, über einen einzigartigen B-Zellrezeptor. Diese Methode der Diversifizierung ist für die GALT-Spezies und damit auch das Huhn einzigartig und stellt eine vollkommen andere Strategie der Generierung des B-Zellrezeptorrepertoires dar. Innerhalb der GALT-Spezies nimmt das Huhn wiederum eine Sonderstellung ein, da hier ausschließlich die Genkonversion für die Diversifizierung verantwortlich ist, während für andere GALT-Spezies teilweise mehrere V-Gene identifiziert werden konnten, welche zusätzlich ein funktionelles „*gene rearrangement*“ zulassen [49]. Eine zusätzliche Diversifizierung innerhalb der Bursa erfolgt weiterhin durch Einführen von Punktmutationen in den variablen Teil (somatische Hypermutation) [35].

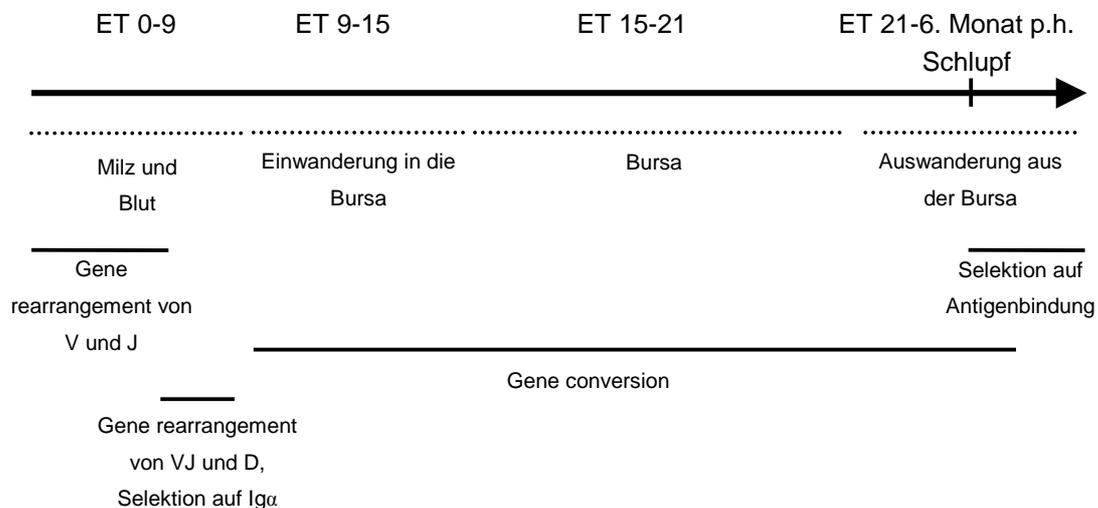


**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Genkonversion des Huhns**

Das linke Bild zeigt die Anordnung der Gene sowie der Pseudogene. In der mittleren Abbildung hat die VDJ-Rekombination bereits stattgefunden, während das rechte Bild die Situation nach erfolgreicher Genkonversion darstellt.

(aus Janeway: "Immunobiology" [13])

Während der postembryonalen Entwicklung nach dem Schlupf ändert sich die Bedeutung des B-Zellrezeptors. Nun spielt nicht nur die erfolgreiche Expression von sIg eine Rolle, sondern auch dessen Funktionalität. Dies bedeutet, dass jetzt positiv auf Antigenbindung selektiert wird [40]. So konnte schon früh gezeigt werden, dass die Bursa auf die externe Antigenaufnahme als wesentlichen Stimulus für die weitere Entwicklung der B-Zellen angewiesen ist: wurde die Aufnahme von exogenem Antigen durch Ligation unterbunden, kam es zu einer Abnahme der B-Zellen [50].



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der frühen B-Zellentwicklung des Huhns**

### 2.2.1.2 Postbursale B-Zellentwicklung

Schon kurz vor dem Schlupf fangen die B-Zellen an, aus der Bursa auszuwandern und über das Blut die peripheren Lymphorgane zu besiedeln. Der Anteil der Zellen, die dabei das

Bursaparenchym verlassen, beträgt jedoch nur 5% aller darin enthaltenen B-Zellvorläufer, da 95% in situ in Apoptose gehen [51]. Innerhalb der emigrierenden Zellen lassen sich im Blut drei Gruppen von B-Zellen unterscheiden: mehr als die Hälfte der B-Zellen setzt sich aus kurzlebigen Zellen zusammen, die innerhalb von 2-3 Tagen absterben und von denen man annimmt, dass sie in der Bursa keinem Antigenkontakt ausgesetzt waren. Die zweite Gruppe stellen B-Zellen dar, deren Lebensspanne mehr als 2 Wochen beträgt und die im Gegensatz zu der erstgenannten Gruppe eine antigenkontaktvermittelte weitere Entwicklung durchgemacht haben. Allerdings finden sich im Blut weiterhin B-Zellen, die zwar ebenfalls kurzlebig sind, aber als Produkte einer bursaunabhängigen Zellentwicklung angesehen werden. So steigt ihr Anteil mit zunehmender Involution der Bursa immer mehr an, bis sie den Großteil der B-Zell-Population im Blut stellen. Eventuell handelt es sich dabei um postbursale Stammzellen, welche an der Aufrechterhaltung des peripheren B-Zellpools beteiligt sind [52].

Die weitere Entwicklung der B-Zellen ist in Gegensatz zur Maus vor allem durch das Fehlen geeigneter Marker verschiedener Entwicklungsstadien kaum verstanden, jedoch sind einige wenige Fakten bekannt.

So kommt es auch beim Huhn nach Antigenkontakt in den sekundären lymphatischen Organen vermehrt zur Ausbildung so genannter germinaler Zentren [53], von denen in der Maus bekannt ist, dass hier die klonale Expansion von antigenspezifischen B-Zellen [54] und deren Weiterentwicklung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen stattfindet [55]. Auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen beim Huhn noch nicht vollständig geklärt sind, ist bekannt, dass auch hier die T-Zellhilfe für die Ausbildung einer adäquaten Immunantwort essentiell ist [56] und das germinale Zentrum analog der Maus der Ort der weiteren B-Zellreifung ist [57]. So konnte auch im Huhn sowohl der Klassenwechsel, der zur Bildung von unterschiedlichen Ig Subklassen, z.B. IgG, notwendig ist [58], als auch eine weitere Modifizierung des B-Zellrezeptors durch Genkonversion und somatische Hypermutation [59, 60] nachgewiesen werden. Allerdings lassen sich auch Unterschiede zwischen Maus/Mensch und dem Huhn feststellen. Während die Zellen des germinalen Zentrums bei Maus und Mensch keine weitere räumliche Abtrennung von den restlichen Zellen des umgebenden Lymphgewebes aufweisen, findet sich im Huhn eine membranöse Ummantelung des germinalen Zentrums [61]. Darüber hinaus ist das Huhn nicht in der Lage, IgE-Antikörper zu bilden.

## 2.2.2 Das Huhn als Modell

Warum ist das Hühnermodell Gegenstand dieser Arbeit?

Einerseits ist das Huhn Modell für die klassische Immunologie, da am Huhn die Dichotomie des erworbenen Immunsystems entdeckt wurde. Durch die strikte räumliche Trennung der Entwicklung von B- und T-Zellen und dem leichten Zugang zu embryonalen Stadien wurde das Huhn zum Modell für die Untersuchung der Entwicklung dieser Zellen. Auch die moderne Immunologie bedient sich mit der Verwendung der Zelllinie DT40 des Hühnermodells, da diese Zelllinie eine bursale B-Zelllinie darstellt. Demzufolge wurden viele Studien zur Reparatur und Modifikation von DNA, der Generierung des B-Zellrezeptors und dessen Signaltransduktion mit DT40-Zellen durchgeführt. Darüber hinaus war es auch möglich, in diesem Modell wertvolle Daten über den Zellzyklus zu sammeln [62]. Somit liefert das Huhn wertvolle Informationen, welche auf Maus und Mensch übertragbar sind.

Andererseits stellt das Huhn im Hinblick auf die B-Zellentwicklung ein geeignetes Modell für viele unserer Haussäugetiere dar. Da bei diesen Tieren ebenfalls darmassoziiertes Lymphgewebe den Ort der B-Zellreifung darstellt, die Antikörperdiversität größtenteils durch Genkonversion erzielt wird und auch hier die B-Zellgenerierung in einem zeitlich begrenzten Rahmen stattfindet, ist das Mausmodell hier nicht anwendbar (lebenslange Generierung von B-Zellen im Knochenmark, „*gene rearrangement*“).

Mitglieder der GALT-Spezies verfügen über sogenannte Bursaäquivalente, dies sind z.B. die Appendices bei Kaninchen [63] sowie die ilealen Peyerschen Platten bei Lämmern, Kälbern [64] und Ferkeln [65]. Für diese Spezies konnte darüber hinaus in weiteren Studien auch die Verwendung von Genkonversion zu Diversifizierung der Antikörperspezifitäten nachgewiesen werden [66-69]. Auch für das Pferd werden diese Mechanismen vermutet, da es ebenfalls nur über eine geringe Anzahl von Genen für die variablen Anteile verfügt und damit die durch „*gene rearrangement*“ entstehende Variabilität als gering einzuschätzen ist [70]. Darüber hinaus werden die ilealen Peyerschen Platten auch für den Hund als Ort der B-Zellreifung in Betracht gezogen [71].

Somit stellt das Huhn ein wertvolles Modell für die adaptive Immunität vieler Nutzierrassen dar, was im Rahmen von Vakzinierungen oder der Erforschung von Wirt-Pathogen-Interaktionen wertvolle Informationen liefern kann.



### 2.3.1 Funktionen

Die generellen Aufgaben der Mitglieder der TNF-Superfamilie sind die Regulation von Apoptose, Proliferation, Überleben und Differenzierung der jeweiligen Zellen [76]. Da ebenso wie das früh entdeckte LT und TNF- $\alpha$  ein Grossteil der Zytokine und Rezeptoren innerhalb der Zellen des Immunsystems exprimiert wird, werden sie zu den essentiellen Faktoren der Entwicklung des Immunsystems gezählt. Zum einen sind sie sowohl an der Generierung der Zellen des Immunsystems als auch der primären und sekundären lymphatischen Organe beteiligt. Zum anderen spielen sie auch im Rahmen der Homöostase und Differenzierung eine Rolle [77]. Die Aufgaben der Mitglieder beschränken sich jedoch nicht nur auf den Aufbau und den Erhalt eines intakten Immunsystems, sondern beinhalten auch dessen dynamische Anpassung. So ist z.B. TNF- $\alpha$  einer der bedeutendsten Faktoren der unspezifischen Entzündungsreaktion [78], während einem anderen Familienmitglied, dem Fas-L/Fas-System, die Aufgabe zukommt, Immunreaktionen durch das Auslösen von Apoptose bestimmter Lymphozyten zu beenden [79]. Die Funktionen der TNF-Familie sind jedoch nicht nur auf das Immunsystem beschränkt, sondern spielen auch eine Rolle im Knochenstoffwechsel [80] und der Ausbildung der Milchdrüse [81] sowie von Schweißdrüsen, primären Haarfollikeln und den Zähnen [82]. Weiterhin konnten TNF-Familienmitglieder in neuen Studien auch innerhalb der Regulation der Angiogenese [83] und der Entwicklung von Nervengewebe identifiziert werden [84].

### 2.3.2 Strukturelle Charakteristika

#### 2.3.2.1 Liganden

Der Familie der TNF-Liganden stehen die TNF-Rezeptoren gegenüber. Beide Gruppen weisen dabei untereinander eine große Ähnlichkeit auf.

Die TNF-Ligand-Familie beinhaltet 19 Typ II Transmembranproteine (d.h. der N-Terminus des Proteins befindet sich intrazellulär), welche eine durchschnittliche Sequenzhomologie von 20-30% aufweisen. Diese wird zum größten Teil durch eine aus 150 Aminosäuren bestehende, konservierte Sequenz mit einem hohen Anteil an aromatischen und hydrophoben Aminosäuren am C-terminalen Ende der Proteine, der sogenannten „*TNF-homology-domain*“

(THD), bedingt, welche für die charakteristische Homotrimer-Struktur der Liganden verantwortlich ist. Die einzelnen Monomere selber bestehen aus je 2  $\beta$ -Faltblättern, welche wiederum aus jeweils 5 antiparallelen  $\beta$ -Strängen bestehen und weisen eine sogenannte „*Jellyroll*“-Konfiguration auf [72]. Trotz ihrer großen Homologie besitzen die einzelnen Liganden jedoch eine sehr unterschiedliche AS-Sequenz im Bereich der externen Oberfläche dieser Trimere, was sie für ihre jeweiligen Rezeptoren spezifisch macht [85]. Darüber hinaus konnte für viele Liganden zusätzlich Schnittstellen für Proteasen identifiziert werden, welche die ursprünglich membranständigen Proteine durch Proteolyse zu löslichen Liganden umwandeln. Dies kann sowohl essentiell für die physiologische Funktion sein, als auch deren Wirkung effektiv abschwächen. So kommt es zum Beispiel bei einer gestörten Bildung von löslichem Ektodysplasine zu schweren Störungen der Morphogenese ektodermaler Strukturen, der sogenannten hyperhidrotischen ektodermalen Dysplasie [86], während im Gegensatz dazu die lösliche Form des Fas-Ligand im Vergleich zu der membrangebundenen Form keinerlei biologische Funktion aufweist und sogar durch die Blockierung der Bindungsstellen des Rezeptors Zellen vor dem Fas-Ligand-induzierten Zelltod schützen kann [87].

Neuere Studien belegen sogar die Fähigkeit der membranständigen Liganden, nach der Bindung durch den Rezeptor reverse Signale an die Zelle zu geben [88]. So lässt sich zum Beispiel durch die Gabe von TNF-R ein kostimulatorisches Signal für T-Zellen generieren, welches über membrangebundenes TNF vermittelt wird [89].

### **2.3.2.2 Ligand-Rezeptor-Komplex**

Die Ligand-Rezeptor-Komplexbildung geschieht grundsätzlich in Form eines asymmetrischen Hexamers, bei dem je ein Ligand-Trimer an ein Rezeptortrimer bindet. Typisches Merkmal für die TNF-Familie ist in diesem Zusammenhang, dass die meisten Rezeptoren in der Lage sind, mehrere Liganden zu binden und vice versa. So bindet beispielsweise nicht nur TNF an den TNF-R1, sondern auch  $LT\alpha$ . Die Bindung selber wird dabei meist durch polare Wechselwirkungen vermittelt, wobei der Rezeptor grundsätzlich über saure Ketten und der Ligand folglich über basische Bindungsanteile verfügt. Zusätzlich bestehen weitere hydrophobe, tyrosinvermittelte Wechselwirkungen [72, 90].

### 2.3.2.3 Rezeptoren

Die Struktur der TNF-Rezeptoren entspricht in den meisten Fällen einem Typ I transmembranen Protein (mit dem C-terminalen Ende intrazellulär), allerdings kommen auch Typ III Transmembranproteine (z.B. BCMA oder TACI [91]) sowie lösliche Rezeptoren (z.B. OPG [92]) vor. Zusätzlich können auch primär membranständige Rezeptoren analog zu den Liganden durch Proteolyse oder alternatives „*Splicing*“ zu löslichen Rezeptoren werden und so die Funktion der Liganden z.B. als Decoy-Rezeptor, beeinflussen [93]. Allen Rezeptoren gemein sind die so genannten „*cystein-rich-domains*“ (CRD) der extrazellulären Anteile: sie bestehen aus ca. 40 AS langen „*Pseudorepeats*“, die jeweils sechs hochkonservierte Cysteine enthalten, welche in der Lage sind, je drei Disulfidbrücken auszubilden und so letztlich für die typische Struktur der Rezeptoren und damit für deren Fähigkeit zur Ligandbindung verantwortlich sind [94, 95]. Ebenso wie die Liganden liegen auch einige Rezeptoren schon vor der Komplexbildung mit ihrem Liganden als Trimer vor, verantwortlich dafür ist die N-terminal gelegene „*pre-ligand-association-domain*“ (PLAD) [96].

Ausgehend von den an der Signaltransduktion beteiligten intrazellulären Sequenzen lassen sich die TNF-Rezeptoren in drei verschiedene Gruppen einteilen: einer 7 Rezeptoren umfassenden Untergruppe eigen ist die sogenannte „*death domain*“ (DD), welche über weitere Signalkaskaden letztlich Caspase-3 aktiviert und damit zur Apoptose der Zelle führt [97]. Die zweite Gruppe wird durch „*TRAF interacting motifs*“ (TIMs) gekennzeichnet, welche zur Rekrutierung von TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren, den sog. TRAFs führen. Dies hat unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Folge, welcher generell die Transkription einer Reihe von antiapoptotischen Faktoren induziert. Bislang konnten sechs verschiedene TRAF's gefunden werden [98], welche ebenfalls die der TNF-Familie eigene Trimer-Struktur aufweisen [99]. Die dritte Rezeptorengruppe besitzt im Gegensatz zu den vorherigen Gruppen intrazellulär keinerlei Domänen zur Signaltransduktion. Ihre Vertreter agieren daher als Decoyrezeptoren [100, 101].

Auch wenn bis jetzt vieles über die Signaltransduktionswege der TNF-Familie bekannt ist, so bleibt das Zustandekommen vieler Effekte ungeklärt, was nicht zuletzt durch eine Vielzahl an Regulationsmechanismen innerhalb der Superfamilie, angefangen von Decoyrezeptoren bis hin zu Modulationen durch reaktive Sauerstoffmetaboliten [102, 103], zu erklären ist. Zusätzlich verstärkt die Fähigkeit des „*reverse signaling*“ der Liganden die Komplexität der durch die Ligand-Rezeptor-Bindung induzierten Effekte [88].

### 2.3.3 TNF-Familienmitglieder in verschiedenen Spezies

Aufgrund der Vielzahl von essentiellen Aufgaben der TNF-Familie spielen ihre Mitglieder eine entscheidende Rolle im Organismus. Kommt es zu Funktionsverlusten, resultieren daraus nicht selten letale Krankheitsbilder. Darüber hinaus gibt die ausgeprägte Homologie zwischen den verschiedenen Spezies Grund zu der Annahme, dass auch eine Vielzahl der Funktionen konserviert ist. Um weitere Informationen über die Organisation, die Entstehung und die Funktionen des TNF-Systems zu erlangen, wurde versucht, TNF-Homologe durch Nutzung bestehender EST-Datenbanken in verschiedenen anderen Spezies zu identifizieren und zu charakterisieren.

So konnten z.B. bereits im Genom von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* TRAF-ähnliche Moleküle gefunden werden [104, 105]. Zusätzlich konnte auch ein TNF-Homolog, EIGER, in *D. melanogaster* identifiziert werden [105]. Darüber hinaus wurden TNF-Analoga auch in einer Reihe von Fischarten gefunden [106-108] welche ähnlich dem Huhn ein Bindeglied zwischen dem Säugetiersystem und phylogenetisch älteren Tierklassen darstellt.

Innerhalb der Säugetiere sind neben TNF- $\alpha$ -Homologen wie bei Schwein [109] und Delphin [110] auch verschiedene andere Familienmitglieder beim Rind, so z.B. Fas oder CD40 bekannt [111, 112].

#### 2.3.3.1 TNF-Familienmitglieder im Huhn

Das Huhn stellt das wichtigste Modell für die Entwicklung des Immunsystems der GALT-Spezies dar und bildet ein essentielles Bindeglied in der Phylogenese der Säugetiere. Seit der Sequenzierung des Hühnergenoms steht der vergleichenden Analyse der TNF-Familie eine völlig neue Möglichkeit zur Verfügung und so ist es von besonderem Interesse, ob und welche Mitglieder der TNF-Familie in diesem Genom gefunden werden können und welche Aufgaben sie im Huhn erfüllen. Bisher konnten Homologe für DcR3, Osteoprotegerin [113], DcR5 [114], DcR6 [115], LITAF („*lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor*“) [116], TNFR-II, TRAF5 [117], TNFR-I, Fas [118], EDA, EDAR [119], CD30L, TRAIL [120], BAFF [121], CD40 und CD40L [122, 123] identifiziert werden. Die hohe Anzahl an identifizierten TNF-Familienmitgliedern zeigt deutlich, wie hochkonserviert diese Familie auch in phylogenetisch weit auseinander liegenden Spezies ist und legt zudem die Vermutung

nahe, dass die Funktionen einzelner Familienmitglieder speziell auch in dieser Spezies konserviert sind.

Von besonderer Bedeutung ist, dass bisher keine Homologe für TNF und LT $\alpha$  gefunden wurden. Dies ist auch wenig erstaunlich, da beide Zytokine essentiell für die Bildung von Lymphknoten sind und das Huhn nicht über diese lymphatischen Organe verfügt.

Im Hinblick auf die Entwicklung des Immunsystems und speziell der B-Zellen nehmen BAFF und das CD40-CD40L-System im Mausmodell Schlüsselstellen ein. Für das Huhn konnte bislang nur die Funktion von BAFF charakterisiert werden, dem analog dem Säugermodell eine essentielle Rolle in der B-Zellentwicklung zukommt, die im Gegensatz zum Säuger auch die Entwicklung immaturer, bursale B-Zellen miteinschließt.

### **2.3.4 BAFF-BAFF-R**

#### **2.3.4.1 Struktur**

BAFF, auch BLyS, THANK, TALL-1 oder TNFSF13 genannt, ist ein noch junges Mitglied der TNF-Familie, welches eine zentrale Rolle innerhalb der B-Zellreifung einnimmt und hauptsächlich auf myeloiden Zellen (vor allem Makrophagen und folliculäre dendritische Zellen) zu finden ist [124].

Strukturell gesehen stellt es wie alle Liganden der TNF-Familie ein Typ II Transmembranprotein dar, das neben der obligatorischen THD auch eine Furinschnittstelle besitzt und daher sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorkommt [125]. Neben der bekannten Trimer-Struktur sind durch neuere Studien sowohl eine biologisch aktive 60-mer-Struktur [126, 127] als auch eine Splicing-Variante ( $\Delta$ BAFF) bekannt, die als dominant negativer Inhibitor fungiert [128].

BAFF kann an drei verschiedene Rezeptoren, nämlich an BCMA, TACI und den BAFF-Rezeptor binden, wobei die Affinität gegenüber BCMA im Vergleich zu TACI und dem BAFF-R wesentlich geringer ist. Obwohl demnach drei mögliche Rezeptoren existieren, werden die für BAFF wesentlichen Funktionen fast ausschließlich über den BAFF-Rezeptor vermittelt, welcher auch die größte Affinität zu BAFF aufweist [91].

### 2.3.4.2 Funktionen

Die Hauptaufgabe des BAFF-BAFF-R-Systems ist in erster Linie die Generierung und Erhaltung des physiologischen B-Zellpools. Darüber hinaus spielt dieses System im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle.

Die Hauptfunktion von BAFF wurde nachhaltig durch BAFF und BAFF-R Knockout-Mäuse geklärt: beide Modelle zeigten eine erhebliche Reduzierung des muren B-Zellpools [129, 130]. Somit kommt BAFF zunächst eine essentielle Rolle in der Entwicklung der B-Zellen zu, welche allerdings auf bestimmte Stadien der B-Zellreifung beschränkt ist, da zwar die Zahl der muren B-Zellen in BAFF<sup>-/-</sup> bzw. BAFF-R<sup>-/-</sup> Mäusen um ca. 90% reduziert ist, jedoch die Zahl immaturer B-Zellen und früher B-Zell-Reifungsstadien im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert ist [131]. Untermuert wird diese Tatsache durch das Expressionsmuster der BAFF-Rezeptoren, die sich dementsprechend nicht während früher Entwicklungsstadien nachweisen lassen [132]. Im Gegensatz zum Fehlen des BAFF-Signals führt eine gesteigerte Expression zu einer deutlichen Zunahme des peripheren B-Zellpools, was deutlich zeigt, dass die physiologische Expression von BAFF streng limitiert ist. Weiterhin lassen diese Überexpressionsmodelle Kennzeichen von Autoimmunerkrankungen erkennen. Demnach kommt BAFF einerseits eine wesentliche Rolle in der Elimination autoraktiver B-Zellen während der Entwicklung [133-135], andererseits auch in der Erhaltung des reifen, naiven B-Zellpools zu [133, 135, 136].

Zusätzlich erfüllt BAFF für reife B-Zellen die Funktion eines Wachstumsfaktors, da vor kurzem ein verstärkter Metabolismus in *in vitro* Kulturen auf BAFF-Stimulation hin nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus waren diese Zellen in der Lage, schneller und effizienter auf Antigenstimulation zu reagieren [137].

Ausgehend von den Effekten auf die B-Zellen kommt BAFF auch in der T-Zellabhängigen Immunantwort eine wichtige Funktion zu. So konnte anhand von BAFF bzw. BAFF-R-Knockout Mäusen gezeigt werden, dass die Generierung von germinalen Zentren zwar BAFF unabhängig ist, deren Erhalt jedoch ohne BAFF nicht möglich ist. Demzufolge ist auch die Produktion spezifischer IgM und IgG Antikörper in diesen Modellen signifikant niedriger als in normalen Tieren, wohingegen der IgA Titer unbeeinflusst bleibt und somit unabhängig von BAFF ist. Verantwortlich für diese Effekte scheinen weniger direkte Auswirkungen auf die Bildung germinaler Zentren als vielmehr das generelle Fehlen murer, naiver B-Zellen zusammen mit gesteigerter Apoptose und einer verminderten Fähigkeit der Antigenpräsentation follikulär dendritischer Zellen zu sein [138-140]. Auch im Rahmen der

Immunantwort auf TI-Ag nimmt BAFF eine wichtige Rolle ein, indem es hier einen auf bestimmte Isotypen beschränkten Klassenwechsel vermittelt [141].

### 2.3.4.3 BAFF im Huhn

Eines der in Huhn bekannten TNF-Familienmitglieder ist chBAFF, welches in EST-Datenbanken identifiziert werden konnte und zudem auch funktionell erforscht worden ist.

ChBAFF wurde als ein 271 Aminosäuren umfassendes Protein charakterisiert, welches sowohl die Transmembrandomäne als auch die im Säugersystem bekannte Schnittstelle für Furin-Proteasen aufweist. Somit lässt sich analog zum Säugersystem eine membrangebundene und eine lösliche Form des Zytokins im Huhn finden. Zudem konnte mit 76% eine erstaunlich hohe Aminosäuresequenzhomologie zwischen den löslichen Anteilen von humanem BAFF und chBAFF festgestellt werden [121].

Analog zum Säugersystem konnte der BAFF-R mittels *in situ*-Hybridisierung und FACS-Doppelfärbungen ausschließlich auf B-Zellen gefunden werden. Zusätzlich war es möglich, chBAFF mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung auch in der Bursa nachzuweisen [142].

Auch hinsichtlich der biologischen Funktion lassen sich Gemeinsamkeiten erkennen: so ist chBAFF ein potenter Faktor für das Überleben von B-Zellen, was sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch gesteigerte B-Zellfrequenzen nachweisen lässt. *In vitro* konnte auch im Huhn Proliferation als Ursache für diesen Effekt ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zeigte der funktionelle Knockdown eine dramatischen Abnahme der B-Zellen, was auch für das Huhn eine bedeutend Rolle von BAFF innerhalb der Zellentwicklung zeigt.

Darüber hinaus besitzt chBAFF für das Huhn einzigartige Funktionen, die vor allem die frühe B-Zellentwicklung betreffen. Im Gegensatz zu vergleichbaren frühen B-Zellstadien der Säuger lassen sich schon auf bursalen B-Zellen an ED18 BAFF-Rezeptoren nachweisen, deren Expression bis hin zum Schlupf und darüber hinaus stetig zunimmt. Auch das Zytokin selber lässt sich in der Bursa bereits um den 12 Embryonaltag nachweisen, was letztlich eine essentielle Rolle des BAFF-Systems auch innerhalb der frühen B-Zellentwicklung nahe legt. Eine von BAFF unabhängige Regulation kann ausgeschlossen werden, da die Bursa im funktionellem BAFF-Knockdown signifikant gewichtsreduziert ist. Darüber hinaus weisen bursale B-Zellen in *in vitro* Kulturen ohne BAFF-Supplementation eine wesentlich geringere Überlebensrate auf als BAFF-stimulierte B-Zellkulturen.

Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen dem Maus- und dem Hühnersystem besteht in der Herkunft von BAFF. Während im Säugersystem hauptsächlich myeloide Zellen BAFF

produzieren, konnte die Produktion des Zytokins im Huhn eindeutig den B-Zellen zugeschrieben werden. Ob dies auch in weiteren GALT-Spezies der Fall ist, wird weiter zu untersuchen sein.

Somit konnte für das BAFF-BAFF-R-System im Huhn eine weitgehende Übereinstimmung zum Säugersystem gezeigt werden, allerdings wurden auch für das Huhn spezifische Funktionen herausgearbeitet, die weitere Arbeit erfordern [121, 143].

### **2.3.5 CD40-CD40L**

Die Entdeckung des CD40-CD40L-Systems fand im Zusammenhang mit der Erforschung des sogenannten „*X-linked hyper IgM syndrome*“ statt, bei dem die Patienten durch einen erhöhten IgM-Titer bei gleichzeitigem Fehlen von IgG und germinalen Zentren auffielen. Durch weitere Forschung konnte ein Gendefekt im CD40L-Gen als Ursache der gestörten B-Zellreifung verantwortlich gemacht werden und führte so erstmals zur Beschreibung der essentiellen Rolle des CD40-CD40L-Systems für die B-Zellentwicklung [144, 145].

Im Gegensatz zu dem BAFF-BAFF-R-System sind die Funktionen für das CD40-CD40L-System allerdings nicht auf bestimmte Bereiche der Immunologie zu begrenzen, da es an verschiedensten inflammatorischen Funktionen, angefangen von der Aktivierung von B-Zellen bis hin zur Blutgerinnung, beteiligt ist. Diese Vielfalt spiegelt sich auch in der Verteilung des Rezeptors und des Liganden auf verschiedensten Zelltypen wieder.

Innerhalb des Säugersystems liegt folglich der Focus der Forschung heute weniger in den Bereichen der klassischen Immunologie, sondern vielmehr in der Erforschung des CD40-CD40L-Systems als Ziel möglicher Therapien chronischer, entzündlicher Erkrankungen sowie in der Krebsforschung und der Transplantationsmedizin. Im Hinblick auf das Immunsystem des Huhns steht die Forschung noch am Anfang und konzentriert sich daher zunächst auf die Funktionen des Systems innerhalb der B-Zellentwicklung.

#### **2.3.5.1 Struktur**

Als Mitglieder der TNF-Familie weisen sowohl CD40 als auch CD40L die typische Trimerstruktur auf. Bemerkenswert jedoch ist die Tatsache, dass die Bindung zwischen CD40L und seinem Rezeptor streng spezifisch ist und somit eine Ausnahme innerhalb der TNF-Familie darstellt.

### 2.3.5.1.1 CD40L

Der CD40L ist hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert, auf denen der Ligand auch erstmals entdeckt wurde. Dabei ist die Expression fast ausschließlich auf CD4<sup>+</sup> Zellen (Th1 als auch Th2) beschränkt, jedoch konnte auch eine kleine Subpopulation von CD8<sup>+</sup> Zellen als CD40L<sup>+</sup> identifiziert werden. Wichtigster Aktivator ist in diesem Zusammenhang der Kontakt mit MHCII-präsentiertem Antigen, was schon deutlich auf die biologische Funktion als essentieller Faktor in der Initiierung der adaptiven Immunantwort hinweist [146, 147]. T-Zellen sind in der Lage CD40L 5 Minuten nach Stimulation auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren [148]. Die maximale Expression wird nach ca. 6 Stunden erreicht, danach nimmt die Anzahl der CD40L-Moleküle wieder ab. Allerdings kann die CD40L-Expression durch anhaltende CD40-Ligation über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden [149]. Dies gilt nicht nur für die membranassoziierte Form sondern auch für die Produktion der löslichen Form [150]. Die Expression von CD40L erfolgt zusammen mit weiteren kostimulatorischen Zytokinen gezielt an der Interaktionsstelle mit antigenpräsentierenden Zellen und trägt somit zur Ausbildung immunologischer Synapsen bei [151].

Eine negative Regulation der CD40L Expression kann durch IFN- $\gamma$  und hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$  erfolgen [146, 152, 153].

Neuere Studien konnten auch in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen hohe Mengen an CD40L mRNA feststellen, was zusätzlich eine Funktion in der B-Zell-Homöostase durch eine möglicherweise konstitutive Expression nicht ausschließt [154].

CD4<sup>+</sup> T-Zellen bilden demnach die Hauptquelle für CD40L, allerdings konnte CD40L darüber hinaus auch auf Eosinophilen [155] und Basophilen Granulozyten sowie auf Mastzellen [156] und Thrombozyten [157] in jeweils aktiviertem Zustand nachgewiesen werden. Auch B-Zellen [158, 159] können CD40L exprimieren und damit zur T-Zell-abhängigen Immunantwort beitragen [160]. Zusätzlich scheinen NK-Zellen [161], dendritische Zellen [162], Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen [163] ebenfalls in der Lage zu sein, in bestimmten Aktivierungszuständen CD40L zu exprimieren. Meist handelt es sich dabei um chronische Entzündungsprozesse beziehungsweise um Autoimmunerkrankungen, seltener spielen immunregulatorische Funktionen dabei eine Rolle. Das codierende Gen für CD40L liegt sowohl bei der Maus als auch beim Mensch auf dem X-Chromosom und weist 80% Homologie zwischen den Spezies auf [164, 165]. Es besteht aus 5 Exons [166], welche für ein 39kDa Transmembran II Protein kodieren. Es existieren allerdings wie bereits beschrieben auch verschiedene lösliche Formen, von denen

ausschließlich die 18kDA-Form, welcher der für die TNF-Familie typische cysteinreiche zytoplasmatische Anteil sowie die Transmembrandomäne und Teile der extrazellulären Domäne des Vollängenproteins fehlen, biologisch aktiv ist [167]. Die Schnittstelle konnte jedoch im Gegensatz zu anderen TNF-Mitgliedern noch nicht genau identifiziert werden [159, 168].

Strukturell weist das CD40L-Molekül generell sowohl die typische  $\beta$ -Faltblatt „*Jellyroll*“-Struktur als auch die TNF-typische Homotrimer-Struktur auf. Abgesehen davon verfügt jedoch sowohl die extrazelluläre Domäne als auch die Rezeptorbindungsdomäne über keinerlei Ähnlichkeit mit der TNF-Familie [169].

Die Bindung an den Rezeptor lässt sich ebenfalls grundsätzlich mit der Komplexbildung der TNF-Familie vergleichen: auch sie wird hauptsächlich durch polare Wechselwirkungen stabilisiert, jedoch ist die Verteilung im CD40-CD40L-Komplex dahingehend verändert, als dass CD40L basische und CD40 saure Ketten aufweist und somit die Ladungsverteilung genau umgekehrt ist. Zusätzlich wird die polare Rezeptor-Komplex-Bindung von hydrophoben Domänen umgeben [170].

#### 2.3.5.1.2 CD40

Das Gen für CD40 ist bei verschiedenen Spezies auf verschiedenen Chromosomen zu finden. Es codiert ein 277 Aminosäuren umfassendes ca. 50kD großes, membrangebundenes Protein (Typ I Membranprotein), welches mit seinen vier jeweils 6 Cysteine umfassenden Subdomänen zumindest für den extrazellulären Abschnitt einen typischen Vertreter der TNF-Rezeptor-Superfamilie darstellt [171]. Im Gegensatz dazu weisen die zytoplasmatischen Anteile jedoch kaum TNF-familiärentypische Charakteristika auf, allerdings konnten für die Signaltransduktion zwei unterschiedliche TRAF-Bindungsstellen identifiziert werden [171], deren genaue Struktur bislang ungeklärt ist. Direkte Bindungsstellen für Kinasen konnten nicht identifiziert werden.

Auf der Zelloberfläche kommt CD40 als Monomer oder als Dimer vor [172], wobei diese Formen jedoch nicht in der Lage sind, alle Effekte zu vermitteln. Vielmehr führt deren Ligation durch CD40L-Trimere zu einer Anreicherung und Multimerisierung von CD40-Monomeren in sogenannten „*Lipid rafts*“, welche sich durch ihren hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden von der restlichen Zellmembran unterscheiden und als Plattformen für Signaltransduktionsprozesse dienen [173, 174]. Je nach Multimerisierungsgrad konnten verschiedene Funktionen des Rezeptors nachgewiesen

werden. So führt die Bindung von Monomeren lediglich zu einer Adhäsion von B-Zellen, während Dimere zusätzlich die Expression von CD86, einem potenten Kostimulator für T-Zellen, vermitteln [175].

Obwohl CD40 meist konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert wird, lässt sich die CD40-Expression auch durch verschiedene Zytokine wie z.B. IL-4 oder gegen IgM gerichtete Antikörper zusätzlich induzieren. Im Vergleich zu einer bis zu 6 h anhaltenden Expressionssteigerung von CD40L kann eine erhöhte CD40-Expression bis zu 72 h nach Ende des Stimulus beobachtet werden [176, 177].

CD40 ist hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert, welche den Rezeptor nahezu zu jedem Zeitpunkt ihrer Entwicklung beginnend mit embryonalen B-Zellen bis hin zu reifen Plasmazellen auf der Zelloberfläche tragen [178, 179]. Interessanterweise können B-Zellen nicht nur die membrangebundene Form sondern auch lösliches CD40 bilden, welches sowohl CD40L auf T-Zellen bindet und deren CD40L-Produktion hemmt, als auch löslichen CD40L neutralisiert. Somit ergibt sich eine effektive Regulation der CD40L-Stimulation durch B-Zellen [180].

Neben den B-Zellen lässt sich CD40 auch auf kleinen T-Zellsubpopulationen finden, wo er eine noch nicht eingehend untersuchte Rolle in der T-Zell-Aktivierung inne hat [181, 182].

Im Gegensatz dazu ist die Funktion von CD40 auf Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen genauer erforscht. Hier spielt CD40 sowohl in der Zellentwicklung als auch innerhalb der Immunantwort, hier speziell in der T-Zell-Aktivierung durch diese Zellen, eine große Rolle [183, 184]. Darüber hinaus konnte auch auf Basophilen und Eosinophilen ein funktioneller CD40-Rezeptor nachgewiesen werden [185, 186].

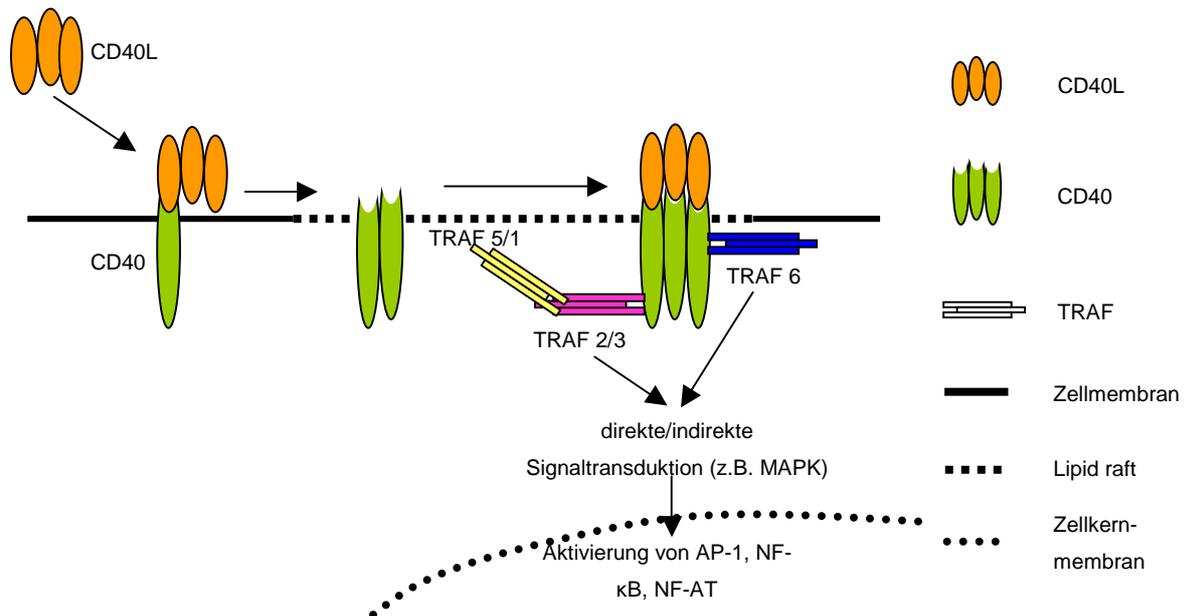
Neben den Zellen des Immunsystems verfügt auch eine Reihe anderer Zelltypen wie Endothel- und Epithelzellen oder Fibroblasten über CD40. Hier ist der Rezeptor vor allem nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen zu finden [187] und spielt somit eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen.

### **2.3.5.2 Signaltransduktion**

Die Signaltransduktion von CD40 ist sehr komplex und hängt neben der jeweiligen Zellart auch von deren Aktivierungszustand sowie der Differenzierung ab [188]. Darüber hinaus sind die vermittelten Effekte nicht nur von der unter 2.5.1. beschriebenen Qualität der Interaktionspartner, sondern zusätzlich auch von der Quantität der Bindungen abhängig. So hat die Anzahl der gebundenen CD40L-Moleküle z.B. direkten Einfluss auf die

Antikörperproduktion oder die Differenzierung von B-Zellen [189]. Im Folgenden soll daher die Signaltransduktion nur skizziert werden.

Wie schon unter 2.5.1. beschrieben, ist es für eine maximale Signaltransduktion notwendig, dass sowohl CD40 als auch CD40L als Trimere vorliegen [190]. Das Signal wird nahezu ausschließlich durch die für die TNF-Familie spezifischen Adapterproteine, die TRAFs, vermittelt. Da jedoch eine vollständige Unterbindung der Signaltransduktion durch Blockierung der TRAF-Bindungsstellen nicht möglich ist, kann eine direkte Aktivierung von Phosphatasen und Kinasen nicht ausgeschlossen werden [191]. Ebenso wie Rezeptor und Ligand müssen auch die TRAFs in einer Trimer-Struktur vorliegen, um die maximale Affinität zu ihren Bindungsstellen am zytoplasmatischen Teil des CD40-Moleküls zu erlangen [192]. Ähnlich wie bei CD40 erfolgt auch eine Rekrutierung der TRAFs in „*Lipid rafts*“, wo sie zusammen mit CD40 einen potenten Signaltransduktionskomplex bilden [193]. An CD40 binden drei verschiedene TRAFs: TRAF2, TRAF3 und TRAF6. TRAF2 und TRAF3 verfügen dabei über überlappende, jedoch nicht identische Bindungsstellen. Die Signaltransduktion durch TRAF2 und 3 ist allerdings nicht durch kompetitive Mechanismen beeinflusst, da beide Proteine nicht um die Bindungsstelle konkurrieren und neuere Studien eine zusätzliche Bindungsstelle für TRAF2 zeigen konnten [194]. Auch TRAF6 bindet direkt über eine eigene Bindungsstelle während für TRAF5 kontroverse Publikationen existieren. Es wird jedoch angenommen, dass es über TRAF3 an CD40 bindet [195], ebenso ist TRAF1 über TRAF2 an den Rezeptorkomplex assoziiert. Über diese Adapterproteine werden dann durch die Aktivierung weiterer Signaltransduktionswege wie z.B. die Januskinasen (JNK) und mitogenaktivierte Proteinkinase („*Mitogen-activated protein kinases*“, MAPK), verschiedene Transkriptionsfaktoren (NF-AT, AP-1, NF- $\kappa$ B) induziert [196, 197]. Dabei kommen den einzelnen TRAFs jeweils unterschiedliche Aufgaben zu: TRAF2 initiiert die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern sowohl über den klassischen als auch den alternativen Weg und initiiert zudem AP-1, während TRAF6 ausschließlich die alternative NF- $\kappa$ B Aktivierung vermittelt [198]. Im Vergleich dazu sind TRAF1 und 3 hauptsächlich regulatorisch an der Signaltransduktion beteiligt [197]. So induziert TRAF1 eine erhöhte Degradation von TRAF2 und kann somit dessen Wirkung vollständig inhibieren [199], während TRAF3 sowohl als Monomer als auch durch Bildung von Heterotrimeren mit TRAF2 in der Lage ist, selektiv die Translokation von NF- $\kappa$ B zu hemmen, während die AP-1 Aktivierung intakt bleibt [198, 200].



**Abbildung 2.8: Skizze der Signaltransduktion durch CD40**

Nachdem das CD40L-Trimer das CD40-Monomer gebunden hat, beginnt dessen Anreicherung in Lipid rafts und die Multimerisierung des CD40-Rezeptors zu Trimeren. Gleichzeitig werden die beteiligten TRAF-Trimere assoziiert und setzen die verschiedenen Signalkaskaden in Gang, welche in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren münden. Diese sind wiederum in der Lage, bestimmte Gene zu regulieren und somit die Zellantwort zu ermöglichen.

Neben den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen lassen sich dementsprechend auch verschiedene Aufgaben der einzelnen TRAFs nachweisen. So spielt TRAF6 z.B. eine essentielle Rolle in der Differenzierung und Affinitätsreifung von B-Zellen, während TRAF2 und 3 vornehmlich für den Klassenwechsel verantwortlich sind [201].

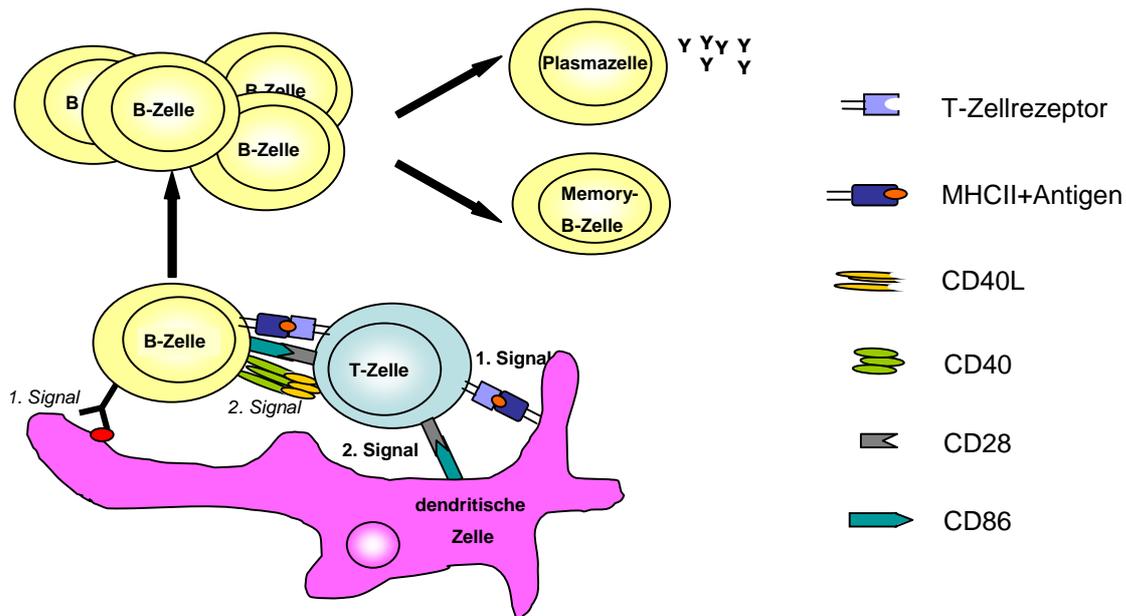
Neben den TRAF-abhängigen Signaltransduktionswegen werden auch andere Möglichkeiten der Induktion einer Genexpression durch CD40 diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass die Ligation von CD40 zwar keine direkte Kinaseaktivität nach sich zieht, allerdings der JAK3/STAT3-Weg aktiviert werden kann [202].

Zusammenfassend lässt sich die Signaltransduktion des CD40-Rezeptors als komplexes Netzwerk verschiedenster Faktoren beschreiben, welche zusätzlich durch endogene und exogene Regulation moduliert wird.

### 2.3.5.3 Funktionen im Säuger

Die weite Verbreitung des CD40-Rezeptors innerhalb des Organismus lässt schon vermuten, dass die Funktionen dieses Systems verschiedenste Aufgaben beinhalten, welche sich vornehmlich innerhalb des Immunsystems abspielen und oftmals zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort vermitteln. Da allerdings der Fokus dieser Arbeit auf der adaptiven Immunantwort und damit dem engen Zusammenspiel der T- und B-Lymphozyten liegt, soll im Folgenden vor allem auf die Rolle des CD40-CD40L-Systems für diesen Abschnitt des Immunsystems genauer eingegangen werden.

Das CD40-CD40L-System ist wie bereits erwähnt vor allem für die T-zellabhängige adaptive Immunantwort essentiell. Neben dem Antigenkontakt nimmt hier die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden die wichtigste Rolle ein. Ein von der B-Zelle erkanntes und gebundenes Antigen wird von der Zelle aufgenommen, prozessiert und an MHCII gebunden der T-Zelle präsentiert. Erkennt eine aktivierte T-Zelle nun über ihren T-Zellrezeptor B-Zell-präsentiertes Antigen, so exprimiert sie daraufhin verstärkt CD40L, welches durch CD40 abhängige Signaltransduktion die Expression von CD86 auf B-Zellen induziert. CD86 agiert als potenter Kostimulator für die T-Zelle, die nun die sekundäre Immunantwort weiter einleiten und verstärken kann [203]. CD40L fungiert hier zusätzlich neben dem Antigenkontakt über den B-Zellrezeptor als zweites Signal für die Aktivierung der B-Zelle. Dies führt letztendlich zur Ausbildung von germinalen Zentren, in denen die B-Zellen proliferieren und zu Plasmazellen sowie Memory-Zellen differenzieren [187]. Da auch diese Prozesse maßgeblich durch CD40-Stimulation bestimmt sind, sollen neben der Aktivierung der B-Zellen auch einzelne Aspekte der germinalen Zentrumsreaktion genauer dargestellt werden.



**Abbildung 2.9: Schema der Aktivierung von B- und T-Zellen**

Nach Antigenkontakt wandert die dendritische Zelle in den nächstgelegenen Lymphknoten und präsentiert dort das Antigen. Dieses wird von der T-Zelle spezifisch durch den T-Zellrezeptor erkannt (1.Signal), zusätzlich erhält die T-Zelle Kostimulation durch die dendritische Zelle (2.Signal) und wird somit aktiviert. Gleichzeitig erkennt auch die B-Zelle das Antigen durch den spezifischen B-Zellrezeptor (1.Signal) und präsentiert das Antigen über MHCII der aktivierten T-Zelle. Diese exprimiert daraufhin CD40L, welches als 2. Signal für die B-Zelle fungiert und die B-Zelle aktiviert. Diese kann nun proliferieren und sich zu Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen weiterdifferenzieren. (nach Gordon: "Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues"[204])

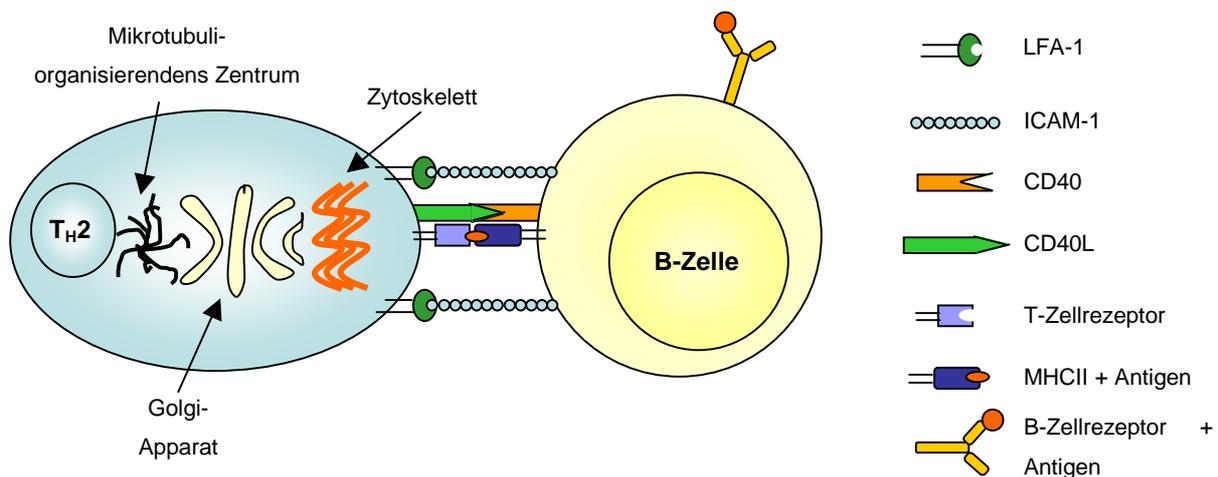
### 2.3.5.3.1 Rolle des CD40-CD40L-Systems in der Aktivierung von B-Zellen

Das CD40-CD40L-System ist einer der potentesten Stimulatoren in der Aktivierung von B-Zellen. Um jedoch zu gewährleisten, dass keine unerwünschten Immunreaktionen in Gang gesetzt werden, ist es zwingend notwendig, dass die B-Zelle beide Signale erhält, es also auch zu einer Aktivierung durch den B-Zellrezeptor kommt.

Kommt es zu einer CD40 Stimulation ohne vorherigen Antigenkontakt, wird verstärkt Fas, ein Apoptose-induzierender Rezeptor, auf der Zelloberfläche exprimiert und die B-Zelle geht in Apoptose [205]. *In vivo* sind nur die durch den B-Zellrezeptor vermittelten Signale in der Lage, die Fas-induzierte Apoptose zu verhindern und zusammen mit der CD40-Stimulation die B-Zelle vollständig zu aktivieren [206, 207]. Dies stellt einen wirksamen Schutz vor der Weiterentwicklung unspezifischer B-Zellen dar. Auch ein alleiniges Signal über den B-Zellrezeptor ohne T-Zellhilfe führt zum Untergang der Zelle, wodurch eine Weiterentwicklung autoreaktiver B-Zellen effektiv unterbunden wird [208].

Eines der ersten Anzeichen von Aktivierung stellt die Zunahme der Zellgröße dar. Dies konnte schon früh für die Stimulation ruhender B-Zellen mit anti-CD40-Antikörpern gezeigt

werden [209]. Zusätzlich ist eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und Adhäsionsmolekülen zu beobachten. So kommt es durch CD40-Ligation zu einer Zunahme von ICAM-1 [210] und LFA-1, welche beide als Adhäsionsmoleküle an der Ausbildung einer engen Verbindung zwischen B- und T-Zellen und damit der sogenannten immunologischen Synapse beteiligt sind. Diese Struktur sorgt durch den engen Zell-Zellkontakt für eine zielgerichtete Stimulation der beiden Partner sowohl durch lösliche als auch durch membranständige Kofaktoren und verhindert durch deren fokale Expression unspezifische Effekte [151]. LFA-1 scheint in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung zu sein, da verschiedene Publikationen einen Zusammenhang zwischen der Expression von LFA-1 und der Inhibierung der B-Zellrezeptor-vermittelten Apoptose sehen [211-213].



**Abbildung 2.10: Schema einer immunologischen Synapse**

Die immunologische Synapse stellt eine enge Verbindung zwischen Zellen des Immunsystems, hier der T- und der B-Zelle, dar und verhindert unspezifische Reaktionen, indem sie die Interaktion zwischen den Zellen räumlich begrenzt. Die räumliche Nähe wird vor allem durch die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 vermittelt, aber auch innerhalb der Zellen kommt die Struktur zum tragen: durch die Anordnung des Golgi-Apparats und des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums sowie der beteiligten Rezeptoren in der Achse der Synapse kommt es zu einer zielgerichteten Ausschüttung von Zytokinen und verstärkter Signaltransduktion durch die Rezeptoren.

(aus Janeway: "Immunobiology")

Neben Adhäsionsmolekülen wird auch eine Reihe von Kostimulatoren, vor allem CD80, CD86, sowie MHCII auf der Zelloberfläche induziert. Damit werden die B-Zellen zu potenten, professionellen Antigen präsentierenden Zellen, die im Zuge der adaptiven Immunantwort naive T-Zellen aktivieren können, die ihrerseits wiederum zu einer Aktivierung der B-Zellen führen. Die Aktivierung lässt sich dabei in zwei Phasen unterteilen:

zunächst kommt es zu einer gesteigerten Aggregation von MHCII und CD80 innerhalb der „*Lipid rafts*“, was sowohl die Signaltransduktion durch MHCII in die B-Zelle verstärkt als auch die gesteigerte Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen induziert. Zusätzlich wird auch eine direkte Wirkung auf die Antigenprozessierung nicht ausgeschlossen [214]. Die anschließende späte Phase ist durch die aus der gesteigerten Expression von CD80 Molekülen resultierende kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen geprägt [215].

Ein weiteres Phänomen der Aktivierung stellt die Produktion von kostimulatorischen Zytokinen dar. In der Literatur gibt es viele teilweise konträre Publikationen, welche die Komplexität der Zytokinsekretion nach CD40-Stimulation widerspiegeln. Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei, welches Entwicklungsstadium die stimulierten B-Zellen haben.

Ein für die B-Zellentwicklung besonders wichtiges Zytokin ist IL-6, welches neben der Induktion von B-Zellproliferation auch maßgeblich für die Differenzierung und Antikörperproduktion verantwortlich ist [216, 217].

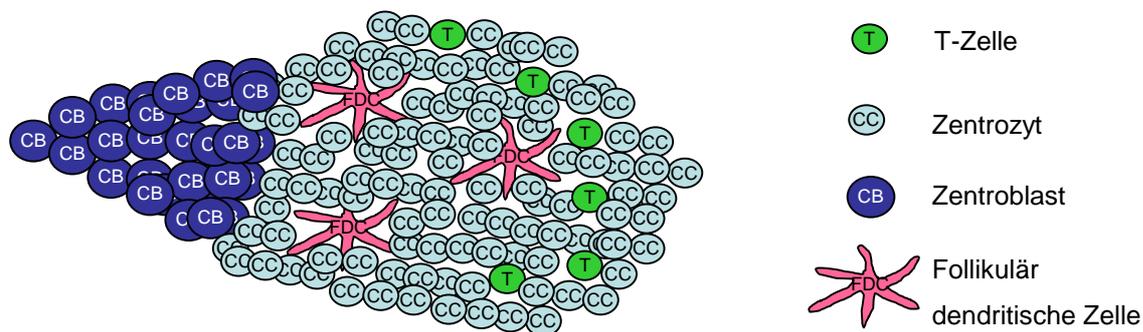
Vor allem naive B-Zellen sezernieren dieses Zytokin nach CD40-Stimulation, während B-Zellen des germinalen Zentrums anscheinend nicht mehr in der Lage sind, IL-6 zu produzieren, was einen Wechsel von einer autokrinen zu einer parakrinen IL-6 Stimulation nach sich zieht [218]. Darüber hinaus ist auch hier die Struktur des CD40L ausschlaggebend, da gegen CD40 gerichtete Antikörper im Vergleich zu membrangebundenem CD40L nicht in der Lage sind, IL-6 mRNA zu induzieren [219].

Ein weiteres CD40L-induziertes Zytokin ist IL-10, welches ebenfalls wichtige Aufgaben in der Regulierung der germinalen Zentrumsreaktion inne hat. Auf der einen Seite spielt es zusammen mit IL-6 eine wichtige Rolle in der B-Zelldifferenzierung, auf der anderen Seite scheint es allerdings auch in der Lage zu sein, unerwünschte Immunreaktionen durch alleinige CD40-Stimulation zu unterbinden [220, 221].

#### **2.3.5.3.2 Bildung und Erhaltung von germinalen Zentren**

Die Aktivierung von B-Zellen ist am ersten Schritt in der Entstehung von germinalen Zentren beteiligt. Ausschlaggebend ist dabei die Präsentation von Antigen durch dendritische Zellen und die daraus resultierende Aktivierung von T-Zellen, die wiederum die Stimulation und Proliferation von antigenspezifischen B-Zellen zur Folge hat. T- und B-Zellen bilden nun eine Primärfollikel genannte Struktur aus. Die so aktivierten B-Zellen, nun Zentroblasten genannt, fangen daraufhin an, sich in der sogenannten „dunklen Zone“ des germinalen Zentrums zu teilen und ihren B-Zellrezeptor durch somatische Hypermutation zu modifizieren. Die so

entstandenen Zentrozyten wandern dann in die „helle Zone“, wo sie von follikulären dendritischen Zellen präsentiertes Antigen über den B-Zellrezeptor binden und zusätzlich CD40L-Kostimulation erhalten. Da B-Zellen in diesem Stadium beide Signale benötigen, gehen Zellen ohne einen hochaffinen antigenspezifischen B-Zellrezeptor in Apoptose. Dies sind entweder B-Zellen, deren B-Zellrezeptor das Antigen überhaupt nicht mehr oder nur mit einer geringen Affinität bindet. Damit erfolgt eine effektive Affinitätssteigerung der B-Zellen gegenüber dem Antigen. Solch gereifte B-Zellen können auch Antigen aufnehmen und T-Zellen präsentieren, um weitere CD40L Stimulation zu erhalten. Darüber hinaus ist die Kostimulation zusätzlich über CD40L exprimierende B-Zellen möglich [222]. Nach diesen Reifungsschritten können die B-Zellen dann abhängig von verschiedenen Zytokinen zu Plasmazellen und Memory-B-Zellen weiterdifferenzieren [223-225]. Durch IL-10 wird zum Beispiel die Proliferation gestoppt und die Plasmazellentwicklung in Gang gesetzt [226]. CD40L ist demzufolge essentiell in der Erhaltung von germinalen Zentren, was deutlich bewiesen werden konnte, indem man durch anti-CD40L Antikörper die germinale Zentrumsreaktion gänzlich unterbinden konnte [227].



**Abbildung 2.11: Aufbau eines germinalen Zentrums**

Germinale Zentren lassen sich in eine dunkle Zone mit proliferierenden Zentroblasten und eine helle Zone von Zentrozyten unterteilen. Innerhalb der hellen Zone lassen sich Follikuläre dendritische Zellen finden, welche das Antigen präsentieren, während die T-Zellen der sogenannten Mantelzone vor allem für die Überlebenssignale zuständig sind.

(nach Gordon: "Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues" [204])

Schlussendlich lassen sich die Hauptaufgaben des CD40-CD40L-Systems in der Ausbildung und Erhaltung des germinalen Zentrums mit der Proliferation der Zentroblasten, dem Verhindern der Apoptose hochaffiner Zentrozyten und der Steuerung der Differenzierung der Zentrozyten zusammenfassen [228].

### **2.3.5.3.2.1 Proliferation**

Erster Schritt in der Initiierung germinale Zentren ist die Proliferation aktivierter B-Zellen. Dies geschieht im Allgemeinen durch die Stimulation des CD40 Rezeptors durch CD40L, allerdings konnten neuere Studien zeigen, dass einige Funktionen auch durch C4b, ein Protein des Komplementsystems, induziert werden können [201]. Die durch CD40L induzierte Proliferation alleine ist jedoch nicht ausreichend, um die Zentrumsreaktion zu beginnen. *In vitro* Experimente mit rekombinantem CD40L konnten in diesem Zusammenhang zwar einen proliferativen Effekt nachweisen [229] der allerdings nur schwach und zeitlich eng begrenzt war. Eine erhebliche Steigerung konnte durch die Zugabe des T-Zell Zytokins IL-4 erreicht werden, was die enge Zusammenarbeit von T- und B-Zellen in der adaptiven Immunantwort widerspiegelt [230]. Darüber hinaus ist eine anhaltende Stimulation notwendig, um das Absterben der B-Zellen zu verhindern [231].

Weitere *in vitro* Experimente konnten zusätzlich nachweisen, dass humane B-Zellen in einem CD40L/IL-4 System bis zu 35 Tage lang kultiviert werden können. Dabei zeigte sich eine typische Verlaufskurve: bis Tag 5 konnte keine Wirkung gezeigt werden. Daran anschließend folgte eine Phase mit hoher Proliferationsrate, die beginnend mit Tag 23 konsequent abnahm [232]. Gleichzeitig konnte in diesem Experiment eine Erhöhung der Telomeraseaktivität festgestellt werden, welche die Zellalterung erheblich verlangsamt.

### **2.3.5.3.2.2 Apoptotische und antiapoptotische Wirkung**

Die Rolle des CD40-CD40L-Systems für die Apoptose ist sehr ambivalent, was sich auch in einer Fülle von teilweise widersprüchlichen Publikationen widerspiegelt. Ausschlaggebend für die Wirkung ist auch hier vor allem die Art der verwendeten Zellen sowie deren Aktivierungs- und Entwicklungsstatus [233]. So konnte zum Beispiel in vielen B-Zelllinien und einigen B-Zellymphomen eine ausgeprägte apoptotische Wirkung der CD40 Aktivierung nachgewiesen werden [234].

Auch innerhalb der B-Zellentwicklung unterscheidet sich die Wirkung von CD40L abhängig vom jeweiligen Entwicklungszustand der Zelle. Ruhende reife B-Zellen reagieren auf alleinige CD40 Stimulation mit einer Sensibilisierung auf Fas-vermittelte Apoptose, welche jedoch durch Signale des B-Zellrezeptors reversibel ist. Dies sichert, dass ausschließlich antigenspezifische B-Zellen, die somit auch das spezifische Antigen T-Zellen präsentieren

können, T-Zellhilfe erhalten und proliferieren [235]. Wird im Gegensatz dazu nur der B-Zellrezeptor aktiviert, kommt es zwar zu einer kurzen Proliferation, die ohne T-Zellhilfe und damit CD40L Stimulierung jedoch mit der Apoptose dieser Zellen endet. Dadurch werden autoreaktive B-Zellen eliminiert [236]. Wie bereits beschrieben, können demnach nur B-Zellen, die beide Signale erhalten haben, zu aktivierten B-Zellen werden und die adaptive Immunantwort einleiten.

Auch innerhalb des germinalen Zentrums kommen dem CD40L verschiedene Aufgaben zu. Auf der einen Seite sensibilisiert er Zentrozyten für B-Zellrezeptor-medierte Apoptose, um auch in diesem Entwicklungsstadium die Entwicklung autoreaktiver B-Zellen zu verhindern (diese erhalten zwar Stimulation über den B-Zellrezeptor, können mit diesem aber nicht das von den dendritischen Zellen präsentierte Antigen erkennen und erhalten somit keine CD40L-Kostimulation). Auf der anderen Seite stellt die CD40-Stimulation ein potentes Überlebenssignal für die Zentrozyten dar [237].

### **2.3.5.3.3 Affinitätsreifung und Klassenwechsel**

Für B-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems ist es für ihre Funktion entscheidend, den B-Zellrezeptor und damit gleichzeitig auch die gebildeten Antikörper möglichst optimal durch die Affinitätsreifung an das Pathogen anzupassen. Dies geschieht wie zuvor erwähnt im germinalen Zentrum, für dessen Generierung und Erhaltung das CD40-CD40L-System essentiell ist [42]. Darüber hinaus erfüllt dieses System auch Aufgaben im Rahmen der Generierung hochaffiner Antikörper verschiedener Antikörperklassen, was durch die Charakterisierung einer natürlich vorkommenden Mutation des CD40L-Gens, dem „*X-linked-Hyper-IgM-Syndrom*“, erstmals deutlich wurde. Hier führt ein nichtfunktionales CD40L-Protein zu einem erhöhtem Titer an unspezifischem IgM, während die IgG- und IgA-Titer erheblich erniedrigt sind. Darüber hinaus zeigen diese Patienten keinerlei Ausbildung germinaler Zentren [187].

Im Weiteren soll nun auf die Funktionen des CD40-CD40L-Systems für die Affinitätsreifung und den Isotypenwechsel eingegangen werden.

### **2.3.5.3.3.1 Somatische Hypermutation**

Die somatische Hypermutation ist zusammen mit den unter 2.3.5.3.2 beschriebenen Selektionsprozessen für die Affinitätsreifung der B-Zellen verantwortlich. Dabei lässt sie sich vornehmlich in Zentroblasten beobachten, während die Selektionsprozesse auf der Stufe der Zentrozyten stattfinden [238].

Die somatische Hypermutation ist hauptsächlich durch die Einführung von Punktmutationen gekennzeichnet. Deletionen und Insertionen kommen dabei in einem wesentlich geringeren Umfang vor. Alle Mutationen finden jeweils innerhalb der V-Gensegmente des Immunglobulins statt. Dieses besteht aus einer leichten Kette und einer schweren Kette, welche mit dem für den Isotyp ausschlaggebenden konstanten Teil verbunden ist. Sowohl die leichte als auch die schwere Kette verfügen über V- und J-Segmente, wohingegen D-Segmente ausschließlich für die schwere Kette kodieren. Innerhalb der V-Segmente wiederum lassen sich die Mutationen fast ausschließlich in so genannten „Hotspots“ finden, welche nach erfolgter Faltung des Proteins dessen Bindungsstelle bilden. Die somatische Hypermutation läuft dabei in zwei Schritten ab: zunächst werden durch ein spezielles Enzym, der „activation-induced-cytidine-deaminase“ (AID), durch die Umwandlung von Thymidin in Uracil vor allem „U-G-Mismatches“ eingeführt. Anschließend werden die so entstanden Mutationen durch DNA-Reparaturproteine und Polymerasen in die DNA integriert [239].

Die Rolle des CD40-CD40L-Systems für die somatische Hypermutation besteht in der positiven Regulation der AID Expression. So führt eine Stimulation des CD40-Rezeptors zu einer Zunahme der AID-mRNA in humanen primären B-Zellen, was durch eine gleichzeitige IL-4-Gabe deutlich gesteigert werden konnte [201]. In weiteren Studien war es durch *in vitro* Experimente zusätzlich möglich, die Induktion der somatischen Hypermutation nach Stimulation mit CD40L auch direkt nachzuweisen. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die CD40L Stimulation zwar ein essentieller Faktor ist, darüber hinaus jedoch auch die Signale des B-Zellrezeptors und B-T-Zellkontakt für die somatische Hypermutation notwendig sind [240].

### **2.3.5.3.3.2 Klassenwechsel**

Neben der somatischen Hypermutation, welche die Diversität der variablen Genanteile betrifft, kommt es im Zuge der adaptiven Immunantwort auch zu einem Austausch des

konstanten Teils des Immunglobulins, dem Klassenwechsel. Dabei wird ein einzelnes für den konstanten Teil kodierendes Gensegment an die V(D)J-Region gekoppelt, wobei jedes C-Gensegment jeweils für einen Isotyp (IgA, IgM, IgG, IgE) steht. CD40-Stimulation spielt auch bei dieser Genumordnung durch die Aktivierung und damit der Induzierung von AID eine bedeutende Rolle. Die AID besitzt zwei verschiedene Domänen, welche die verschiedenen Funktionen in der somatischen Hypermutation und dem Klassenwechsel vermitteln [241]. Ihre Funktion für den Klassenwechsel besteht hier ebenfalls wieder in der Umwandlung von Thymidin in Uracil, wobei nun durch ein weiteres Enzym, der AP Endonuklease, die Brücken zwischen den Basen gelöst werden („DNA nick“). Durch DNA-Reparaturproteine werden dann Doppelstrangbrüche induziert, welche letztendlich zur Rekombination mit den jeweiligen C-Gensegmenten führen [242-244].

Die Stimulation durch CD40L ist also zumindest für den Klassenwechsel T-Zellabhängiger Antigene essentiell, für T-Zell-unabhängige Antigene beschreiben neuere Publikationen auch einen durch BAFF induzierten Klassenwechsel, der allerdings nur bestimmte Isotypen (IgA) betrifft [141]. Durch eine alleinige Stimulation des CD40-Rezeptors konnte sowohl in nativen B-Zellen als auch in einer B-Zelllinie ein geringer Isotypenwechsel zu IgA und IgG gezeigt werden [245], wohingegen ein Wechsel zu IgE nur durch Zugabe von IL-4 erreicht werden konnte [246]. Generell ist die Kostimulation durch verschiedene Zytokine, vor allem IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ , für einen optimalen Klassenwechsel nötig, der sowohl alle Isotypen als auch eine hohe Rekombinationsrate beinhaltet.

#### **2.3.5.4 CD40-CD40L im Huhn**

Mit der Hühnerlinie UM-B19 bestand schon früh ein deutlicher Hinweis auf ein funktionelles CD40-CD40L-System im Huhn. Diese Tiere wiesen eine ähnliche Symptomatik auf, wie sie später auch für das Hyper-IgM-Syndrom des Menschen beschrieben wurde, welches auf einem Gendefekt des CD40L-Gens beruht. Die Hühner zeichneten sich durch stark erniedrigte IgG-Titer (10-100x) aus, wohingegen die Titer für IgM (2-10x) und IgA zeitlebens erhöht waren [247, 248]. Auch nach der Immunisierung mit thymusabhängigen Antigenen zeigten sie keinen Anstieg von IgG Antikörpern [249]. Des Weiteren waren keine IgG<sup>+</sup> Zellen in den lymphatischen Organen zu finden [250]. All diese Fakten weisen eine starke Ähnlichkeit mit den Beobachtungen in Hyper-IgM-Patienten auf, welche ebenfalls nicht in der Lage sind, auf TD-Antigene zu reagieren. Dies erhärtet die Hypothese, dass ein dem Säuger analoges CD40-CD40L-System im Huhn existiert.

2005 konnte von Tregaskes et al. in der EST-Datenbank tatsächlich eine Sequenz gefunden werden, die für ein sechs Exon beinhaltendes CD40L Homolog im Huhn kodiert. Trotz einer insgesamt nur ca. 45% bestehenden Homologie zu den Mammaliersequenzen sind die Sequenzen für die funktionellen Domänen relativ hoch konserviert.

Mit diesen Daten gelang es, rekombinantes chCD40L-Protein sowie einen gegen chCD40L gerichteten Antikörper zu generieren, um die Funktion des CD40-CD40L-Systems im Huhn zu untersuchen. Massenspektrometrische Untersuchungen des chCD40L konnten die typische Trimer-Struktur beweisen. Darüber hinaus konnte eine im Mammaliersystem nicht vorkommende Disulfidbrücke gefunden werden.

Erste Untersuchungen konnten zudem eine Expression von chCD40L auf aktivierten T-Zellen analog zum Säugersystem zeigen. Eine Unterscheidung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde dabei aufgrund der geringen Expression jedoch nicht vorgenommen. Auch die Expression von CD40 ähnelt dem das Säugersystems: B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten waren im Gegensatz zu T-Lymphozyten durchweg in der Lage, chCD40L zu binden.

Neben der Expression von chCD40L und chCD40 konnten auch einige biologische Funktionen bewiesen werden. So ist chCD40L in der Lage, die NO-Produktion in einer Hühner-Makrophagen-Zelllinie (HD11) zu induzieren. Zusätzlich konnte in *in vitro* Experimenten mit chCD40L eine erhöhte Überlebensrate von Milzzellen nach 48 und 120 Stunden gezeigt werden. Interessanterweise konnte dies in bursalen B-Zellkulturen nicht beobachtet werden. Darüber hinaus ist dieser Effekt dosisabhängig. So scheinen höhere Konzentrationen negative Auswirkungen auf das Überleben der B-Zellen zu haben, während geringere Dosen den Effekt positiv beeinflussen. Auch die im Säugersystem beschriebene Induktion von Apoptose in B-Zelllinien konnte für das Huhn nachgewiesen werden: so war chCD40L in der Lage, dosisabhängig Apoptose in DT40 Zellen (einer bursalen B-Zelllinie) auszulösen [123].

### 3 Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war eine Weiterführung der bereits durch Tregaskes et al. begonnenen Untersuchung des CD40-CD40L-Systems im Huhn. Dabei wurde einerseits der beschriebene rekombinante chCD40L als auch ein gegen chCD40 gerichteter Antikörper verwendet, um die biologischen Funktionen im Hinblick auf die B-Zellspezifischen Effekte weiter zu charakterisieren.

Da das Huhn zusammen mit dem Fischen phylogenetisch zwischen den Säugetieren und den restlichen Tiermodellen (*Drosophila*, *C. elegans*) steht, sind die aus der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zunächst für die Evolutionsbiologie interessant. Gerade die Mitglieder der TNF-Familie scheinen ihre funktionellen Domänen in den verschiedensten Spezies hochkonserviert zu haben und stellen durch die Tatsache, dass sich einzelne Familienmitglieder bereits in *Drosophila* finden lassen und die TNF-Familie für eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen essentiell sind, eine wichtige Zytokinfamilie dar.

Zudem kommt dem Huhn eine weitere Bedeutung als Tiermodell für die GALT-Spezies, der eine Reihe von Haussäugetieren angehören, zu. Die Tatsache, dass die primären Lymphorgane dieser Spezies um den Zeitpunkt der Geschlechtsreife in Involution gehen und somit die Generierung des B-Zellpools auf eine kurze Zeit limitieren, macht das herkömmliche Mausmodell für die B-Zellentwicklung und Homöostase weitgehend unbrauchbar. Nachdem Kothlow et al. [143] bereits deutlich zeigen konnten, dass für das Zytokin BAFF teilweise erheblich funktionelle Unterschiede zwischen dem Maus- und dem Hühnermodell bestehen, sollen die Regulationsmechanismen der B-Zellen anhand der Untersuchung des CD40-CD40L-Systems des Huhnes nun weiter charakterisiert werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Haltung

#### 4.1.1 Hühner

Die primären Lymphozyten wurden aus Blut und Organen von Hühnern der Linien M11 (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp), Valo und LSL (Lohmann's selected Leghorn) gewonnen.

Bezugsquelle waren das Institut für Tierzucht in Mariensee für die Eier der Linie M11 und die Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, für die LSL-Tiere. Die Eier wurden jeweils am Institut unter Standardbedingungen ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Volieren gehalten. Als Futter wurde handelsübliches Alleinfutter verwendet; Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

### 4.2 Gewinnung von primären Hühnerlymphozyten

#### 4.2.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle genannten Reagenzien bei 4°C gelagert.

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

8,00 g	Natriumchlorid (NaCl) <sup>1*</sup>
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumchlorid (KCl) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>1</sup>
ad 1000 ml	Aqua dest.

Nach Anmischen wurde der Puffer jeweils mit HCl<sup>1</sup> oder NaOH<sup>1</sup> unter Verwendung eines pH-Meters, dass zuvor durch Maßlösungen<sup>1</sup> geeicht wurde (pH4 und pH7), auf pH 7,2 eingestellt und anschließend autoklaviert.

\* Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang aufgeführten Bezugsquellen

Ficoll-Paque<sup>2</sup>

Heparinlösung (500U/ml)<sup>3</sup>

1ml Heparin-Natrium 20.000<sup>3</sup>

ad 40ml RPMI 1640 mit stabilem Glutamin ("Glutamax", im Folgenden RPMI)<sup>4</sup>

Trypanblau-Lösung<sup>1</sup>

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

Abhängig von der benötigten Menge wurden eine oder mehrere 10 ml Spritzen<sup>5</sup> mit 0,2 ml Heparinlösung beschichtet (verwendete Kanülen: 0,70x32 mm<sup>5</sup>). Die Blutentnahme erfolgte anschließend aus der linken Vena jugularis. Das gewonnene Vollblut wurde daraufhin in 15ml Röhrchen<sup>6</sup> überführt und bei 60xg für 20 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert („*Slow-Speed-Zentrifugation*“). Danach wurden die nun den Erythrozyten aufliegenden Lymphozyten mit einer Pasteurpipette<sup>5</sup> im Plasma aufsuspendiert, vorsichtig in ein weiteres Röhrchen überführt und zwei mal mit PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 225xg für jeweils 10 min gewaschen.

Die Qualitative und quantitative Beurteilung erfolgt anschließend durch eine Lebend/Tot-Färbung mittels Trypanblaulösung (20 µl Trypanblaulösung ad 20 µl Zellsuspension) unter Verwendung einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer.

#### **4.2.3 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen**

Die für die Organentnahme vorgesehenen Hühner wurden betäubt und durch Blutentzug getötet. Anschließend wurde das Abdomen mit Alkohol<sup>1</sup> benetzt, die Haut abgezogen und die Leibeshöhle durch Umklappen des Sternums nach kranial eröffnet. Die Organentnahme erfolgte nun mit sterilen Instrumenten; die Organe wurden sofort danach in Röhrchen mit sterilem PBS überführt und auf Eis gestellt.

Um die Zäkaltonsillen von dem enthaltenen Schleim zu befreien, wurden die Darmstücke der Länge nach eröffnet und in RPMI mit Antibiotikazusatz (Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml<sup>4</sup>) unter Mediumwechsel 15 min auf dem Schüttler gewaschen.

Die jeweiligen Organe (Bursa, Milz und Zäkaltonsille) wurden anschließend mithilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Sieb (Maschenweite 0,75x0,75 mm) gepresst und die erhaltene Organsuspension in einem 50 ml Röhrchen 10min auf Eis gestellt, um die größeren Gewebestücke über Sedimentation entfernen zu können.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Suspension bis auf 5 ml abgenommen und bei 4°C und 225xg für 10 min zentrifugiert. Im Folgenden wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml RPMI resuspendiert und auf 10 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 600xg für 12 min (Dichtezentrifugation) wurde die dem Ficoll nun aufliegende Lymphozytenfraktion vorsichtig abgenommen und in PBS erneut per Zentrifugation gewaschen.

Die Beurteilung erfolgte ebenfalls über eine Trypanblau-Färbung (s.4.2.2).

## 4.3 Kultivierung von Zellen

### 4.3.1 Medien und Zusätze

#### Standardmedium

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

Lagerung: FBS und die Penicillin/Streptomycin-Lösung wurden jeweils in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### Medium für 7TD1-Zellen

445 ml	RPMI <sup>4</sup>
50 ml	inaktiviertes, fetales Rinderserum <sup>4</sup> (30min bei 57°C inaktiviert, FBSi)
5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>4</sup> (Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml in RPMI)
50 µl	β-Mercaptoethanol <sup>1</sup> (β-ME) 20 mM
500 ng	rChIL-6 <sup>7</sup>

LMH-Medium

445 ml	DMEM <sup>4</sup>
50 ml	FBS <sup>4</sup>
5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>4</sup> (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 µg/ml in DMEM)

B-Zell-Medium

460 ml	IMDM <sup>4</sup>
25 ml	FBS <sup>4</sup>
10 ml	Hühnerserum <sup>4</sup>
5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>4</sup> (Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml in RPMI)
50 µl	Selen/Insulin/Transferrin-Lösung <sup>8</sup>
50 µl	β-Mercaptoethanol (β-ME) <sup>1</sup> 20 mM

PBS-EDTA (pH 7,2)

200 mg	EDTA <sup>1</sup> (Ethyldiamintetraacetic Acid Tetra Natrium Hydrat, (HOOC-CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> -COOH) <sub>2</sub> )
ad 1000 ml	PBS (s. 1.2.1.)

Einfriermedium

45 ml	FBS <sup>4</sup>
5 ml	DMSO <sup>1</sup> (Dimethylsulfoxid, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)

Lagerung: das Einfriermedium wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

## 4.3.2 Kultivierung von Zellen

### 4.3.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Spezies	Transformation	Medium
7TD1	B-Zellen	Maus	Hybridom	7TD1-Medium
DT40	B-Zellen, Bursa	Huhn	ALV	Standard
855-21	T-Zellen	Huhn	REV	Standard
MSB	T-Zellen, Milz	Huhn	Marek	Standard
LMH	Leberkarzinom	Huhn	chemisch	LMH-Medium
OU-2	Fibroblasten, Embryo	Huhn	chemisch	Standard

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

### 4.3.2.2 Primäre Zellen

Die primären Zellen wurden nach ihrer Präparation auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und im jeweiligen Medium aufgenommen und bei 40°C kultiviert.

#### 4.3.2.2.1 Kurzzeitkulturen (bis 72 h)

Für die Kultivierung bis zu 72 h wurden die Zellen in Standardmedium verbracht und bei einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen / ml in je 1 ml pro Delle in einer 24-Loch-Platte<sup>6</sup> bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.3.2.2.2 Langzeitkulturen

Zellen, die länger als 96 h in Kultur gehalten wurden, erhielten B-Zell-Medium. Die Kultivierung erfolgte in einer 48-Loch-Platte<sup>6</sup> mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml und je 500 µl pro Delle.

Diese Kulturen wurden alle 3-4 Tage wie folgt geteilt:

Zunächst wurden 250 µl Medium aus jeder Delle entnommen und bei Bedarf als Probe weggefroren. Dann wurden jeder Kultur 250 µl frisches Medium zugegeben, die Zellen in

Suspension verbraucht und 250 µl der Zellsuspension in eine neue Delle pipettiert. Anschließend erhielt jede Delle 250 µl frisches Medium bzw. 250 µl frisches Medium mit dem für den Versuch notwendigem Zusatz.

War eine Expansion der Zellen nicht nötig, wurden die 250 µl Zellsuspension verworfen und die ursprüngliche Delle wieder mit Medium aufgefüllt.

#### **4.3.2.3 Gewinnung und Kultur von Makrophagen aus Lymphozyten**

Um Makrophagen zu kultivieren, wurde zunächst die Lymphozytensuspension auf  $2 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt und 10 ml in Standardmedium für 48 h in einer Petrischale<sup>6</sup> im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Petrischalen zweimal mit 37°C warmen PBS kräftig gespült und der Überstand jeweils verworfen. Dem in der Petrischale verbliebenen Makrophagen-Monolayer wurde anschließend für die weitere Kultivierung 5 ml Standardmedium zugegeben und die Schale wieder bei 40°C inkubiert. Um die Zellen für Färbe- und Messschritte von ihrer Unterlage zu lösen, wurden Zellschaber<sup>9</sup> verwendet.

### **4.4 Gewinnung von polyklonalem Antiserum gegen KLH**

Zur Gewinnung des Antiserums wurden zwei Hühner der Linie LSL verwendet. Zunächst wurde den Tieren Blut zum Zweck der Gewinnung des Präimmunserums abgenommen, anschließend folgte die erste Immunisierung mit 100 µg KLH in 1ml einer 1:1 PBS–Freundsches komplettes Adjuvans (FCA) Emulsion in den *M.pectoralis profundus*. 3 Wochen später wurde dann die Boosterimmunisierung vorgenommen, bei der FCA durch Freundsches inkomplettes Adjuvans (FIA) ersetzt wurde.

Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde erneut Blut (10 ml) ohne den Zusatz von Heparin abgenommen und 2 h bei 37°C im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde nach Zentrifugation das Serum gewonnen und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Genehmigung der Immunisierung erfolgte durch die Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531.6-1412001.

## 4.5 Gewinnung von gereinigtem IgG aus Eidotter

### 4.5.1 Material

Zur Eigewinnung wurden dieselben Tiere wie unter 4.4. verwendet; diese wurden nach der zweiten Serumgewinnung in Einzelkäfige verbracht und die Eier über eine Woche gesammelt.

#### Lösungen:

##### TBS-Puffer pH 7,3

6,05 g Tris (  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  )<sup>1</sup>  
43,5 g Natriumchlorid (NaCl)<sup>1</sup>  
1,0 g Natriumazid (Na N<sub>3</sub>)<sup>1</sup>  
ad 5000 ml A.bidest  
mit 5N HCl auf pH 7,3 einstellen

##### 10% Dextransulfatlösung<sup>1</sup>

##### 1M Calciumchloridlösung ( CaCl<sub>2</sub> )<sup>1</sup>

##### Dialyse-Puffer pH 7,8

29,03 g Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)<sup>1</sup>  
45,00 g Natriumchlorid (NaCl)<sup>1</sup>  
1,65 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>1</sup>  
ad 5000 ml A.bidest

##### Ammoniumsulfat ( (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> )<sup>1</sup>

##### Dialyseschläuche<sup>5</sup> (Cut-Off: 14kD)

## 4.5.2 Durchführung

1.Tag:

Zunächst wurde das Dotter (durchschnittliches Gewicht pro Dotter ca.14 g) von 3 Tieren vom Eiweiß getrennt und anschließend die Dotterhaut aufgestochen. Der Inhalt wurde 1:10 mit TBS verdünnt und 30min bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (15min, 5000 U, 4°C). Der Überstand wurde mit 0,4 ml 10% Dextransulfatlösung pro Gramm Dotter versetzt und wieder für 15min bei RT gerührt. Dann wurde 1 ml 1 M CaCl-Lösung pro Gramm Dotter hinzugefügt und das Gemisch für weiter 15min gerührt. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (7000 U, 15min, 4°C). Der Überstand wurde wiederum abgenommen, mittels eines Faltenfilters filtriert und über Nacht bei 4°C gegen TBS dialysiert.

2.Tag:

Der Inhalt des Dialyseschlauchs wurde entnommen und das Gewicht bestimmt. Dann wurde massenanteilig 26% Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben. Nach Zentrifugation (7000 U, 15min, 4°C) wurde das Sediment so lange mit TBS versetzt, bis es sich vollständig gelöst hat und die Lösung über Nacht bei 4°C gegen TBS dialysiert.

3. und 4.Tag:

Die Lösung wurde noch 2x über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehalts und die Überprüfung der Reinheit mittels SDS-Page.

## 4.6 SDS-PAGE

### 4.6.1 Material

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

91 g	Tris <sup>1</sup>
2 g	SDS (Sodiumdodecylsulfat C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S) <sup>1</sup>
ad 500 ml	A. dest. pH mit HCl auf 8,8 einstellen, Lagerung bei 4°C

4xTrisCl/SDS-Puffer pH 6,8

6,05 g	Tris <sup>1</sup>
0,4 g	SDS (Sodiumdodecylsulfat) <sup>1</sup>
ad 500 ml	A. dest., pH mit HCl auf 6,8 einstellen, Lagerung bei 4°C

APS (Ammoniumpersulfat) 10%

0,5 g	APS ( (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>1</sup>
ad 5ml	A. bidest., Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

Trenngel 12%

3,5 ml	A. bidest.
2,5 ml	4x TrisCl/SDS-Puffer pH 8,8
4 ml	30% Acrylamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO) / 0,8% Bisacrylamidlösung <sup>1</sup>
50 µl	APS 10%
20 µl	TEMED (Tetramethylethylendiamin, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ) <sup>1</sup>

in der oben angegebenen Reihenfolge zugeben und sofort verwenden

Sammelgel 4%

6,17 ml	A. bidest.
2,5 ml	4x TrisCl/SDS-Puffer pH 8,8
1,33 ml	30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamidlösung <sup>1</sup>
50 µl	APS 10%
20 µl	TEMED <sup>1</sup>

in der oben angegebenen Reihenfolge zugeben und sofort verwenden

5x Elektrophorese-Puffer

15,1 g	Tris <sup>1</sup>
72,0 g	Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ) <sup>1</sup>
5,0 g	SDS <sup>1</sup>
ad 1000 ml	A. bidest., als Gebrauchslösung 1:5 mit A. dest verdünnen

6x Probenpuffer (Lämmli-Puffer)

7 ml	4x TrisCl/SDS-Puffer pH 6,8
3 ml	Glycerol <sup>1</sup>
1 g	SDS <sup>1</sup>
1 mg	Bromphenolblau (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S) <sup>1</sup>
ad 10 ml	A. bidest., Lagerung als 100 µl-Aliquots bei -20°C

β-Mercaptoethanol <sup>1</sup>

Proteinmolekulargewichtsmarker, ~10-200 kD<sup>10</sup>

#### 4.6.2 Durchführung

Zunächst wurde das Trenngel in eine Gießkammer (BioRad mini Protean II <sup>11</sup>) eingefüllt und mit A. bidest überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser unter Zuhilfenahme von Filterpapier entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet; dabei wurde sofort nach dem Einfüllen der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach Ablauf der Polymerisationszeit wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Probenaschen mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Zwischenzeitlich wurden zu je 50 µl Probe jeweils 10 µl 6x Probenpuffer und 5% β-Mercaptoethanol zugegeben und das Gemisch zur Reduzierung für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden je 20 µl der Proben und 6 µl des Molekulargewichtsmarkers in die Geltaschen pipettiert und das so präparierte Gel in die Kammer eingespannt. Diese wurde nun mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese mit 25 mA gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hat, wurde Stromstärke bis zum Ende auf 40 mA erhöht.

## 4.7 Coomassie-Färbung

### 4.7.1 Material

#### Coomassie-Färbelösung

450 ml	Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) <sup>1</sup>
100 ml	Essigsäure 96% ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) <sup>1</sup>
2,5 g	Coomassie-Brillant-Blau R-250 <sup>1</sup>
ad 1000 ml	A. bidest

#### Entfärbelösung

250 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure 96%
ad 1000 ml	A. bidest

### 4.7.2 Durchführung

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen und das Sammelgel abgetrennt. Anschließend wurde es für 15min in die Färbelösung verbracht und danach in die Entfärbelösung gelegt. Diese wurde nach 10 Minuten durch frische Entfärbelösung ausgetauscht und das Gel darin über Nacht entfärbt.

## 4.8 ELISA

### 4.8.1 Material

#### Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g	Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) <sup>1</sup>
6,00 g	Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) <sup>1</sup>
ad 1000 ml	A. bidest, pH 9,6

PBS-T (0,5%)

0,5 ml Tween20®<sup>1</sup>  
ad 1000 ml PBS (s. 1.2.1)

Magermilchlösung 5%

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

TMB-Puffer

8,2 g Natriumazetat ( $C_2H_3NaO_2$ )<sup>1</sup>  
3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ )<sup>1</sup>  
ad 1000 ml A. bidest.

TMB-Stammlösung

6 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB,  $C_{16}H_{20}N_2$ )<sup>1</sup>  
ad 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid,  $C_2H_6OS$ )<sup>1</sup>

TMB-Gebrauchslösung

10 ml TMB-Puffer 37°C  
332 µl TMB-Stammlösung  
3 µl 30% Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ )<sup>1</sup>

kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

Schwefelsäure 1M

472 ml A. dest.  
28 ml 96% Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ )<sup>1</sup>

zuerst Wasser vorlegen, dann die Säure langsam unter Rühren zugeben

## Antikörper

### Ch-Immunglobulin-ELISA

Antikörper	Gebundenes Antigen	Tierart	Konzentration
A1	ChIgA	Maus	5 µg/ml
M1	ChIgM	Maus	5 µg/ml
G2	ChIgG	Maus	5 µg/ml
A3-POD	ChIgA	Maus	1:5.000
M2-POD	ChIgM	Maus	1:2.000
G1-POD	ChIgG	Maus	1:10.000

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper für den Ch-Immunglobulin-ELISA**

Standard:

Hühnerserum

### Anti-KLH-ELISA

Beschichtung:

KLH 10 µg/ml<sup>19</sup>

Sekundärer Antikörper:

M2-POD oder G1-POD (s. Tab. 2)

Standard:

IgM: Serum KLH-Immunsierter Tiere

IgG: Gereinigtes IgG KLH-immunsierter Tiere

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, betragen die Inkubationszeiten der einzelnen Schritte jeweils 1 h bei 37°C.

Zwischen jedem Schritt wurden die Platten jeweils 3x mithilfe eines ELISA-Washers mit PBS-T gewaschen.

Die Verdünnungen der primären Antikörper (A1, M1, G2) sowie des KLH wurde jeweils mit Beschichtungspuffer, die Verdünnungen der sekundären Antikörper jeweils mit PBS-T erstellt.

Auf jeder Platte wurde standardmäßig eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle („Blank“) mitgeführt.

#### 4.8.2 Ch-Immunglobulin-ELISA

Am Vortag wurden NUNC-Maxisorp® 96-Loch-Platten<sup>9</sup> mit je 100 µl/Delle der primären Antikörperverdünnung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die verbliebenen, freien Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl/Delle 5% Magermilchlösung blockiert.

Danach erfolgte der Probenauftrag als log-2 Titration mit 100 µl/Delle der folgenden Serum-Verdünnungen:

IgA: 1:20

IgM: 1:20

IgG: 1:5000

Zu testende Zellkulturüberstände wurden unverdünnt oder in einer 1:2 Anfangsverdünnung aufgetragen.

Abschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl/Delle des entsprechenden sekundären Antikörpers in der in Tab.1 angegebenen Verdünnung.

Zur Entwicklung des ELISAs wurde nach Ablauf der letzten Inkubationszeit die kurz zuvor angesetzte TMB-Gebrauchslösung mit 100 µl/Delle aufgetragen und die Platte im Dunkeln inkubiert; eine Blaufärbung zeigt ein positives Ergebnis an. Nach 10min wurde die Reaktion mit je 50 µl/Delle Schwefelsäure gestoppt (Farbumschlag nach Gelb) und die Platte sofort bei 450 nm photometrisch mit einem ELISA-Reader gemessen.

Als Positivkontrolle diente Serum unbehandelter Tiere in der in Tab. 1 angegebenen Verdünnung, die Negativkontrolle wurde durch Auftrag von 100 µl PBS-T anstatt der Probe erstellt.

### 4.8.3 Anti-KLH-ELISA

Um den Titer an KLH-spezifischen Antikörpern zu bestimmen, erfolgte die Beschichtung am Vortag mit 100 µl/Delle der KLH –Lösung. Nach dem Blockierungsschritt erfolgte der Probenauftrag der Serumverdünnungen (IgM 1:20, IgG 1:100) oder unverdünnter Zellkulturüberstände mit je 100 µl/Delle als log-2 Verdünnungsreihe. Daran anschließend wurde die Platte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (s.Tab.2) inkubiert und wie unter 4.8.2 beschreiben entwickelt und gemessen.

Als Positivkontrolle diente das Immuserum bzw. das gereinigte IgG der KLH-immunisierten Tiere (s. 4.4, 4.5), Negativkontrolle war wiederum PBS-T.

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

### 4.9.1 Material

#### XTT-Lösung (kurz vor Gebrauch ansetzen)

1 mg XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl) -5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid))<sup>1</sup>

1 ml RPMI

Das Salz wird bei 37°C gelöst.

#### PMS-Lösung (5mM)

1,53 mg Phenazin-Methosulfat (PMS) (N-methyldibenzopyrazin Methylsulfat Salz)<sup>1</sup>

1 ml PBS

Lichtgeschützt ist die Lagerung bei 4°C für 3 Monate möglich.

### 4.9.2 Durchführung

Dieser im Säuger etablierte, kolorimetrische Nachweistest beruht auf der IL-6-Abhängigkeit der murinen Hybridomzelllinie 7TD1. Das zugrunde liegende Testprinzip ist die, durch IL-6 induzierbare, dosisabhängige Proliferation der 7TD1 Zellen, welche mittels des Tetrazoliumsalzes XTT quantifiziert werden kann. Durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen kommt es zur Umwandlung des gelblichen Tetrazoliumsalzes XTT in ein orangerotes Formazan Produkt. Die Auswertung erfolgt durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm. Somit lassen sich über die gemessenen Extinktionen Rückschlüsse auf das Ausmaß der induzierten Proliferation und damit über die Menge an IL-6 in den Proben ziehen.

Die zu testenden Überstände, wurden auf einer sterilen 96-Loch-Flachbodenplatte<sup>6</sup> austitriert, wobei das Endvolumen pro Delle 200 µl betrug (100 µl Probe + 100 µl 7TD1 Zellsuspension). Da es sich bei der Titration in der Regel um log 2 Titrationen handelte, wurden 100 µl 7TD1 Medium vorgelegt. Die Verdünnung der eingesetzten Probe hing von der gewünschten Endverdünnung bzw. -konzentration ab. So wurde als Positivkontrolle rChIL-6 in einer Konzentration von 2 ng/ml verwendet (somit ergibt sich nach Zugabe der Zellsuspension eine Endkonzentration von 1ng/ml). Als Negativkontrolle dienten Ansätze mit IL-6-freiem 7TD1 Medium. Die Zellkulturüberstände wurden in einer 1:4 Verdünnung verwendet.

Nach Vorbereitung der Platten wurde die 7TD1-Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen<sup>9</sup> abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde in 50 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3-mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 7TD1 Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und auf eine Dichte von  $2 \times 10^3$  Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden in jede Kavität der vorbereiteten 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Anschließend erfolgte eine 96-stündige Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 0,025 mM XTT-Gebrauchslösung angesetzt, dazu wurden pro ml XTT-Lösung 5 µl der PMS-Lösung zugesetzt. 50 µl dieser Gebrauchslösung wurden in jede zu testende Delle der 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert.

Diese wurde dann für 4 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die 96-Loch-Flachbodenplatte für eine Minute auf einen Schüttler gestellt, um die gebildeten Formazan-Kristalle zu lösen.

## 4.10 Durchflusszytometrie

Die Messungen wurden an einem Fluorescence Activated Cell Scanner (FACScan®) durchgeführt und mit Cell Quest Pro, WinMDI 2.9 und Flowjo 7.8 ausgewertet.

### 4.10.1 Material

#### Fluo-Puffer

5 g            bovines Serumalbumin<sup>1</sup>

50 mg        Natriumazid<sup>1</sup>

ad 500 ml    PBS

Lagerung bei 4°C

#### FACS-Puffer

100 mg       Natriumazid

ad 1000 ml   PBS

#### 10x PBS

#### Paraformaldehyd (PFA) 4%

20 g           Paraformaldehyd ((CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>)<sup>1</sup>

ad 450 ml    A. bidest

Im Wasserbad bei 60°C für 1 Stunde rühren und nach Ablauf der Zeit das restliche PFA durch tropfenweise Zugabe von NaOH in Lösung bringen. Anschließend 50 ml 10xPBS zugeben.

#### Propidiumjodid

100 µg       Propidiumjodid<sup>2</sup>

ad 1 ml        PBS

Normal-Mausserum<sup>14</sup>FACS-Lysis-Buffer<sup>12</sup>FACS-Perm<sup>12</sup>

Klonname	Gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration
<b>Primäre Antikörper</b>				
2G1	Leichte Kette	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
AV20	chB6	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
M1	IgM	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
4D12	IgG	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
CT3	CD3	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
2-6	CD4	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
3-298	CD8	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand
Kul01	unbekannt	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand
LD42	MHCII	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand
AV79	chCD40	IgG2a	Maus	0,1 µg/ml <sup>14</sup>

**Tabelle 3: Primäre Antikörper für die FACS-Färbungen**

<b>sekundäre Antikörper (fluoreszenzmarkiert)</b>				
Anti-Maus-IgG-FITC <sup>14</sup>	Maus-IgG	polyklonal	Ziege	1:250
Anti-Maus-IgG1-FITC <sup>15</sup>	Maus-IgG1	polyklonal	Ziege	1:50
Anti-Maus-IgG2a-FITC <sup>15</sup>	Maus-IgG2a	polyklonal	Ziege	1:50
Anti-Maus-IgG2b-FITC <sup>15</sup>	Maus-IgG2b	polyklonal	Ziege	1:50
Anti-Maus-IgG1-PE <sup>15</sup>	Maus-IgG1	polyklonal	Ziege	1:300
Anti-Maus-IgG2a-PE <sup>15</sup>	Maus-IgG2a	polyklonal	Ziege	1:300
Anti-Maus-IgG2b-PE <sup>15</sup>	Maus-IgG2b	polyklonal	Ziege	1:300

**Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für die FACS-Färbung**

### 4.10.2 Einfachfärbung

Die Färbungen wurden auf einer 96-Loch-Platte durchgeführt; alle Angaben beziehen sich auf je eine Delle. Die Antikörperverdünnungen wurden jeweils mit Fluo-Puffer angefertigt. Alle Inkubationsschritte fanden auf Eis im Dunkeln statt.

Auf eine 96-Loch-Platte wurden je Delle ca.  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pipettiert und die Zellen durch Zentrifugation (716 x g, 1min) pelletiert. Anschließend wurden die Zellpellets in den jeweiligen Antikörperlösungen resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde je Delle 150  $\mu$ l Fluo-Puffer zugegeben und die Zellen zentrifugiert (s.o., Waschschrift). Danach wurden die Zellen mit je 40  $\mu$ l sekundärer Antikörperlösung (anti-Maus-Ig-FITC) für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die gefärbten Zellen in 150  $\mu$ l Fluo-Puffer resuspendiert und zur Messung jeweils in ein Probenröhrchen<sup>9</sup> mit 150  $\mu$ l Fluo-Puffer überführt. Die Lebend-Tot-Färbung erfolgte unter Zugabe von je 10  $\mu$ l PI je Röhrchen.

### 4.10.3 Doppelfärbung

Für Doppelfärbungen wurde jeweils eine Kombination primäre Antikörper unterschiedlicher Isotypen verwendet und verschieden markierte Sekundäantikörper verwendet.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst mit 50  $\mu$ l eines Gemischs aus beiden Primäantikörpern inkubiert und nach dem Waschschrift je 40  $\mu$ l eines Gemischs beider sekundärer, isotypspezifischen Sekundäantikörper zugegeben. Die Messung erfolgte ohne die Lebend-Tot-Färbung wie unter 4.10.2 beschrieben.

### 4.10.4 Fixierung

Um die Proben zu fixieren, wurden zu je 300  $\mu$ l Probe jeweils 100  $\mu$ l PFA 4% zugegeben und die Probe dunkel im Kühlschrank gelagert.

### 4.10.5 Zytoplasmatische und Zelloberflächen-Doppelfärbung

Zunächst wurde eine normale Einfachfärbung mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. Danach wurden die Zellen in je 200 µl FACS-Lysing-solution aufgenommen und bei RT 10min inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit 50 µl einer Mausserumverdünnung (1:20) inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen, in 100 µl FACS-Permeabilisation-solution resuspendiert und für weitere 10min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Fluo-Puffer erfolgte dann die zytoplasmatische Färbung. Dazu wurden die Zellen für 30min mit dem Primärantikörper auf Eis inkubiert und nach Ablauf der Zeit nach Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer nochmals für 5min inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift und die Zugabe von 40 µl PE-markiertem Sekundärantikörper. Nach erneuter Inkubation für 20min wurde erneut Fluo-Puffer zugegeben und für 5 weitere Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Fluo-Puffer konnten die Zellen gemessen werden.

## 4.11 B-Zellseparation mittels MACS®

Die vorliegende Arbeit enthält einige Versuche, die mit reinen B-Zellkulturen durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurden die B-Zellen einer Einfachfärbung unterzogen und mit anti-FITC-beschichteten magnetischen Beads inkubiert. Mittels eines Magneten war nun die Separation der B-Zellen aus der Lymphozytensuspension möglich.

### 4.11.1 Material

#### Standardmedium

#### Medium 5% FBS

25 ml	FBS
5 ml	Penicillin/Streptomycin
ad 500 ml	RPMI

Antikörper:

Anti-L-Kette

Anti-Maus-Ig-FITC

MACS anti-FITC-Microbeads<sup>16</sup>MACS-Separation-Column LS<sup>16</sup>

#### 4.11.2 Durchführung

Zunächst wurde eine Milzlymphozytenpräparation, wie sie unter 4.2.3. beschrieben ist, eine angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass Ansätze verwendet wurden, deren Viabilität über 90% lag, da einerseits die erhaltene B-Zellsuspension zur Weiterkultivierung bestimmt war und das unspezifische Binden toter Zellen an die Säule verhindert werden sollte.

$5 \times 10^8$  Zellen wurden anschließend in einem 50 ml Röhrchen mittels Zentrifugation ( $4^\circ\text{C}$ ,  $225 \times g$ , 10min) pelletiert in  $500 \mu\text{l}$  /  $1 \times 10^7$  Zellen anti-L-Kette-Antikörperlösung resuspendiert und für 25min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Röhrchen mit 5% FBS-Medium aufgefüllt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit  $50 \mu\text{l}$  anti-Maus-Ig-FITC /  $1 \times 10^7$  Zellen für weitere 20min auf Eis inkubiert und nach Ablauf der Zeit erneut gewaschen. Danach wurden die Zellen in je  $90 \mu\text{l}$  Medium /  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und mit je  $10 \mu\text{l}$  MACS-anti-FITC-Microbeads für 15min im Kühlschrank inkubiert.

Während dieser Zeit wurde die Säule in den Magneten eingespannt und mit 3 ml Medium vorbereitet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen und in 1 ml Medium /  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellsuspension in 2 ml Fraktionen auf die Säule gegeben und je  $25 \mu\text{l}$  der Zellsuspension und des Durchlaufs als Probe zurückgestellt. Dann wurde die Säule 3x mit je 4 ml Medium gewaschen und letztlich die B-Zellen mit 5 ml Medium unter Verwendung eines Stempels eluiert; auch von der erhaltenen B-Zellsuspension wurden  $25 \mu\text{l}$  als Probe gewonnen. Nach Waschen der erhaltenen Zellsuspension konnten die B-Zellen für *in vitro* Experimente verwendet werden.

Die Reinheit der gewonnenen B-Zellfraktion konnte ohne weitere Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden; es fanden nur B-Zellsuspensionen mit einer Reinheit  $>95\%$  Verwendung.

## 4.12 *In vitro* Funktionstests

### 4.12.1 Bestimmung der Überlebensrate

#### 4.12.1.1 Material

rChCD40L<sup>13</sup>

Trypanblaulösung

Antikörper:

Anti-L-Kette

Anti-chB6 (AV20)

Anti-CD3

Anti-Maus-Ig-FITC

Propidiumjodid (PI)

#### 4.12.1.2 Durchführung

Um die biologische Funktion von rChCD40L zu überprüfen, wurden Lymphozytensuspensionen verschiedener Organe mit rChCD40L kultiviert und zu bestimmten Zeitpunkten die Zahl lebender B- und T-Zellen bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen der Lymphozytensuspensionen in je eine Delle einer 24-Loch-Platte gegeben und entweder mit Medium oder mit Medium und  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rChCD40L bei  $40^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  für 24 bis 72 h inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen in der Delle resuspendiert und in ein 15ml Röhrchen überführt. Die Delle wurde daraufhin mit PBS nachgespült und das Volumen mit den so erhaltenen restlichen Zellen ebenfalls in das Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden nun zentrifugiert und in 1ml Medium resuspendiert. Je  $10 \mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit  $10 \mu\text{l}$  Trypanblau versetzt und die Anzahl lebender Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde durch eine Einfachfärbung mit den entsprechenden Antikörpern und einer Lebend-Tot-Färbung durch PI die Frequenz lebender B- beziehungsweise T-Zellen bestimmt.

Die absolute Zahl lebender B- und T-Zellen ergab sich durch die Multiplikation der Anzahl lebender Zellen mit der jeweiligen Frequenz lebender B- beziehungsweise T-Zellen.

## 4.12.2 Bestimmung der Proliferation

### 4.12.2.1 Material

rChCD40L13

PMA (Phorbol-12-myristat -13-azetat)<sup>1</sup>

[<sup>3</sup>H]-Thymidin<sup>17</sup>

### 4.12.2.2 Durchführung

Auf eine 96-Loch-Flachbodenplatte<sup>9</sup> wurden jeweils 100 µl/Delle einer Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingesetzt und mit Standardmedium (Lymphozytensuspension) oder B-Zellmedium (gereinigte B-Zellen) mit und ohne 1 µg/ml rChCD40L inkubiert. Als Positivkontrolle wurden den Zellen 20 ng/ml PMA zugegeben. Zellen aus der Bursa wurden für 24 h, Zellen aus der Milz für 48 h kultiviert und anschließend pro Delle je 20 µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin (0,5 µCi/ml per Delle) gepulst. Danach wurden die Platten für weitere 16 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Platten bei -20°C eingefroren.

Um die Platten auszuwerten, wurden sie zunächst bei 37°C 30min inkubiert und die Zellen mit einem Harvester<sup>18</sup> auf eine Glasfaserplatte<sup>18</sup> überführt. Diese wurde dann bei 80°C getrocknet und anschließend in eine Multiscreen<sup>18</sup>-Platte eingespannt. Nun wurden in jede Aussparung je 20 µl Microscint<sup>18</sup> pipettiert und die Platte mit einer Folie versiegelt. Die Messung des eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidin wurde mithilfe eines Szintillationsmessers (Topcount)<sup>18</sup> bestimmt.

### 4.12.3 Generierung antigen-spezifischer Antikörper

#### 4.12.3.1 KLH-immunisierte Hühner

Um die Produktion von spezifischen Antikörpern zu überprüfen, wurden Hühner vor der Milzentnahme mit KLH<sup>19</sup> (Keyhole limpet hemocyanin) immunisiert. Dazu wurden drei 6-8 Wochen alte Hühner der Linie M11 mit je 100 µg KLH/kg in PBS i.v. immunisiert und nach 6 Tagen zum Zweck der Milzgewinnung geschlachtet als Kontrolle dienten drei Tiere, die nur PBS injiziert bekamen.

Die Genehmigung der Immunisierung erfolgte durch die Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531.6-1412001.

#### 4.12.3.2 Durchführung

Um spezifische Antikörper *in vitro* zu generieren, wurden 6-8 Wochen alte Hühner immunisiert (s. 4.1.2.) und nach Milzentnahme die Milzlymphozyten gewonnen. Als Negativkontrolle dienten Milzen von nichtimmunisierten Hühnern. Anschließend wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen pro Delle in einer 48-Loch-Platte nach folgendem Schema kultiviert: die Zellen wurden entweder mit 0,5 µg/ml rChCD40L oder nur mit Medium inkubiert. Die Kulturen wurden alle 3 Tage nach dem unter 4.3.2.2.2. beschriebenen Schema 1:2 geteilt und bis Tag 6 weiterkultiviert. Der gewonnen Überstand wurde sofort bei -20°C eingefroren und später im anti-KLH-ELISA (4.7.3.) auf KLH-spezifische Antikörper untersucht.

## 5 Ergebnisse

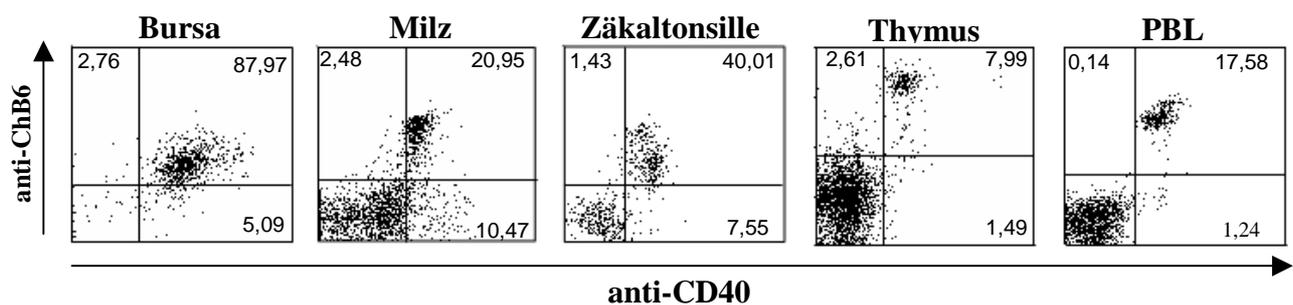
### 5.1 Expression von CD40

Bevor mit dem rekombinanten Zytokin verschiedene Funktionsassays durchgeführt wurden, wurde zunächst die Verteilung des zugehörigen Rezeptors, CD40, für primäre lymphatische Zellen des Immunsystems sowie verschiedene Zelllinien untersucht. Dadurch konnte ein erster Eindruck über die durch das CD40-CD40L-System beeinflussten Zellpopulationen gewonnen werden.

#### 5.1.1 Expressionsmuster von CD40 für primäre Lymphozyten

##### 5.1.1.1 B-Zellen

Im Mausmodell sind B-Zellen die Haupteffektorzellen des adaptiven Immunsystems für das CD40-CD40L-System. Daher wurde die Expression von CD40 zunächst für B-Zellen verschiedener Organe bestimmt.



**Abbildung 5.1: CD40 Expression auf bursalen und peripheren B-Zellen**

Lymphozyten der angegebenen Organe wurden jeweils mittels Dichtezentrifugation präpariert, gegen CD40 und chB6 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Die jeweils rechten Quadranten zeigen die CD40<sup>+</sup> Zellen, die oberen Quadranten geben die B-Zellpopulation wieder. Doppelt positive Zellen, also CD40<sup>+</sup> B-Zellen, werden im jeweils rechten oberen Quadranten angezeigt.

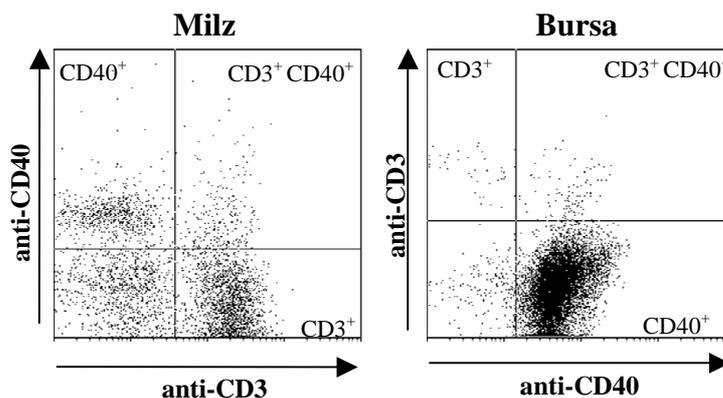
Zu diesem Zweck wurden wie unter 4.2. beschrieben Lymphozytensuspensionen aus Bursa, Milz, Zäkaltonsillen, Thymus und Blut gewonnen und einer Doppelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen chCD40 und chB6, einem B-Zellmarker, zugeführt.

Abb. 5.1 zeigt deutlich, dass nahezu alle chB6<sup>+</sup> Zellen gleichzeitig positiv für CD40 waren und damit jede B-Zellpopulation unabhängig von dem untersuchten Organ CD40<sup>+</sup> ist. Darüber hinaus lassen diese Daten den Schluss zu, dass B-Zellen unabhängig von ihrer Entwicklungsstufe CD40 exprimieren, da sowohl B-Zellen der Bursa, einem primären lymphatischen Organ, als auch B-Zellen aus peripheren lymphatischen Organen (Milz, Blut, Zäkaltonsille, Thymus) CD40 exprimieren.

### 5.1.1.2 T-Zellen

Zusammen mit den B-Zellen stellen T-Zellen die größte Zellpopulation der erworbenen Immunantwort dar. Daher wurden auch die T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression des CD40-Antigens untersucht.

Obwohl bislang keine CD40 Expression für Hühner-T-Zellen beschrieben wurde, ließen sich in den mit CD3 als spezifischen Pan-T-Zellmarker durchgeführten Doppelfärbungen interessanterweise jeweils Subpopulationen von CD40<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren (Abb. 5.2).



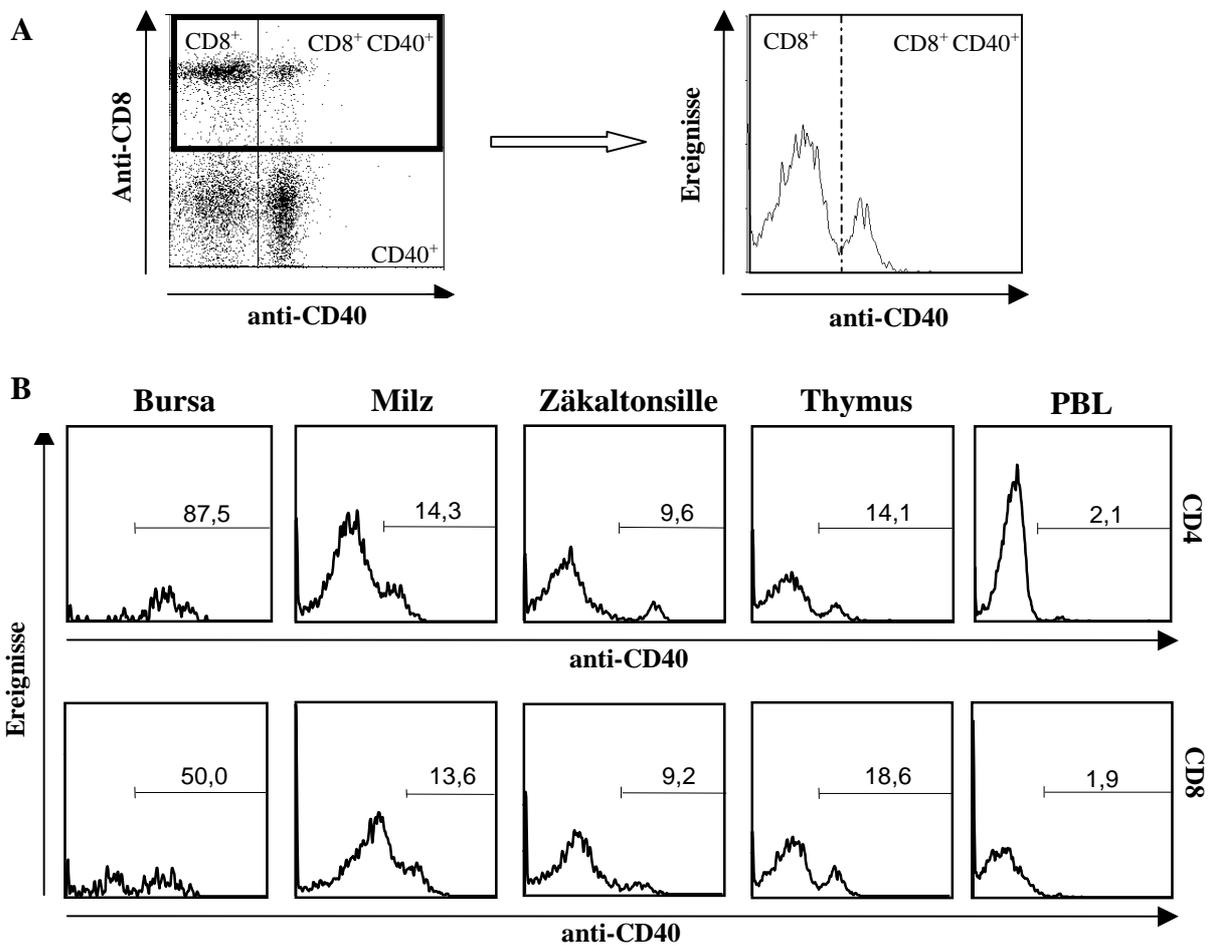
**Abbildung 5.2: CD40<sup>+</sup> T-Zellen in einer CD3-Färbung**

Lymphozyten aus Bursa und Milz wurden präpariert und nach einer Doppelfärbung gegen den Pan-T-Zellmarker CD3 und CD40 im Durchflusszytometer analysiert.

Um diese Zellen weitergehend zu untersuchen wurden weitere Doppelfärbungen mit Lymphozytensuspensionen verschiedener lymphatischer Organe unter der Verwendung spezifischer Antikörper für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt, um festzustellen, ob

bezüglich der CD40-Expression ein Unterschied zwischen T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) besteht (Abb.5.3).

Dabei zeigte sich, dass sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Thymus, Zäkaltonsillen und Blut jeweils zu 3-12% CD40<sup>+</sup> sind. Eine größere CD40<sup>+</sup> Subpopulation ließ sich jeweils in der Milz finden: hier exprimierten ca. 15% der zytotoxischen und T-Helferzellen CD40. Besondere Verhältnisse liegen in der Bursa vor: Obwohl die T-Zellen in diesem Organ mit 3-5% eine sehr kleine Zellpopulation darstellen (siehe Tab.5), sind jedoch nahezu alle T-Helferzellen (89,3%) und mehr als die Hälfte der CD8<sup>+</sup> Zellen (65,8%) CD40 positiv.



**Abbildung 5.3: Frequenz CD40<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen**

Abbildung B zeigt jeweils die CD40<sup>+</sup> Subpopulation innerhalb der CD4- und CD8-positiven T-Zellen eines Tieres. Dazu wurden in den Doppelfärbungen die genannten T-Zellpopulationen ausgewählt (hervorgehobene Quadranten) und deren CD40<sup>+</sup> Subpopulation mittels eines Histogramms dargestellt (A).

Für jedes Organ ist ein repräsentativer Datensatz aus mind. 3 Färbungen abgebildet (B).

	CD4 <sup>+</sup>	%CD40 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	%CD40 <sup>+</sup>
<b>Bursa</b>	3,0 (+/- 1,4)	89,3 (+/- 10,1)	4,7 (+/- 2,3)	65,8 (+/- 25,1)
<b>Milz</b>	23,6 (+/- 1,4)	16,1 (+/- 3,2)	36,7 (+/- 5,3)	15,3 (+/- 3,4)
<b>Zäkaltonsille</b>	22,3 (+/- 0,8)	9,7 (+/- 2,3)	15,0 (+/- 7,2)	12,4 (+/- 3,6)
<b>PBL</b>	20,8 (+/- 3,0)	2,9 (+/- 0,6)	13,1 (+/- 4,3)	3,1 (+/- 1,6)
<b>Thymus</b>	63,9 (+/- 17,21)	2,9 (+/- 0,5)	70,8 (+/- 16,5)	3,2 (+/- 1,0)

**Tabelle 5: Prozentualer Anteil der CD40<sup>+</sup> Subpopulationen T-Zellpopulationen**

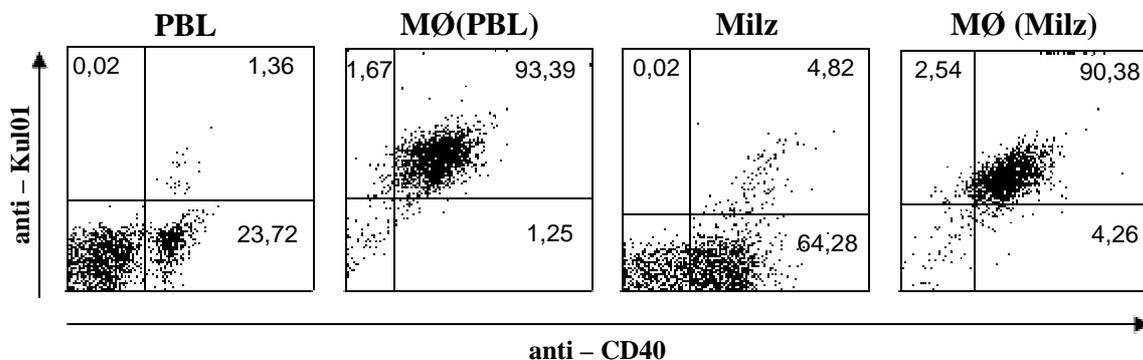
Lymphozyten verschiedener Organe wurden in einer Doppelfärbung mit einem CD4 bzw. CD8 und dem CD40 spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Anschließend wurden die prozentualen Anteile der CD40<sup>+</sup> Zellen in den CD4- und CD8-positiven T-Zellpopulationen ausgehend von der jeweiligen Frequenz bestimmt.

Die Zahlen stellen Mittelwerte von je 3 Tieren dar, darunter ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

### 5.1.1.3 Myeloide Zellen

Neben den B-Zellen sind die dem angeborenen Immunsystem zugehörigen myeloiden Zellen im Maussystem ebenfalls als CD40<sup>+</sup> beschrieben worden.

Um zu überprüfen, ob dies auch für myeloide Zellen des Huhns zutrifft, wurden im Folgenden daher sowohl Monozyten als auch Makrophagen aus Blut und Milz auf die Expression von CD40 getestet. Dazu wurden wiederum Lymphozytensuspensionen gewonnen und entweder sofort einer Zweifachfärbung mit einem Marker für Monozyten und Makrophagen (Kul01) unterzogen oder zur Makrophagengewinnung (s. 4.3.2.3.) in Kultur genommen. Die so generierten Makrophagen wurden im Anschluss ebenfalls der Doppelfärbung zugeführt.



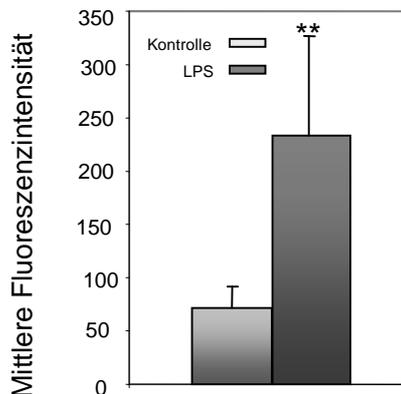
**Abbildung 5.4: Expression von CD40 auf Monozyten und Makrophagen aus Blut und Milz**

Gezeigt sind jeweils die Doppelfärbungen der präparierten Lymphozyten aus jedem Organ (PBL, Milz) sowie die daraus gewonnen Makrophagen. Diese wurden durch 48 h Kultur mit anschließender Entfernung der restlichen Lymphozyten durch Spülen mit PBS gewonnen.

Wie Abb.5.4 zu entnehmen ist, sind auch aus Blut und Milz gewonnene Monozyten sowie Makrophagen jeweils als CD40<sup>+</sup> Zellen anzusprechen.

Des Weiteren wurde auch die Induzierbarkeit von CD40 auf Milzmakrophagen untersucht. Dazu wurden Milzmakrophagen von drei verschiedenen Tieren präpariert und mit 1 µg/ml LPS für 48 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem CD40 spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Mittels der Durchflusszytometrie kann nicht nur die Frequenz von Zellpopulationen gemessen werden, sondern es können auch Aussagen über die Häufigkeit von Antigenen auf der Zelloberfläche gemacht werden, da das Gerät neben der Zellfrequenz auch die Intensität der Fluoreszenz jeder Zelle detektiert. Da diese umso größer ist, je mehr sekundärer Antikörper und damit auch primärer Antikörper gebunden hat, hängt somit die Fluoreszenzintensität direkt proportional von der Anzahl der Antigene ab und ist somit als Parameter für die Expression geeignet.

Abb. 5.5 zeigt deutlich, dass die Expression von CD40 auf der Zelloberfläche von Milzmakrophagen durch Stimulation mit LPS noch weiter gesteigert werden kann, da eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz zu beobachten war.



**Abbildung 5.5: LPS-induzierte CD40-Expression**

Zur Bestimmung der CD40-Expression wurden Milzmakrophagen 48 h mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD40 gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität der Färbung im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 Tieren.

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

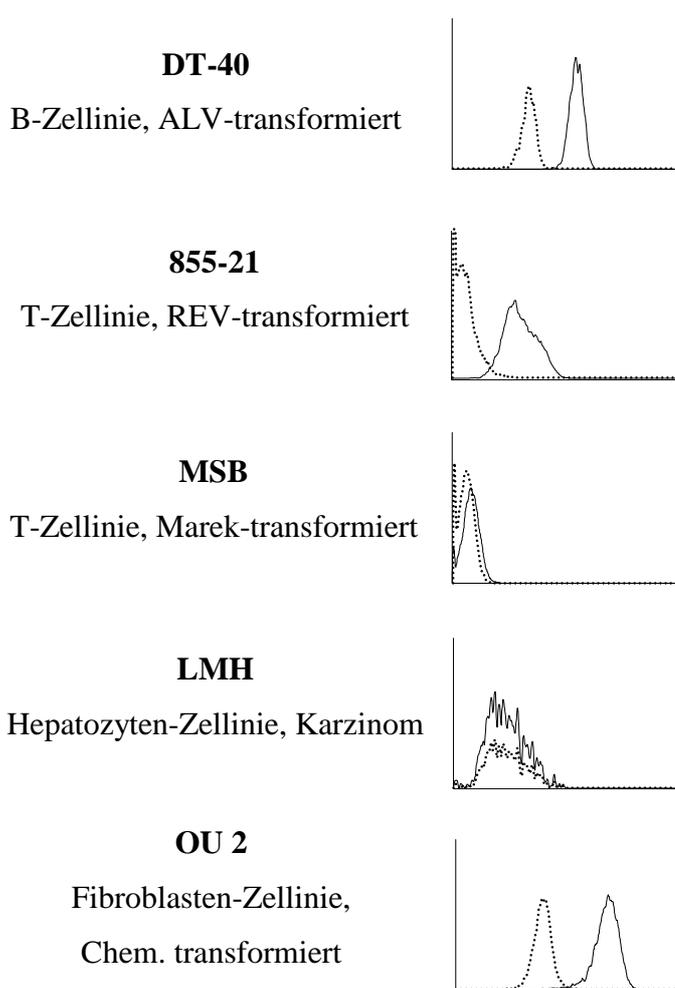
#### 5.1.1.4 Zelllinien

Da es für die folgenden Funktionsstudien von großem Vorteil wäre, statt auf primären Zellen auf ständig verfügbare Zellen zurückgreifen zu können und um ein möglichst vollständiges Bild über die Expression von CD40 im Huhn zu erlangen, wurden zusätzlich verschiedene Zelllinien ebenfalls mit dem CD40 spezifischen Antikörper gefärbt.

Wie aufgrund der Daten der primären B-Zellen zu erwarten war, erwiesen sich die Zellen der bursalen B-Zelllinie DT40 als vollständig CD40<sup>+</sup>. Darüber hinaus wurden auch zwei T-Zelllinien auf ihre CD40-Expression hin untersucht. Die T-Zelllinie MSB erwies sich analog

zum Mausmodell als CD40<sup>-</sup>, wohingegen für die Zellen der Linie 855-21 eine Expression von CD40 nachgewiesen werden konnte.

Neben lymphatischen Zelllinien wurden auch zwei weitere Zelltypen mit dem spezifischen Antikörper gefärbt, da auch eine Expression des Rezeptors innerhalb dieser Zellen für Säuger beschrieben ist. Dabei stellten sich Zellen der embryonalen Fibroblastenzelllinie OU 2 als CD40<sup>+</sup> dar, während die Leberzelle LMH keinerlei Hinweise auf eine Expression von CD40 erkennen ließ.



**Abbildung 5.6: Expression von CD40 in verschiedenen Zelllinien**

Zellen verschiedener Zelllinien wurden in Kultur genommen, einer Einfachfärbung mit dem spezifischen Antikörper für CD40 (AV79) unterzogen und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Y-Achse gibt die Zellzahl, die X-Achse die mittlere Fluoreszenzintensität der CD40-Färbung wieder. Gepunktete Linien zeigen die Kontrollfärbung, durchgezogene Linien stellen die CD40-Färbung dar.

## 5.2 Biologische Funktionen

Durch die Doppelfärbungen konnten neben den myeloiden Zellen und einer T-Zellsubpopulation vor allem B-Zellen als CD40 exprimierende Zellen identifiziert werden.

Nun wurde die biologische Funktion der CD40-CD40L-Interaktion in einer Reihe von Kurzzeitexperimenten *in vitro* weiter untersucht.

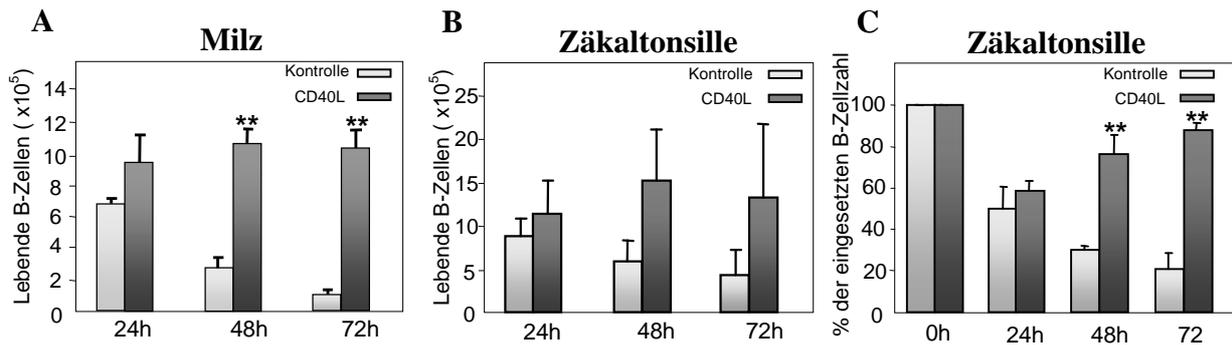
### 5.2.1 Überleben

Zunächst wurde der Effekt von rChCD40L auf die Überlebensrate untersucht. Dafür wurden Lymphozyten aus Bursa, Milz und Zäkaltonsille gewonnen und auf einer 24-Loch-Platte in Kultur genommen. Diese Ansätze wurden nun für 72 h mit 0,5 µg/ml rChCD40L stimuliert, als Negativkontrolle dienten unstimulierte Ansätze (Mediumkontrolle). Anschließend wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Zellen von der Platte genommen und die Zellzahl lebender Zellen sowie die Frequenz verschiedener Zellpopulationen bestimmt. Die absolute Zellzahl der einzelnen Populationen wurde dabei aus der absoluten Zellzahl und der jeweiligen Frequenz berechnet.

#### 5.2.1.1 B-Zellen

Das Hauptaugenmerk dieser Versuche lag auf den B-Zellen, da CD40L in deren Entwicklung eine essentielle Rolle zukommt und diese Population schon in frühen Entwicklungsstadien CD40 exprimiert.

Aus Milz und Zäkaltonsillen gewonnene, unstimulierte B-Zellansätze zeigten eine deutliche Abnahme lebender B-Zellen (Abb. 5.7): ausgehend von  $7 \times 10^5$  lebenden B-Zellen nach 24 h in Kultur sank ihre Zahl konstant; nach 72 h waren nur noch  $1 \times 10^5$  lebende B-Zellen zu finden. Im Gegensatz dazu konnte in rChCD40L (0,5 µl/ml) stimulierten Ansätzen eine konstante Zahl von  $1 \times 10^6$  lebender B-Zellen nachgewiesen werden. Bei der Präparation der Zäkaltonsillen wurde für die Beurteilung zusätzlich eine prozentuale Darstellung der lebenden B-Zellen angefertigt (Abb. 5.7 C). Durch diese Art der Darstellung wird deutlich, dass es sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Ansätzen nach 24 h zu einem Verlust von lebenden B-Zellen kommt. Allerdings kann durch diese Darstellung auch für die Zäkaltonsille eine signifikante Steigerung der Überlebensrate von B-Zellen durch rChCD40L gezeigt werden, wobei nach 72 h in rChCD40L stimulierten Ansätzen noch ca. 90% der eingesetzten B-Zellen vital waren, während die Kontrollansätze ein kontinuierliche Abnahme lebender B-Zellen aufwiesen.



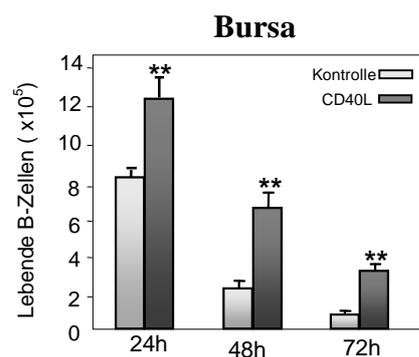
**Abbildung 5.7: Erhöhung der Zahl lebender B-Zellen durch rChCD40L**

Aus Milz und Zäkaltonsillen wurden jeweils die Lymphozyten präpariert und je  $5 \times 10^6$  Zellen mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rChCD40L oder ohne weitere Stimulation (Kontrolle) in Kultur genommen (A, B). Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der absoluten Zahl lebender B-Zellen durch die Kombination der Zahl lebender Zellen (Ausschluss toter Zellen mittels Trypanblau) und der Frequenz lebender B-Zellen (chB6<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) im Durchflusszytometer. Zusätzlich wurde für die Zäkaltonsille der Prozentsatz der lebenden B-Zellen ausgehend von der eingesetzten B-Zellzahl bestimmt (C).

Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

Neben den peripheren lymphatischen Organen wurden auch Lymphozyten der Bursa präpariert und in Gegenwart von rChCD40L kultiviert (Abb. 5.8). Die Zahl lebender B-Zellen zeigt, dass die Zugabe von rChCD40L die Abnahme der lebenden B-Zellen in den Kulturen nicht verhindern konnte, allerdings war in den stimulierten Ansätzen eine deutliche Steigerung der Zahl überlebender B-Zellen um das Dreifache (48 h) erkennbar.



**Abbildung 5.8: Lebende bursale B-Zellen in rChCD40L stimulierten Kulturen**

Primäre Bursalymphozyten ( $5 \times 10^6$ ) wurden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  rChCD40L oder ohne Stimulation (Kontrolle) in Kultur genommen und die absolute Zellzahl durch die Kombination der Anzahl lebender B-Zellen und der Frequenz lebender B-Zellen (chB6<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) bestimmt (s. Abb. 5.6).

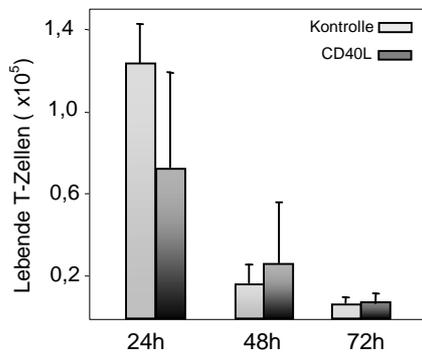
Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

### 5.2.1.2 T-Zellen

Da durch die Färbungen mit dem CD40-spezifischen Antikörper AV79 auch einige T-Zellen als CD40 exprimierende Zellen identifiziert werden konnten, wurde der Effekt von

rChCD40L auf die Überlebensrate von T-Zellen der Milz aus Frequenz lebender T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/PI) und der Zahl lebender Zellen (Trypanblau) bestimmt.



**Abbildung 5.9: Lebende T-Zellen in rChCD40L-stimulierten Milzlymphozytenkulturen**

Primäre Milzlymphozyten wurden mit 0,5 µg/ml rChCD40L oder ohne Stimulation (Kontrolle) in Kultur genommen und die absolute Zellzahl durch die Kombination der Anzahl lebender Zellen und der Frequenz der CD3<sup>+</sup> Zellen bestimmt (s. Abb. 5.8).

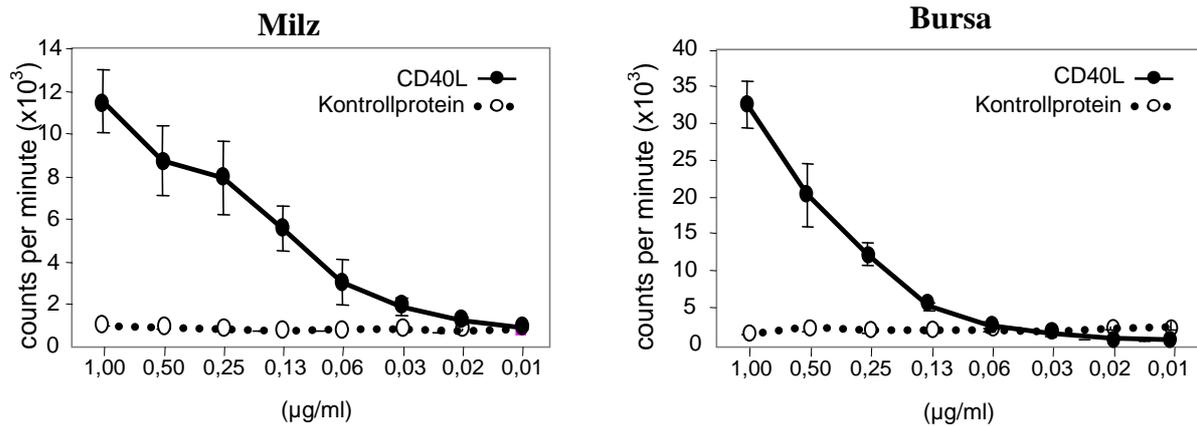
Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

Wie Abb. 5.9 zeigt, nimmt die Zahl lebender T-Zellen im Gegensatz zu der Anzahl lebender B-Zellen sowohl in stimulierten Ansätzen als auch in den Mediumkontrollen über den Zeitraum von 72 h kontinuierlich ab. Somit ist kein Effekt von rChCD40L auf T-Zellen nachweisbar.

### 5.3 Proliferation

Der Effekt einer Erhöhung der Zahl lebender Zellen kann sowohl auf einer verlängerten Lebensdauer der einzelnen Zelle als auch auf der Induktion von Proliferation beruhen, daher wurde die Fähigkeit von rChCD40L Proliferation zu induzieren untersucht.

Um festzustellen, ob rChCD40L in der Lage ist, Proliferation in B-Zellen zu induzieren, wurden Lymphozyten aus Milz und Bursa (je 3 Tiere) gewonnen und für 24 h (Bursa) bzw. 48 h (Milz) mit verschiedenen Konzentrationen rChCD40L inkubiert. Zusätzlich fand in den Kontrollansätzen dieses Experiments ein weiteres rChCD40L Protein (Kontrollprotein), welches durch die Deletion einer Aminosäure über keinerlei biologische Funktion verfügt, Verwendung, um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt generell durch die Zugabe von Fremdprotein induziert wird. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von [<sup>3</sup>H]-Thymidin (0,5 µCi/ml per Delle), welches bei der Neusynthese von DNA in diese eingebaut wird und somit die Messung der Proliferationsrate mit einem Szintillationsmessgeräts ermöglicht.



**Abbildung 5.10: Dosisabhängige Proliferation von Lymphozyten durch rChCD40L**

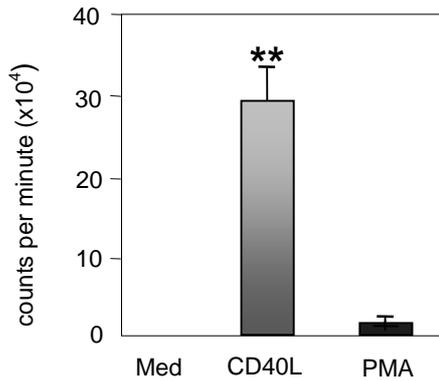
Aus Milz und Bursa wurden primäre Lymphozyten gewonnen und für 24 h (Bursa) bzw. 48 h (Milz) mit den angegebenen Konzentrationen rChCD40L oder dem Kontrollprotein inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von [<sup>3</sup>H]-Thymidin und weitere 16 h Inkubation. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Proliferationsrate mittels eines Szintillationsmessgeräts bestimmt.

Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unterschiedlichen Tieren sowie die Standardabweichungen.

Wie Abb. 5.10 zeigt, war sowohl in stimulierten Ansätzen von Milz als auch denen der Bursa ein deutlicher proliferativer Effekt erkennbar, welcher bei einer Dosis von 1 µg/ml rChCD40L mit einem Wert von 12x10<sup>3</sup> Counts für die Milz und 33x10<sup>3</sup> Counts für bursale Lymphozyten am stärksten ausgeprägt war. Die Ansätze mit dem Kontrollprotein wiesen im Gegensatz dazu keinerlei Proliferation auf.

Da diese Ansätze gemischte Lymphozytensuspensionen enthielten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Lymphozyten, im speziellen CD40<sup>+</sup> T-Zellen, auf rChCD40L reagieren. Um zu beweisen, dass es sich bei den proliferierenden Zellen ausschließlich um B-Zellen handelte, wurden Milz-B-Zellen unter Verwendung eines L-Ketten-Antikörpers über MACS-Säulen aufgereinigt. Anschließend wurden die B-Zellsuspension (>95% Reinheit) von drei Tieren nach dem oben beschriebenen Schema in Kultur genommen und mit 1µg/ml rChCD40L stimuliert. Zusätzlich wurde eine Stimulation mit 20 ng/ml PMA vorgenommen, welches als Positivkontrolle diente. Wie Abb. 5.11 zeigt, konnte eine Steigerung des proliferativen Effekts beobachtet werden, welcher im Vergleich zu den gemischten Lymphozytensuspensionen mit 300x10<sup>3</sup> Counts eine ca. zehnfach höhere Proliferationsrate zur Folge hatte.

Die Stimulation mit rChCD40L wirkt demnach spezifisch auf B-Zellen und induziert deren Proliferation dosisabhängig.



**Abbildung 5.11: rChCD40L-induzierte Proliferation in gereinigten B-Zellsuspensionen**

Gereinigte B-Zellen wurden jeweils als Triplikate mit 1 µg/ml rChCD40L, ohne Stimulation (Kontrolle) oder mit 20 ng/ml PMA (Positivkontrolle) für 48 h in Kultur genommen und anschließend mit 20 µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin versehen. Danach erfolgte die Auswertung mittels eines Szintillationsmessgeräts.

Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

## 5.4 Aktivierung von B-Zellen

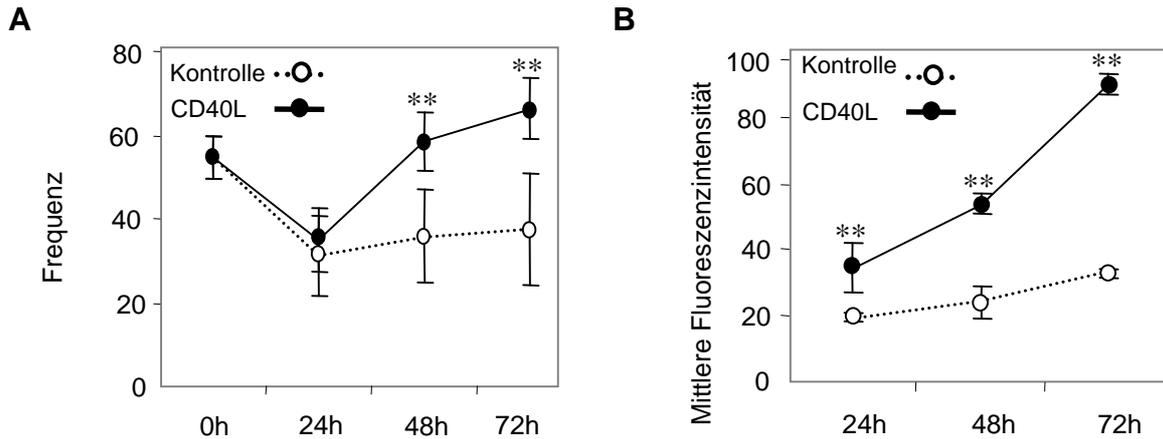
Aus dem Säugersystem ist bekannt, dass die Stimulation mit CD40L zu einer Aktivierung der B-Zellen führt. Die Folge ist neben einer Größenzunahme auch eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die Sekretion von Zytokinen durch die betreffenden Zellen.

Da die Stimulation mit rChCD40L analog zum Säugermodell in der Lage war, in den Kurzzeitkulturen B-Zellproliferation zu induzieren, wurden mit der Expression von MHCII-Molekülen und der Sekretion von IL-6 auch zwei Parameter für die Aktivierung von B-Zellen bestimmt.

### 5.4.1 Expression von MHCII

Den ersten Schritt stellten Untersuchungen zur MHCII-Expression dar. Diesem Molekül kommt eine wichtige Rolle in der erworbenen Immunantwort zu, da dessen Hauptaufgabe die Präsentation von Antigen ist und es somit essentiell für die Initiierung der T-Zellhilfe ist.

Um den Einfluss von rChCD40L auf primäre Hühner-B-Zellen zu bestimmen, wurden zunächst wieder Lymphozytensuspensionen aus Zäkaltonsillen präpariert und die gewonnenen Zellen für 72 h mit je 0,5 µg/ml rChCD40L in Kultur genommen; als Kontrollansätze dienten unstimulierte Zellkulturen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen entnommen und mit LD42, einem MHCII-spezifischen Antikörper, gefärbt sowie die Frequenz sowie die Fluoreszenzintensität der MHCII<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

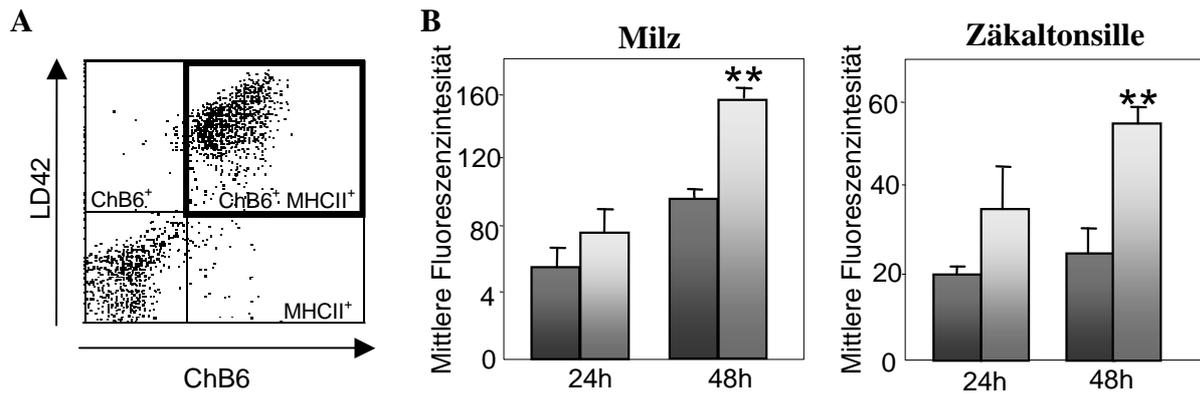


**Abbildung 5.12: rChCD40L-induzierte MHCII-Expression von Lymphozyten**

Lymphozytensuspensionen aus Zäkaltonsillen wurden mit und ohne rChCD40L-Stimulation (0,5 µg/ml) in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten die Frequenz MHCII<sup>+</sup> Zellen (A) und die mittlere Fluoreszenz (B) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren. \*\*/\*: diese Werte sind signifikant unterschiedlich (\* P<0,05 \*\* P<0,01; T-Test)

Abbildung 5.12 A zeigt deutlich, dass durch die Zugabe von rChCD40L eine Zunahme der MHCII<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden konnte. Dies spiegelt gleichzeitig die Steigerung der B-Zellzahl in diesen Kulturen wieder, da B-Zellen MHCII<sup>+</sup> sind. Gleichzeitig war jedoch auch eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität der CD40L-stimulierten Ansätze im Vergleich zu den Kontrollansätzen festzustellen (Abb. 5.12 B).

Um nachzuweisen, dass in diesen gemischten Lymphozytensuspensionen tatsächlich die B-Zellen diejenigen Zellen sind, welche die MHCII-Expression auf ihrer Zelloberfläche auf rChCD40L-Stimulation hin erhöhen, wurden Doppelfärbungen unter Verwendung eines MHCII-spezifischen Antikörpers und eines gegen chB6 gerichteten B-Zellmarker (AV20) durchgeführt. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der MHCII-Färbung der B-Zellen miteinander verglichen. Auch in diesen Versuchen zeigte sich eine deutliche Steigerung der MHCII-Expression in den rChCD40L-stimulierten Kulturen von Milz und Zäkaltonsille mit einem signifikantem Unterschied nach 48 h (Abb. 5.13). Somit konnte gezeigt werden, dass rChCD40L eine Zunahme an MHCII-Molekülen auf B-Zellen induziert.



**Abbildung 5.13: rChCD40L-induzierte Erhöhung der MHCII-Expression von B-Zellen**

Lymphozytensuspensionen aus Milz und Zäkaltonsillen wurden mit und ohne CD40L-Stimulation (0,5 µg/ml) in Kultur genommen und jeweils nach 24 h und 48 h einer Doppelfärbung mit MHCII- und B-Zellspezifischen (chB6) Antikörpern unterzogen (A). Die Balken zeigen jeweils die mittlere Fluoreszenz der MHCII-positiven B-Zellen (B).

Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

### 5.4.2 Sekretion von IL-6

Einen weiteren Parameter für die Aktivierung von Zellen stellt die Sekretion von Zytokinen dar. Für die B-Zellen ist hierbei vor allem die IL-6-Sekretion zu erwähnen. Diese kann mithilfe eines Bioassays zuverlässig nachgewiesen werden, welcher auf der Verwendung einer strikt IL-6 abhängigen murinen Zelllinie beruht und selbst geringste Mengen biologisch aktives IL-6 detektieren kann.

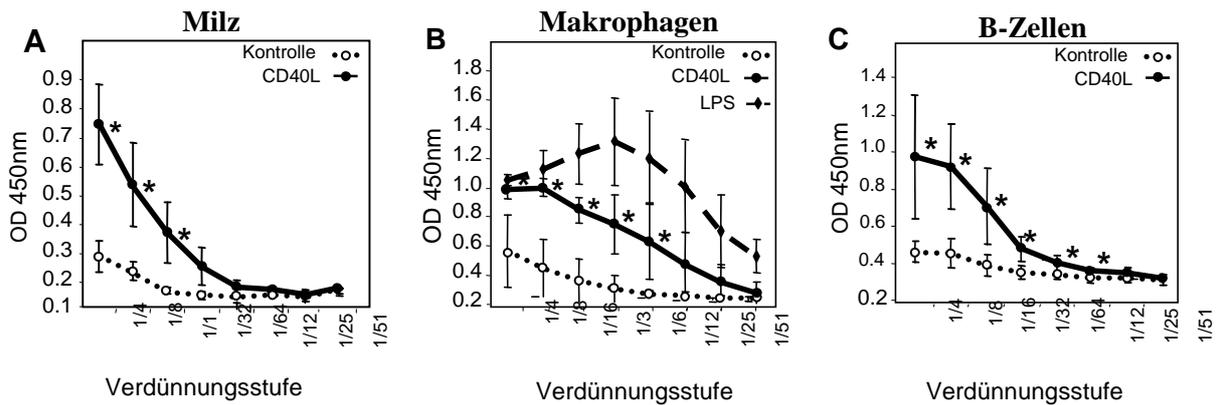
Zum Nachweis der IL-6 Sekretion wurden zunächst Lymphozytensuspensionen aus der Milz angefertigt und nach dem herkömmlichen Schema mit rChCD40L stimuliert. Nach der Gewinnung aller Proben wurde der IL-6 Assay wie unter 4.9. beschrieben durchgeführt. Wie Abbildung 5.14 A zu entnehmen ist, enthielten Zellkulturüberstände der stimulierten Lymphozyten signifikant mehr biologisch aktives IL-6 als die unstimulierte Kontrolle.

Um zu klären, welche Zellpopulation für die IL-6 Sekretion verantwortlich ist, wurden zum einen aus Milzlymphozyten Makrophagen gewonnen, zum anderen gereinigte B-Zellsuspensionen mit dem MACS-System (s.4.11) präpariert. Die Zellkulturüberstände dieser definierten Zellpopulationen wurden im Anschluss an 48 h Inkubation mit rChCD40L-Stimulation ebenfalls im Bioassay auf IL-6 getestet. Für die Makrophagenkulturen wurde darüber hinaus eine Positivkontrolle mit LPS-Stimulation (1 µg/ml) durchgeführt.

Die Auswertung der Bioassays für die Makrophagenkulturen (Abb. 5.14 B) zeigt die erwartete, deutliche Erhöhung der IL-6 Sekretion nach LPS-Stimulation, allerdings konnte die

Stimulation mit rChCD40L ebenfalls eine signifikante IL-6 Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen induzieren.

Dass auch die B-Zellen in der Lage sind, nach der Stimulation mit rChCD40L IL-6 zu sezernieren, konnte eindeutig durch die Analyse der Zellkulturüberstände der reinen B-Zellkulturen gezeigt werden: wie Abb. 5.14 C zeigt, ließ sich in reinen B-Zellkulturen ebenfalls eine signifikante IL-6 Sekretion nachweisen.



**Abbildung 5.14: IL-6-Sekretion in rChCD40L-stimulierten Kulturen**

Aus den Milzen 3 verschiedener Tiere wurden jeweils primäre Lymphozyten (A), gereinigte B-Zellsuspensionen (C) und Makrophagen (B) gewonnen und mit 0,5 µg/ml rChCD40L oder ohne Stimulation (Kontrolle) für 48 h in Kultur genommen. Für die Makrophagenkultur wurde zusätzlich eine Stimulation mit 1 µg/ml LPS für 48 h durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils die Zellkulturüberstände gewonnen und im unter 4.9. beschriebenen 7TD1-Assay auf IL-6 getestet.

Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

## 5.5 Etablierung von Langzeitkulturen

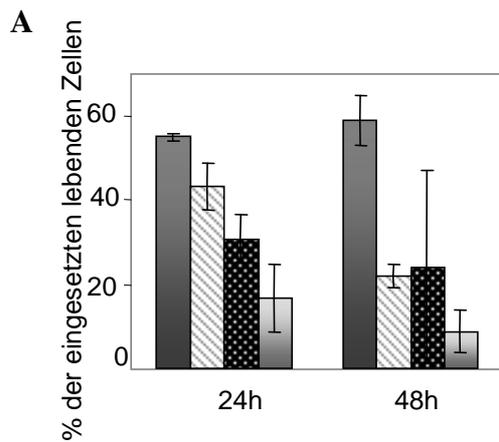
Alle bisherigen Ergebnisse wurden unter Verwendung von Kurzzeitkulturen bis maximal 72 h gewonnen. Allerdings lassen sich dadurch die Funktionen der B-Zellen nur bedingt studieren. So können z.B. nach 72 h keinerlei Aussagen über die Antikörpersekretion gemacht werden, da die Entwicklung von Plasmazellen mehrere Tage in Anspruch nimmt.

Um jedoch Einblick in die Entwicklung und Reifung der B-Zellen zu erhalten, bedurfte es der Etablierung eines Modells, welches es ermöglichte, auch solche langfristigen Untersuchungen anzustellen.

### 5.5.1 Optimierung des Zellkulturmediums

Um eine Langzeitkultur von primären Hühner-B-Zellen zu ermöglichen wurde zunächst eine Verbesserung des Zellkulturmediums vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden mehrere Medien hinsichtlich der besten Überlebensraten miteinander verglichen.

In einem ersten Versuch wurden das Standardmedium (RPMI+10% FBS), RPMI mit einem Zusatz von 5% FBS und 2% Hühnerserum, IMDM mit 10% FBS sowie ein spezielles B-Zellmedium (IMDM + 8% FBS + 2% ChSerum + 50 µl β-ME + Insulin/Selenit/Transferrin-Komplex) miteinander verglichen. Dafür wurden Bursalymphozyten, welche fast ausschließlich aus B-Zellen bestehen, präpariert und mit je 0,5 µg/ml rChCD40L in Kultur genommen. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils der Prozentsatz der noch lebenden Zellen ausgehend von der eingesetzten Zellzahl bestimmt. Abb.5.15 A zeigt deutlich, dass in den Ansätzen mit Standardmedium am wenigsten lebende Zellen zu finden waren, während in den Kulturen mit B-Zellmedium deren Zahl zwischen 24 h und 48 h nahezu konstant blieb.



**Abbildung 5.15: Einfluss verschiedener Kulturmedien auf das Überleben von B-Zellen**

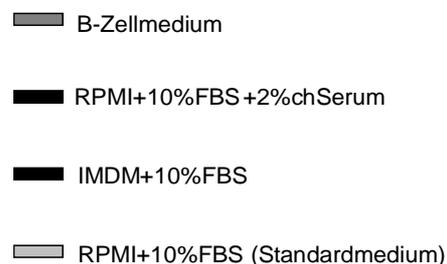
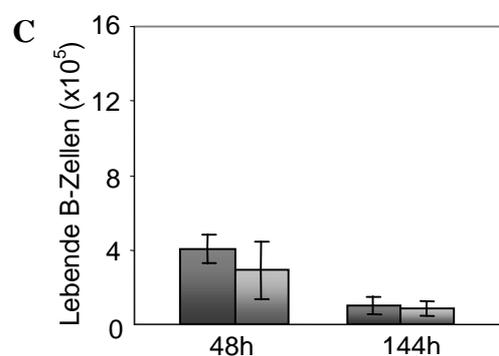
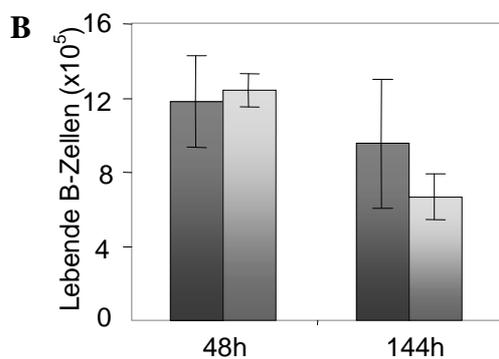
Bursale Lymphozytensuspensionen wurden nach ihrer Präparation in unterschiedlichen Medien mit jeweils 0,5 µg/ml rChCD40L kultiviert (A). Nach 24 h und 48 h wurde die absolute Zahl lebender Zellen durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Der Ausschluss toter Zellen wurde durch eine Trypanblaufärbung erzielt.

n=2

Zusätzlich wurden auch Milzlymphozyten mit Standardmedium und B-Zellmedium mit (B) und ohne rChCD40L (C) in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten die absolute Zellzahl lebender B-Zellen durch die Kombination der Zahl lebender Zellen (s.o.) und der Frequenz ChB6<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

n=3

Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung.



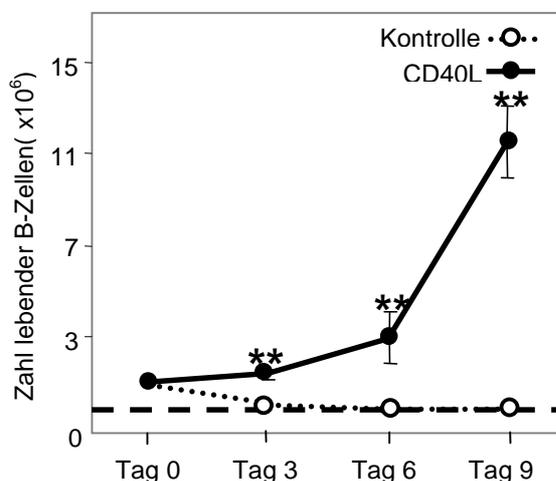
Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Kulturen mit Hühnerserumhaltigem Medium tendenziell mehr lebende Zellen enthielten, als Kulturen ohne chSerum-Zusatz.

Um auch den Einfluss auf periphere B-Zellen zu untersuchen, wurden Milzlymphozyten gewonnen und jeweils mit Standardmedium oder B-Zellmedium mit und ohne rChCD40L-Stimulation kultiviert. Nach 48 h und 144 h wurden die Zellen entnommen und die Zahl lebender B-Zellen bestimmt. Wie in Abb.5.15 B zu sehen ist, ist die Zahl lebender B-Zellen in stimulierten Kulturen für 48 h gleich, jedoch fällt ihre Zahl in Standardmediumkulturen nach 144 h deutlich ab. Im Gegensatz dazu ist die Abnahme der lebenden B-Zellen in den Ansätzen mit B-Zellmedium weniger deutlich ausgeprägt. Auch in den unstimulierten Kulturen (C) ist ein nach 48 h ein positiver Effekt des B-Zellmediums auf B-Zellen erkennbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Langzeitkulturen das beschriebene B-Zellmedium (BCM) verwendet.

### 5.5.2 Proliferation

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden nun bereits in Kurzzeitkulturen untersuchte Parameter in Langzeitkulturen bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der B-Zellproliferation wurden jeweils Lymphozytensuspensionen aus Milz und Zäkaltonsille präpariert, wie unter 4.3.2.2.2. beschrieben mit und ohne rChCD40L-Stimulation in Kultur genommen und die B-Zellfrequenz zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In beiden Versuchen zeigte sich eine signifikante Zunahme der B-Zellen über 9 Tage hinweg (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden Milzlymphozyten von drei unterschiedlichen Tieren präpariert und durch Präparation mit MACS jeweils eine reine B-Zellsuspension gewonnen.



**Abbildung 5.16: rChCD40L-induzierte B-Zellproliferation in reinen Milz-B-Zellkulturen**

Aus 3 verschiedenen Milzen wurden Lymphozyten gewonnen und mittels MACS jeweils gereinigte B-Zellsuspensionen gewonnen. Diese wurden nach der unter 4.3.2.2.1. beschriebenen Methode mit und ohne CD40L-Stimulation in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten gezählt. Der Ausschluss toter Zellen erfolgte mittels Trypanblaufärbung.

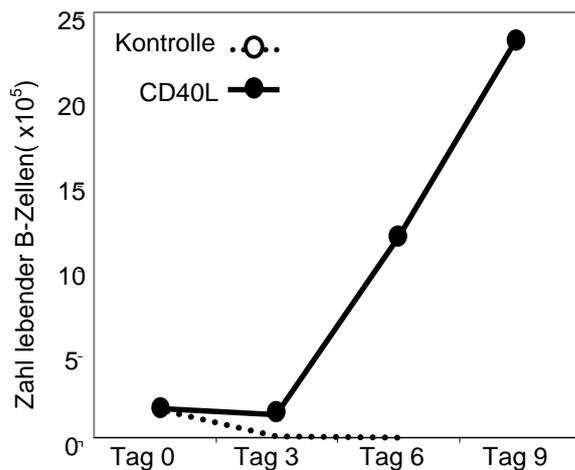
Die Abbildung zeigt jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Tieren.

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

Diese wurden in Kultur genommen und mit 0,5 µg/ml rChCD40L stimuliert. Nun wurden alle drei Tage sämtliche B-Zellen eines Ansatzes von der Platte entnommen und die absolute Zellzahl lebender B-Zellen bestimmt.

Wie in Abb.5.16 zu sehen ist, nahm die B-Zellzahl in den Kontrollansätzen bis Tag 6 kontinuierlich ab, danach waren keine lebenden B-Zellen mehr zu finden. Im Gegensatz dazu war eine nahezu exponentielle Zunahme der Zahl lebender B-Zellen in den rChCD40L-stimulierten Kulturen zu erkennen; an Tag 9 konnten mit  $12 \times 10^6$  ca. zehnmal so viele lebende B-Zellen gefunden werden, als zu Beginn der Kultur (Tag 0:  $1 \times 10^6$ ). Das Vorliegen eines organspezifischen Effekts konnte ausgeschlossen werden, da eine signifikante Zunahme der B-Zellzahl über neun Tage auch in gemischten Lymphozytenkulturen der Zäkaltonsille gezeigt werden konnte (Abb. 5.17).

Diese Daten konnten zeigen, dass rChCD40L bei permanenter Zugabe die Proliferation von B-Zellen bis zu neun Tagen induziert.



**Abbildung 5.17: rChCD40L-induzierte B-Zellproliferation der Zäkaltonsille**

Aus Zäkaltonsillen wurden Lymphozyten gewonnen und mit 0,5 µg/ml rChCD40L in Kultur genommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zahl lebender B-Zellen aus der durchflusszytometrisch bestimmten Frequenz lebender B-Zellen (chB6<sup>+</sup>/PI) und der Zahl lebender Zellen bestimmt.

Die Abbildung zeigt den repräsentativen Verlauf eines von 2 Experimenten.

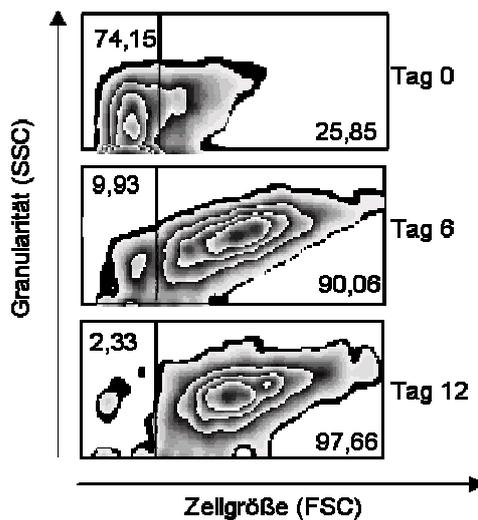
### 5.5.3 Phänotypisierung der B-Zellen

Neben der Bestimmung der Proliferationsrate wurde eine Phänotypisierung der B-Zellen in den Langzeitkulturen durchgeführt. Dazu wurde eine Reihe von durchflusszytometrischen Parametern wie die Zellgröße und die Expression von membrangebundenen sowie zytoplasmatischen Immunglobulinen untersucht, um mögliche Hinweise auf die rChCD40L induzierte beginnende B-Zellreifung zu erhalten.

### 5.5.3.1 Größenzunahme

Der erste untersuchte Parameter war die Größe der Zellen in den Langzeitkulturen. Die Größenzunahme der B-Zellen spiegelt dabei die Entwicklung von kleinen, ruhenden Lymphozyten zu großen, aktivierten Lymphoblasten wieder.

Dazu wurden gereinigte B-Zellen wie unter 4.3.2.2.2 beschrieben in Kultur genommen, mit 0,5 µg/ml rChCD40L stimuliert und die Zellgröße alle 6 Tage mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abb.5.18 zeigt den Verlauf der Größenentwicklung der B-Zellen: an Tag 0 bestand die B-Zellpopulation zu ca. 75% aus kleinen Zellen, im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch eine sprunghafte Größenzunahme des Großteils der B-Zellen (90,06%) bis hin zu einer mit 97,66% nahezu ausschließlich aus Lymphoblasten bestehenden Zellpopulation an Tag 12.



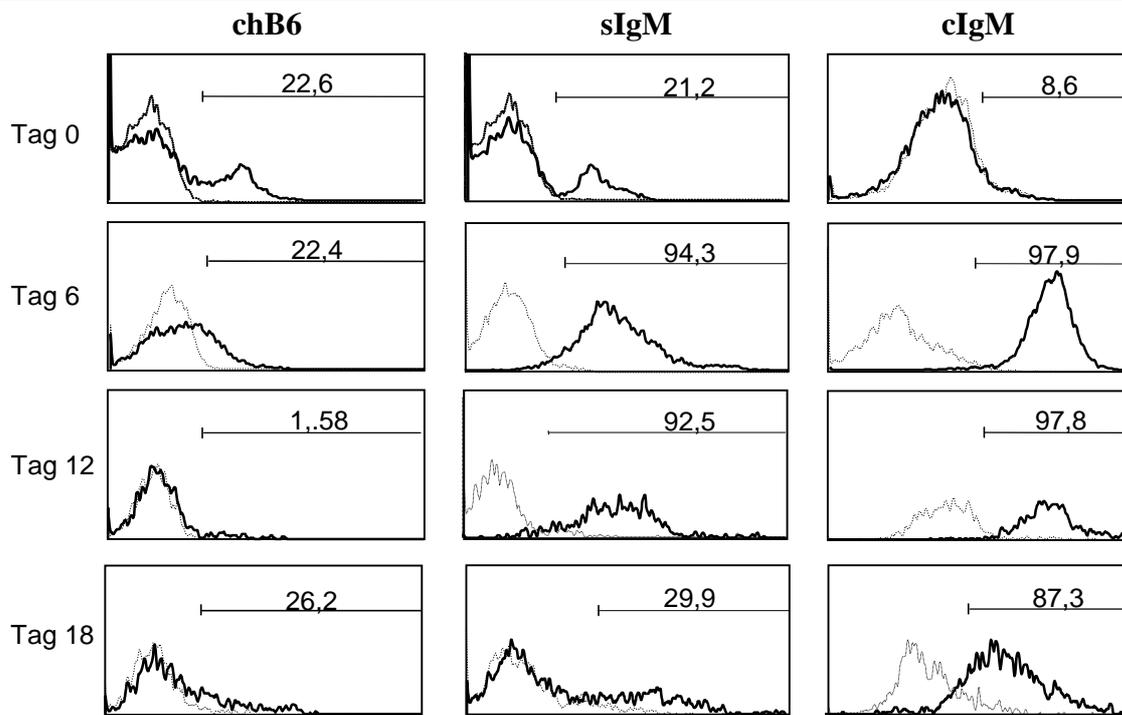
**Abbildung 5.18: Zunahme der Zellgröße in Langzeitkulturen**

Nach der Gewinnung von Milzlymphozyten wurden diese nach der unter 4.3.2.2.2 beschriebenen Methode mit 0,5 µg/ml rChCD40L in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellgröße mittels FACS bestimmt.

Die Abbildung zeigt die Kinetik der Entwicklung der Zellgröße von Lymphozyten eines Tieres.

### 5.5.3.2 Oberflächenmarker

Aus dem Maussystem ist bekannt, dass sich verschiedene Entwicklungsstadien der B-Zellen durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker voneinander unterscheiden lassen. Um festzustellen, ob sich durch die Stimulation mit rChCD40L ebenfalls Unterschiede in den Expressionsmustern der B-Zellen feststellen lassen, wurden Milzlymphozyten für 18 Tage mit 0,5 µg/ml rChCD40L kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer untersucht. Dafür wurde einerseits eine Einfachfärbung mit dem B-Zellmarker AV20, welcher chB6 erkennt, andererseits eine Doppelfärbung für membrangebundenes (sIgM) und zytoplasmatisches (cIgM) IgM durchgeführt (s. 4.10.5).



**Abbildung 5.19: Phänotypisierung von Milz-B-Zellen in Langzeitkulturen mit rChCD40L**

Milzlymphozyten wurden wie unter 4.3.2.2.2 beschrieben mit jeweils 0,5 µg/ml rChCD40L in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten auf die Expression verschiedener B-Zellmarker untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den für die angegebenen Oberflächenmarkern spezifischen Antikörpern einer Einfachfärbung (chB6) bzw. einer Doppelfärbung (sIgM/cIgM) unterzogen und die Frequenzen im Histogramm dargestellt. Die unterbrochenen Linien zeigen die Isotypenkontrolle der Färbung, die durchgezogenen Linien geben jeweils die der Beschriftung entsprechende Färbung wieder.

Gezeigt ist ein repräsentativer Verlauf der Phänotypisierung für ein Huhn.

	chB6		sIgM		cIgM	
	Kontrolle	CD40L	Kontrolle	CD40L	Kontrolle	CD40L
<b>Tag 0</b>	31,8 (+/- 8,6)	31,8 (+/- 8,6)	31,7 (+/- 3,9)	31,7 (+/- 3,9)	8,9 (+/-0,9)	8,9 (+/-0,9)
<b>Tag 6</b>	8,7 (+/- 5,6)	39,8 (+/- 23,0)	17,1 (+/- 12,0)	83,5 (+/- 17,4)	30,1 (+/- 7,3)	92,6 (+/- 6,8)
<b>Tag12</b>	-	28,6 (+/- 17,9)	-	50,8 (+/- 30,7)	-	77,7 (+/- 9,2)
<b>Tag 18</b>	-	25,5 (+/- 15,7)	-	23,3 (+/- 13,3)	-	84,4 (+/- 10,7)

**Tabelle 6: Phänotypisierung der B-Zellen in Langzeitkulturen**

Die B-Zellen von 3 Tieren wurden für 18 Tage in Kultur genommen und mit rChCD40L stimuliert (s.o.), als Kontrolle dienten unstimulierte Kulturen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Frequenz der jeweils genannten Marker im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Tieren.

- : es konnten keine lebenden Zellen nachgewiesen werden

Abb. 5.19 zeigt, dass an Tag 0, ausgehend von einer initialen B-Zellfrequenz von ca. 20%, alle frisch präparierten B-Zellen chB6 und IgM auf ihrer Zelloberfläche (sIgM) exprimierten, während die zytoplasmatische Färbung auf IgM (cIgM) negativ war. Dieses Bild änderte sich jedoch nach sechs Tagen: die B-Zellen ließen sich nur noch zu einem Bruchteil mit dem chB6-Antikörper anfärben, während sie alle weiterhin membranständiges IgM exprimierten. Zusätzlich wiesen alle diese B-Zellen nun auch zytoplasmatisches IgM auf. Bis Tag 12 ließen sich außer einer weiteren Abnahme der chB6-Expression keine weiteren Veränderungen beobachten. An Tag 18 jedoch konnte auch eine Abnahme des membranständigem IgM beobachtet werden, während die zytoplasmatische IgM-Expression weiterbestand.

Ausgehend von diesen Daten lässt sich eine deutliche Veränderung des Expressionsmusters von B-Zellen durch rChCD40L darstellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für die Detektion von B-Zellen in diesen Kulturen die Bestimmung des zytoplasmatischen IgM der einzige aussagekräftige Marker darstellt, da die klassischen B-Zellmarker chB6 und membranständiges IgM nach 12 bzw. 18 Tagen nicht mehr auf allen B-Zellen exprimiert werden.

#### 5.5.4 Stimulation der Antikörperproduktion

Die Hauptfunktion der B-Zellen ist die Produktion spezifischer Antikörper. Aus dem Mausmodell war lange bekannt, dass eine Stimulation mit CD40L in der Lage ist, den Klassenwechsel und die Produktion spezifischer Antikörper *in vitro* zu induzieren. Vergleichbare Experimente konnten für das Huhn bisher nicht durchgeführt werden, da die primären Hühner-B-Zellen nur bis zu 72 h in Kultur gehalten werden konnten und in dieser Zeit keine sinnvollen Untersuchungen zu der Antikörperproduktion möglich waren.

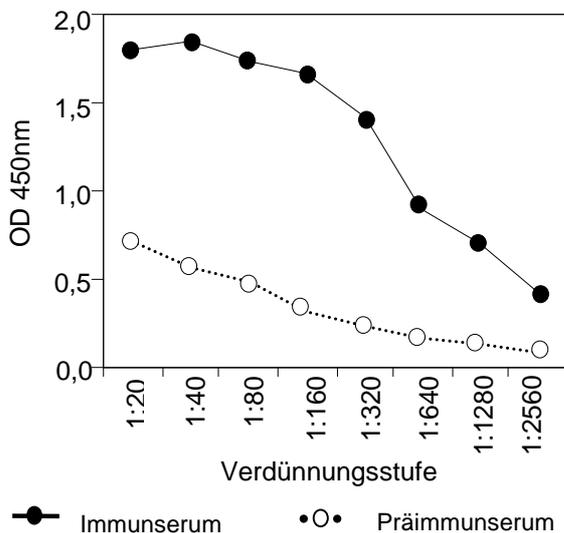
Durch die Etablierung von Langzeitkulturen war es nun möglich, auch solch komplexe Mechanismen zu untersuchen. Da das Medium für diese Kulturen jedoch Hühnerserum und damit Antikörper enthielt, konnte die Produktion unspezifischer Antikörper nicht genauer untersucht werden. Um dennoch Daten zur CD40L-induzierten Antikörperproduktion zu erhalten, wurde ein System zur Detektion spezifischer Antikörper gegen KLH („*Keyhole limpet hemocyanin*“), ein in der Immunologie häufig verwendetes Antigen, aufgebaut.

### 5.5.4.1 Generierung eines Standards für den anti-KLH-spezifischen ELISA

Um einen Standard für das KLH-spezifische Testsystem zu generieren, wurden Hühner mit KLH immunisiert und sowohl ein polyklonales Serum gegen KLH für den IgM-Standard, als auch gereinigtes Dotter-IgG für die Verwendung als Standard in anti-IgG-ELISAs gewonnen.

#### 5.5.4.1.1 Gewinnung des polyklonalen Serums gegen KLH

Nach der Entnahme des Präimmunserums wurden zunächst zwei Hühner der Linie LSL nach dem unter 4.4. beschriebenen Schema mit KLH immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den beiden Tieren erneut Blut abgenommen und das Serum gewonnen. Anschließend wurde das Serum im KLH-spezifischen ELISA (s. 4.8.3.) getestet. Wie Abb.5.20 zeigt, konnte im Präimmunserum nur ein geringer Titer an unspezifischem IgM gefunden werden, während das Immunserum bei einer Ausgangsverdünnung von 1:20 einen ca. dreifach höheren IgM-Titer aufwies. Somit war mit dem Serum der immunisierten Tiere ein geeigneter Standard etabliert, welcher idealerweise mit einer 1:20 Ausgangsverdünnung verwendet wurde.



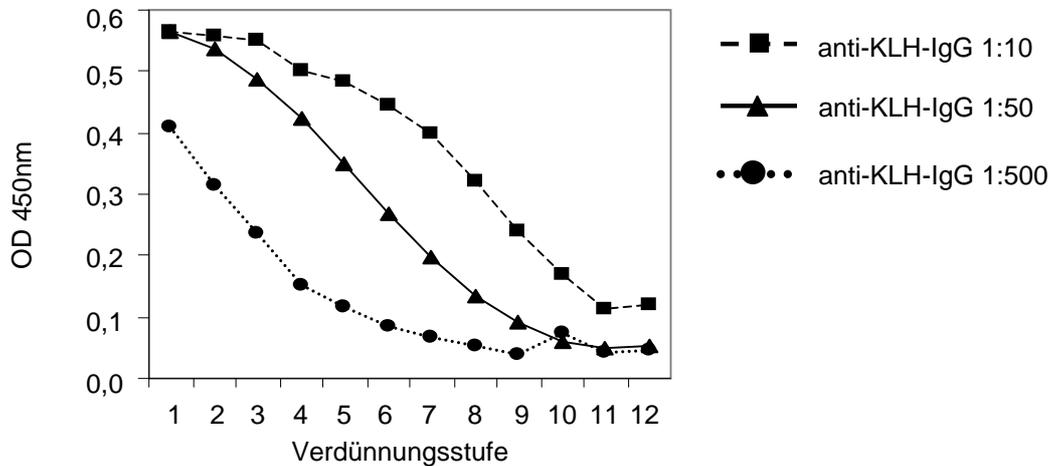
**Abbildung 5.20: KLH-spezifische IgM-Titer in Immun- und Präimmunseren**

Zwei Hühner wurden nach dem unter 4.4. beschriebenen Schema mit KLH immunisiert. Das vorher abgenommene Präimmunserum sowie das 14 Tage nach der letzten Immunisierung gewonnene Serum wurde anschließend im KLH-spezifischen ELISA in einer Ausgangsverdünnung von 1:20 auf IgM getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Hühnern.

#### 5.5.4.1.2 Gewinnung von gereinigtem anti-KLH-IgG

Zwei Wochen nach der Booster-Immunisierung wurden die Hühner einzeln aufgestellt und ihre Eier über eine Woche gesammelt. Anschließend wurde über eine Proteinfällung (s. 4.5.)

das enthaltene Dotter-IgG aufgereinigt und im SDS Gel auf seine Reinheit getestet. Danach wurde die ideale Konzentration des gereinigten Dotter-IgG für den Einsatz im anti-KLH-ELISA ermittelt. Wie aus Abbildung 5.21 ersichtlich ist, wurde für die ideale Konzentration zur Verwendung im ELISA eine Ausgangsverdünnung von 1:50 bestimmt.



**Abbildung 5.21: Titrationskurve des gereinigten, KLH-spezifischen Dotter-IgG**

Die Eier der unter 4.4 beschriebenen Hühner wurden für eine Woche gesammelt und das IgG wie unter 4.5. beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde das gereinigte Dotter-IgG im KLH-spezifischen ELISA auf KLH-spezifisches IgG getestet.

Gezeigt sind die Titrationskurven verschiedener Ausgangskonzentrationen.

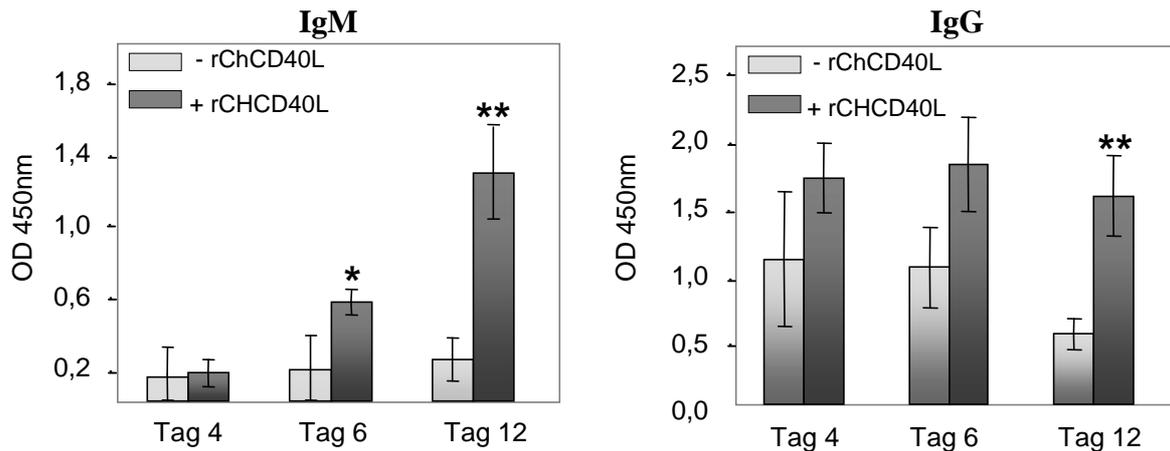
### 5.5.4.1.3 Einfluss von rChCD40L auf die Antikörperproduktion *in vitro*

Nach der Generierung des Standards für den anti-KLH-ELISA wurden drei weitere Hühner der Linie M11 mit je 100 µg KLH/kg Körpermasse i.v. immunisiert und sechs Tage nach der Immunisierung geschlachtet. Die Milzen wurden entnommen, die daraus präparierten Lymphozyten in Kultur genommen und mit rChCD40L stimuliert. Zusätzlich wurden auch Kulturen ohne das Zytokin angesetzt. Als Negativkontrolle dienten Lymphozytenkulturen eines nicht immunisierten Huhnes, welche ebenfalls mit und ohne rChCD40L-Stimulation in Kultur genommen wurden.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 250 µl des Zellkulturüberstandes entnommen und sofort bei -20° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Um den Gehalt an KLH-spezifischen Antikörpern in den Überständen zu bestimmen, wurden diese im anti-KLH-ELISA getestet. Zum Vergleich der Antikörpertiter wurde jeweils die sechste Verdünnungsstufe verwendet. Um die Interassayvarianz auszugleichen, wurde auf jeder ELISA-Platte der jeweils der unter 5.5.4.1.1. und 5.5.4.1.2. beschriebene Standard mitgeführt. Im Anschluss an die Messung wurde die optische Dichte der jeweils sechsten Verdünnung

des Standards miteinander verglichen und ausgehend von der niedrigsten OD der Plattenfaktor für jede Platte errechnet. Dieser wurde anschließend dazu verwendet, die optischen Dichten der Proben auf den Standard zu normalisieren.

Wie zu erwarten war, konnte in den Zellkultüberständen des nicht immunisierten Kontrolltiers zu keinem Zeitpunkt ein KLH-spezifischer Antikörpertiter nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.22: Induktion KLH-spezifischer Antikörpertiter KLH-immunisierter Hühner**

Nach der Gewinnung primärer Milzlymphozyten von 3 KLH-immunisierten Tieren wurden die Zellen für zwölf Tage mit und ohne rChCD40L in Kultur genommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und im KLH-spezifischen ELISA auf KLH-spezifische Antikörper getestet. Die Diagramme zeigen jeweils die optische Dichte der 6. Verdünnungsstufe; Um die Interassayvarianz auszugleichen, wurden die ODs jeweils auf die niedrigste OD des gemessenen Standards der gleichen Verdünnungsstufe korrigiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Tieren.

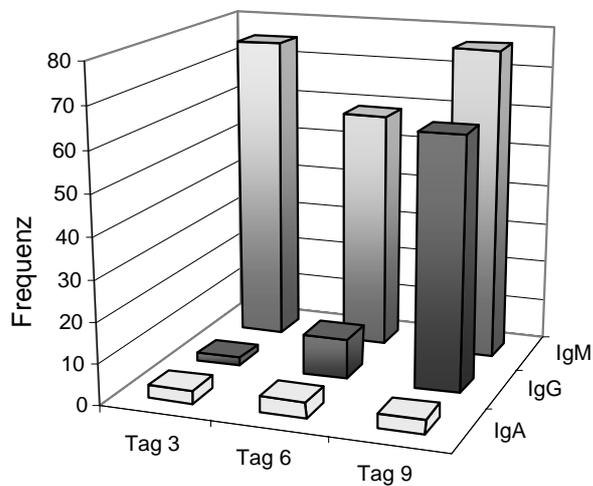
\*/\*\*: diese Werte sind signifikant unterschiedlich (\*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ ; T-Test)

Abb. 5.22 zeigt, dass für die immunisierten Tiere an Tag 4 keinerlei Unterschied zwischen den stimulierten und den unstimulierten Ansätzen erkennbar war. Der Titer für KLH-spezifisches IgM blieb für die unstimulierten Ansätze bis Tag 12 konstant, während der Titer in den rChCD40L stimulierten Kulturen signifikant anstieg. Für IgG zeigte sich ein anderes Bild: hier nahm der Titer der spezifischen Antikörper durch die 1:2 Teilung der Kontrollkulturen kontinuierlich ab, wohingegen die Titer der stimulierten Ansätze konstant blieben und an Tag 12 signifikant höher lagen, als die der Mediumkontrolle.

Somit konnte eine signifikante Erhöhung der KLH-spezifischen Antikörpertiter sowohl für IgM als auch für IgG durch die Zugabe von rChCD40L zu den Zellkulturen immunisierter Tiere gezeigt werden.

**5.5.4.1.4 Klassenwechsel**

Neben der Produktion von Antikörpern und den Oberflächenmarkern wurde auch der Isotyp der B-Zellen in Langzeitkulturen untersucht. Dazu wurden Milzlymphozyten mit rChCD40L in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten in einer Doppelfärbung auf ihren Isotyp hin getestet. Abb. 5.23 zeigt die Ergebnisse für die zytoplasmatische Färbung aus zwei unterschiedlichen Ansätzen: während der Anteil IgA positiver Zellen unverändert bleibt, ist eine deutliche Zunahme der IgG<sup>+</sup> Zellen an Tag 9 zu beobachten. Die Frequenz IgM<sup>+</sup> Zellen bleibt im Vergleich dazu während der gesamten Zeitspanne konstant.



**Abbildung 5.23: Frequenz der B-Zellisotypen in Langzeitkulturen**

Milzlymphozyten von 2 Tieren wurden für 9 Tage mit 0,5 µg/ml rChCD40L kultiviert und zu den gezeigten Zeitpunkten durch eine Doppelfärbung auf membrangebundenes und zytoplasmatisches IgA, IgM und IgG im Durchflusszytometer auf ihren Isotyp des B-Zellrezeptors hin getestet. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert von 2 unterschiedlichen Ansätzen

## 6 Diskussion

Lange Zeit wurde angenommen, dass bei Mensch und Maus gewonnene Erkenntnisse über die Entwicklung und Funktion von T- und B-Zellen auf unsere Haussäugetiere übertragen werden können, während die beim Huhn beschriebenen bedeutenden Unterschiede in essentiellen Punkten der B-Zellentwicklung als Ausnahme angesehen wurden. Arbeiten der letzten Jahre konnten jedoch zeigen, dass diese Prozesse bei Schaf, Rind und Schwein den beim Huhn beschriebenen wesentlich ähnlicher sind, als denen der Maus und ebenso wie beim Huhn in darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT, „gut associated lymphatic tissue“) stattfinden. Hierauf basierend setzt sich die Meinung durch, dass die Entwicklung des B-Zellsystems beim Huhn vielmehr die Regel als die Ausnahme darstellt und das Huhn das am besten charakterisierte Modelltier für die sogenannten GALT-Spezies bildet. Die bisher gewonnenen Einsichten in die Hühner B-Zellentwicklung basieren vor allem auf drei Ansätzen: Viele Daten konnten durch molekularbiologische Verfahren gewonnen werden, wofür als Grundlage seit längerem umfangreiche EST-Datenbanken dienen. Seit im Jahr 2004 die gesamte Sequenz des Hühnergenoms als erstes Genom einer Haustierspezies veröffentlicht wurde, wurde diese Möglichkeit um ein Vielfaches erweitert [251]. Auch wenn noch wenig über die einzelnen Gene bekannt ist werden sowohl das Hühnergenom als auch die bisherigen EST-Datenbanken Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein. So kann nun umfassend nach verschiedenen Genen gesucht werden, um weitere Einblicke in verschiedenste Aspekte der Biologie des Huhns zu erlangen. Jedoch können diese Untersuchungen nur Vermutungen über die biologischen Funktionen *in vivo* liefern. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse muss weiterhin durch *in vitro* und *in vivo* Experimente erfolgen.

Zwei weitere Ansätze wurden verwendet, um speziell die B-Zellbiologie des Huhns zu studieren.

Zum einen wurden Chimären aus Hühnern und Wachteln verwendet, die vor allem eine Reihe wichtiger entwicklungsbiologischer Erkenntnisse erbrachten. So konnten in diesen Modellen z.B. die Herkunft lymphatischer Stammzellen und deren Migration [39, 252] sowie die Ontogenese lymphatischer Organe, allen voran der Bursa, untersucht werden [253]. Über die weitere Entwicklung der B-Zellen konnte dieses Modell jedoch ebenfalls keine zusätzlichen Erkenntnisse liefern.

Mit der Generierung der bursalen B-Zelllinie DT40, welche auch für die Forschung im Rahmen des Mausmodells häufig eingesetzt wird, gelang es, neue Einblicke in die

Mechanismen der B-Zellreifung zu erlangen. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei bei der Generierung der Diversität und Antigenspezifität durch „*DNA-Editing*“ [62]. Ein wichtiger Vorteil dieses Modells ist neben der einfachen Manipulation der Erbinformation vor allem die Möglichkeit, Hühner-B-Zellen über längere Zeit in Kultur zu halten. Dies war bisher für primäre Hühner-B-Zellen nicht möglich, da diese innerhalb kürzester Zeit nach der Entnahme in Kultur in Apoptose gehen.

So geeignet das DT40-Modell für viele molekularbiologische Fragestellungen war, so kritisch sind die in dieser Zelllinie gewonnenen Ergebnisse für die B-Zellreifung *in vivo* zu betrachten, da z.B. nicht bekannt ist, ob die Anzahl und die Identität der aktivierten Genen denen primärer B-Zellen entspricht, oder ob zusätzliche Gene artifiziell aktiviert sind und somit die im DT40-Modell erzielten Ergebnisse Artefakte darstellen. Aus diesem Grund war es nötig, ein Modell zu etablieren, mit dem man in der Lage ist, auch primäre Hühner-B-Zellen für längere Zeit in Kultur halten zu können, um die Entwicklung über einen längeren Zeitraum studieren zu können, da auch durch eine optimale Stimulation mit rChBAFF die Lebensspanne *in vitro* nur unwesentlich verlängert werden konnte [121].

Durch die Verwendung von rChCD40L war es nun erstmals möglich, primäre Hühner-B-Zellen bis zu drei Wochen in Kultur zu halten und deren Entwicklung *in vitro* zu studieren.

## 6.1 CD40 Expression

Um ein funktionell aktives System zu untersuchen, muss zunächst die Expression beider Aktionspartner, in diesem Fall von chCD40 und chCD40L, bekannt sein. Durch Tregaskes et al. konnte bereits gezeigt werden, dass chCD40L analog dem Säugersystem auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert ist und somit als kostimulatorisches Molekül im Huhn existiert. Bezüglich der Expressionsmuster von chCD40 konnten erste Untersuchungen zeigen, dass vornehmlich B-Zellen in verschiedenen Organen CD40<sup>+</sup> sind. Darüber hinaus konnten Monozyten und Thrombozyten als chCD40L-bindende Zellen identifiziert werden [123]. Während diese Daten mittels einer Färbung des chCD40L-mouseCD8 Fusionsproteins erstellt wurden, wurde die Expression von chCD40 im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung des anti-chCD40 Antikörpers AV79 für Leukozyten in allen relevanten Lymphorganen durchgeführt. Ziel war es, einen umfassenden Überblick über die chCD40-Expression sowohl innerhalb verschiedener Zellpopulationen als auch verschiedener Entwicklungsstadien zu erlangen.

### 6.1.1 B-Zellen

Tregaskes et al. zeigten, dass die B-Zellpopulation in der Bursa, der Milz und im Blut vollständig CD40<sup>+</sup> ist. Davon ausgehend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass dies auch für B-Zellen der Zäkaltonsillen und des Thymus zutrifft. Damit sind alle B-Zellen ungeachtet des Organs und damit möglicherweise auch des Entwicklungsstadiums als CD40<sup>+</sup> charakterisiert, was sich mit den Ergebnissen im Maussystem deckt. Eingehende Untersuchungen der CD40-Expression konnten dort zeigen, dass der Rezeptor bereits schwach ab dem Pre-B-Zellstadium im Knochenmark exprimiert ist und während der B-Zellentwicklung die Moleküldichte konstant zunimmt [254]. Darüber hinaus lässt sich kein Unterschied in der CD40-Expression zwischen B-Zellen junger und alter Individuen feststellen [255]. Durch die Arbeit von Hirano et al. konnte erstmals die CD40-Expression in einer GALT-Spezies, in diesem Fall dem Rind, untersucht werden: sowohl in ruhenden als auch in aktivierten aus dem Blut gewonnene B-Zellen konnte CD40 als Transkript mittels PCR nachgewiesen werden [112]. Eine genauere Untersuchung der CD40-Proteinexpression auf B-Zellen in GALT-Spezies wurde beim Schwein mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen durchgeführt: auch hier waren alle B-Zellen aus verschiedenen lymphatischen Organen durchweg CD40<sup>+</sup>. Der dort fehlende Nachweis CD40 exprimierender B-Zellen im Thymus kann darauf zurückgeführt werden, dass im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Thymuspräparationen ein Altersunterschied bestand und damit keinerlei B-Zellen in diesem Organ zu finden waren [256].

Die bereits bekannten Daten über das CD40-CD40L-System in GALT-Spezies zeigen deutliche Ähnlichkeiten mit den in dieser Arbeit für das Huhn gewonnenen Ergebnissen. Somit bestätigen diese Daten die Rolle des Huhns als Modell für die GALT-Spezies.

### 6.1.2 T-Zellen

Erste Doppelfärbungen gegen CD40 mit dem Pan-T-Zellmarker CD3 zeigten überraschenderweise, dass neben den B-Zellen auch eine kleine Subpopulation von CD3<sup>+</sup> T-Zellen CD40<sup>+</sup> ist. Im Vergleich dazu waren alle bisher untersuchten T-Zellpopulationen im Huhn negativ [123]. Genauere Untersuchungen ergaben dann, dass sowohl für CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch für CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen CD40<sup>+</sup> Subpopulationen gefunden werden konnten, deren Anteil sich für Milz und Zäkaltonsillen zwischen 9,7% und 16,1% der

T-Zellen bewegt. Im Vergleich dazu ist der Anteil CD40<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und im Thymus mit ca. 3% wesentlich geringer. Am deutlichsten zeigt sich diese Beobachtung in der Bursa: hier stellen CD40<sup>+</sup> T-Zellen den Hauptanteil der zahlenmäßig sehr kleinen T-Zellpopulation in diesem Organ dar, was zusammen mit der CD40-Expression der B-Zellen eine Rolle für das CD40-CD40L-System in der Bursa bestätigt.

Generell ist wenig über die Expression und Funktion von CD40 auf T-Zellen bekannt. Studien im Maussystem konnten bisher nur eine kleine CD40<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation identifizieren. Ausschließlich im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten und nach Antigenstimulierung konnte eine erhöhte Anzahl CD40 exprimierender T-Zellen gefunden werden, deren Expression jedoch deutlich geringer war, als die vergleichbarer B-Zellen [257, 258]. Bezüglich der Funktionen wurde schon früh postuliert, dass CD40L auch für periphere T-Zellen als Wachstumsfaktor und Differenzierungsfaktor dient, was in letzter Zeit bestätigt werden konnte [181, 182]. Neuere Studien stellen zudem die Hypothese auf, dass die Generierung von CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen analog den B-Zellen durch CD4-Hilfe direkt über das CD40-Molekül vermittelt wird [258, 259]. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass eine DNA-Vakzine mit dem Gen für CD40L zu einer deutlichen Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Zweitantwort führte [260]. Eine mögliche Funktion des CD40-CD40L-Systems für CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte auch für das Rind bestehen, da vier verschiedene CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien nach Stimulation CD40 cDNA exprimierten und daher potentielle CD40-exprimierende Zellen darstellen. Neben der Generierung von Memory-T-Zellen wäre auch eine Steigerung der Anzahl antigenspezifischer Zellen durch eine homo- oder heterotype Aggregation der Zellen durch einen CD40-CD40L vermittelten Zellkontakt denkbar [261]. Somit konnten sowohl für das Maussystem als auch für die GALT-Spezies mögliche Funktionen der CD40-Expression auf T-Zellen aufgezeigt werden, welche durch die Identifizierung von CD40<sup>+</sup> Subpopulation in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Huhns weiteren Zuspruch erhalten.

Innerhalb der CD40<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen des Huhns ist vor allem die mit ca. 50% relativ große CD40<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation der Bursa bemerkenswert, da Vergleichbares bisher nicht beschrieben wurde. Die Entwicklung der B-Zellen in der Bursa von zwei Dingen abhängig: einerseits ist die Aufnahme externer Antigene in die Bursa essentiell, da eine Ligation der Bursa und damit der Unterbindung der Antigenaufnahme zu einer erheblichen Verzögerung der B-Zellreifung und einer Immunsuppression führt [50]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch den T-Zellen eine wesentliche Aufgabe in der B-Zellentwicklung zukommt, da eine vollständige Rekonstitution der adaptiven Immunantwort in thym- und

bursektomierten Hühnern durch ausschließliche B-Zellgabe nicht erreicht werden konnte [56]. Demnach scheint auch in der Bursa eine B-T-Zellinteraktion für die B-Zellreifung mitverantwortlich zu sein und legt in diesem Zusammenhang eine essentielle Funktion für das CD40-CD40L-System nahe. Bestärkt wird diese These durch verschiedene Beobachtungen in den Bursaäquivalenten weiterer GALT-Spezies: Zum einen konnte für immature B-Zellen der Peyerschen Platten des Schafs, gezeigt werden, dass die Weiterentwicklung immaturer B-Zellen tatsächlich abhängig von CD40L ist, da sowohl verschiedene Rezeptoren reguliert wurden, als auch antiapoptotische und proliferative Effekte zu beobachten waren [262]. Zum anderen konnten ergänzend dazu ausschließlich aktivierte T-Zellen die Apoptose immaturer B-Zellen des Schweins verhindern. Dieser Effekt ließ sich für das Schwein konsequenterweise auch mit löslichem bzw. membrangebundenen CD40L wiederholen. Beide Arbeiten zusammen zeigen deutlich, dass dem membrangebundenen CD40L der T-Zellen eine essentielle Rolle in der Entwicklung der B-Zellen zukommt. Weiterhin konnte für eine bovine CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie eine Induzierung der cDNA Synthese für CD40 nach Stimulation gezeigt werden, was zumindest die Möglichkeit einer physiologischen CD40-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nahe legt und somit die im Huhn gewonnenen Daten bestätigt. Eine denkbare Funktion der CD40-Expression auf T-Zellen könnte somit im Hinblick auf das CD40-CD40L-System im Rahmen einer Autoregulation zu finden sein [263]. Da allerdings kaum weitere Daten über die CD40-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen existieren, können weitere Untersuchungen am Huhn als Modell für die GALT-Spezies diese Hypothese prüfen.

### 6.1.3 Myeloide Zellen

Um ein unfassendes Bild über die Verteilung von CD40 innerhalb des Immunsystems zu erlangen, wurden zusätzlich auch Zellen der myeloiden Reihe auf ihre CD40-Expression hin untersucht. Die Ergebnisse bestätigen bereits vorhandene Daten der Säugerlandliteratur, welche Monozyten und Makrophagen als CD40<sup>+</sup> beschreiben [187]. Dies konnte im Huhn unabhängig sowohl für Monozyten/Makrophagen der Milz und des Blutes gezeigt werden. Darüber hinaus war es analog dem Säugersystem möglich, eine erhöhte CD40-Expression in Milz-Makrophagenkulturen durch LPS zu induzieren [264]. Dies weist auf eine dem Säuger vergleichbare Rolle des CD40-CD40L-Systems innerhalb der angeborenen Immunantwort beim Huhn hin.

## 6.2 Biologische Funktionen

Nachdem gezeigt werden konnte, welche Zellen im Huhn CD40 exprimieren, wurde eine Reihe von *in vitro* Versuchen mit primären Hühnerlymphozyten durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen gezielt mit rChCD40L stimuliert, um Einblicke in die Funktionsweise des CD40-CD40L-Systems des Huhns zu erlangen.

### 6.2.1 Überleben

Zunächst wurde in Kurzzeitkulturen getestet, ob rChCD40L Auswirkungen auf die Überlebensrate von B-Zellen hat.

#### 6.2.1.1 B-Zellen

Durch Tregaskes et al. konnte bereits ein dosisabhängiger, positiver Effekt auf das Überleben von Milz- Zellen durch Zugabe von rChCD40L nachgewiesen werden, daher wurden Lymphozytensuspensionen verschiedener lymphatischer Organe mit CD40L in Kultur genommen und die B-Zellzahl bestimmt. Dabei konnte eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne der B-Zellen beobachtet werden, die für Kulturen der Milz und der Zäkaltonsillen in einer konstanten B-Zellzahl resultierte. Im Gegensatz dazu war in bursalen Kulturen eine sukzessive Abnahme der Zahl lebender B-Zellen zu beobachten. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen war jedoch auch hier eine signifikant höhere Zahl lebender B-Zellen zu finden.

Die Tatsache, dass CD40L ein potenter B-Zellüberlebensfaktor ist, wurde schon früh für die Maus beschrieben. Später wurde das komplexe Zusammenspiel verschiedenster Signale an B-Zellen weiter erforscht und brachte zusätzliche Erkenntnisse über pro- und antiapoptotische Signalwege. So konnte z.B. eine erhöhte Fas-Expression auf B-Zellen nach CD40L-Stimulation beobachtet werden, welche aktivierte B-Zellen empfänglich für Fas-L-induzierte Apoptose macht, die jedoch durch die Stimulation des B-Zellrezeptors aufgehoben werden kann [205, 265]. Dies stellt somit einen wirksamen Schutz gegen „zufällig“ durch CD40L aktivierte B-Zellen dar, welche eine unerwünschte Immunreaktion auslösen können. Bei den vorliegenden *in vitro* Experimenten kommt dieser Effekt der Fas-abhängigen Apoptose

anscheinend nicht zum tragen, da hier eine deutliche Steigerung der Überlebensrate zu beobachten war. Dies erklärt sich dadurch, dass CD40L selbst in der Lage ist, Fas-induzierte Apoptose durch eine NF- $\kappa$ B-abhängige Induktion von antiapoptotischen Molekülen der BCL-2-Familie (Bcl-x, Bfl-1) zu verhindern [266]. Zusätzlich existiert ein NF- $\kappa$ B-unabhängiger, schneller Weg, der die Zeit bis zur *de novo* Synthese der BCL-2 Proteine überbrückt und über eine TRAF6-abhängige Signaltransduktion die Aktivierung der Caspase 3 verhindert [267]. Damit kann in dauerhaft mit CD40L stimulierten Kulturen die Apoptose durch Fas verhindert werden. Interessanterweise lässt sich in den rChCD40L-*in vitro*-Kulturen in den ersten 24 h ein Absterben der B-Zellen nicht gänzlich verhindern, was vermuten lässt, dass der TRAF6 abhängige Weg im Huhn möglicherweise nicht existent ist. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Induzierung von Apoptose durch die Präparation der Lymphozyten liegen. Eine Bestimmung der antiapoptotischen Faktoren nach chCD40L Stimulation ist hier sicherlich der nächste Schritt in der Charakterisierung der CD40-CD40L Systems im Huhn, vor allem nachdem eine minimale konstitutive Expression von CD40L auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle für die B-Zellhomöostase nahe legt [154].

Dass dieser antiapoptotische Effekt stark vom jeweiligen Aktivierungsstatus und der Differenzierung der B-Zelle abhängig ist, wurde in der Säugeliteratur bereits beschrieben [233]. Die im Huhn gewonnen Erkenntnisse für bursale Lymphozytenkulturen scheinen diese These zu bestätigen, da in diesen Kulturen die Apoptose durch chCD40L nicht verhindert werden konnte, allerdings gelang es, eine vierfach höhere Anzahl an lebenden B-Zellen zu erhalten. Dies deckt sich mit Erkenntnissen über immature B-Zellen aus porzinen und ovinen Peyerschen Platten: Stimulation von *in vitro* Kulturen dieser B-Zellen mit CD40L konnte die Apoptose ebenfalls nicht vollständig verhindern, allerdings konnte eine Überlebensrate von ca. 50% (Schaf) bzw. eine Erhöhung der Überlebensrate um den Faktor 2 beobachtet werden [262]. Darüber hinaus konnte für das Schwein eine weitere Steigerung der Überlebensrate durch membrangebundenen CD40L auf das Vierfache der unstimulierten Kontrollansätze erzielt werden [268]. Zusätzlich konnten Griebel et al. für immature B-Zellen des Schafes zeigen, dass eine CD40L-Stimulation alleine zwar nicht ausreichend ist, um diese Zellen langfristig in Kultur zu halten, aber die Stimulation mit CD40L essentiell notwendig ist, um die B-Zellen für die Effekte weiterer Zytokine empfänglich zu machen, welche zusammen mit CD40L für die weitere Entwicklung zuständig sind [269]. Somit scheint es wahrscheinlich, dass auch bursale B-Zellen weitere Signale erhalten müssen, um deren Apoptose vollständig zu verhindern.

### 6.2.1.2 T-Zellen

Neben dem Effekt auf B-Zellen wurden auch Milz-T-Zellen auf CD40L vermittelte Effekte untersucht, da sich in durchflusszytometrischen Untersuchungen eine kleine CD40<sup>+</sup> Population finden ließ. Im Gegensatz zu der B-Zellzahl konnte sowohl unter CD40L Stimulation als auch in der unstimulierten Kontrolle eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl lebender T-Zellen beobachtet werden, wobei der Effekt in CD40L substituierten Ansätzen stärker ausgeprägt zu sein scheint.

Für das Maussystem gibt es bisher wenige Daten über CD40<sup>+</sup> T-Zellen, jedoch konnten auch hier CD40 exprimierende T-Zellen, vorwiegend in autoimmunreaktiven Mäusen, gefunden werden. Weitere Untersuchungen mit diesen Zellen sowie mit CD40-transfizierten T-Zellen zeigten eine kostimulatorische Funktion für CD40L. So konnte sowohl eine gesteigerte Expression von Oberflächenmolekülen wie ICAM-1 als auch die Produktion verschiedener Zytokine gezeigt werden [182]. Auch die von Armitage et al. beobachtete Proliferation nach CD40L-Stimulation konnte nur in CD3- oder PHA-aktivierten T-Zellen gezeigt werden [181]. Demzufolge scheint CD40L für T-Zellen eine ausschließlich kostimulatorische Funktion zuzukommen, da CD40L-Stimulation alleine kaum Effekte zeigte. Dies deckt sich somit den im Huhn gewonnen Daten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass T-Zellen für den in CD40L-stimulierten Lymphozytenkulturen beobachtete Erhöhung der Zellzahl lebender Zellen den positiven Überlebenseffekt in der Lymphozytensuspension nahezu ausgeschlossen werden konnten und somit B-Zellen tatsächlich die auf rChCD40L-Stimulation reagierende Zellpopulation darstellen.

### 6.2.2 Proliferation

Für eine Zunahme der Zahl lebender Zellen gibt es zwei ursächliche Möglichkeiten: zum einen kann eine Verlängerung der Lebensdauer aller Zellen in Vergleich zu einer abnehmenden Zellzahl vorliegen oder es kommt zu einer Proliferation entweder einer Subpopulation oder aller Zellen. Da die Ergebnisse in den Kurzzeitkulturen nicht nur einen Erhalt der B-Zellzahl sondern auch eine leichte Zunahme erkennen ließen, wurden im Anschluss verschiedene Experimente durchgeführt, um zu klären, ob eine proliferative

Wirkung von CD40L, wie sie für das Mausmodell beschrieben ist [229], auch für B-Zellen des Huhns nachweisbar ist.

Tregaskes et al. hatten bereits eine dosisabhängige Wirkung von CD40L auf Hühner-Milzzellen, wie sie im Säugersystem schon eingehend beschreiben ist, nachweisen können. Dies konnte in eigenen Untersuchungen auch für bursale Lymphozyten gezeigt werden. Die optimale rChCD40L-Konzentration wurde hier mit 1 µg/ml bestimmt. Da sich in den Untersuchungen zur Überlebensspanne der Lymphozyten herauskristallisierte, dass vornehmlich B-Zellen auf rChCD40L-Stimulation reagieren, wurde auch die beobachtete Proliferation den B-Zellen zugeschrieben. Um diese These zu beweisen, wurden weitere Proliferationsassays mit gereinigten B Lymphozyten der Milz durchgeführt, welche eine enorme Proliferationsrate der B-Zellen nachweisen konnten. Bemerkenswert ist dabei die Höhe Proliferationsrate durch ausschließliche rChCD40L- Stimulation, da im Säugersystem nur ein geringer proliferativer Effekt für CD40L nachgewiesen wurde, der allerdings durch gleichzeitige Zugabe von IL-4 auf das Doppelte gesteigert werden konnte [270]. Ob auch im Huhn ein solcher synergistischer Effekt für IL-4 nachweisbar ist, bleibt weiter abzuklären. Hinweise auf eine ähnliche Funktion von IL-4 für GALT-Spezies lassen sich bei Estes et al. und Takamatsu et al. finden: Versuche mit rekombinantem bovinen und porcinen IL-4 konnte eine dem Mausmodell analoge Funktion für B-Zellen in *in vitro* Experimenten zuweisen, der Effekt auf T-Zellen ließ allerdings deutliche Unterschiede erkennen [256, 271]. Weiteren Einblick in das Zusammenspiel verschiedener Faktoren im Hinblick auf die B-Zellproliferation konnten die Arbeiten von Hirano et al. und Haas et al. geben: beide konnten unabhängig voneinander nach Stimulation mit bovinem CD40L eine Steigerung der B-Zellzahl auf das Vierfache beobachten, welche einerseits durch die Zugabe von rekombinantem bovinen IL-4 auf das Sechsfache, andererseits durch die Aktivierung des B-Zellrezeptors auf das Zehnfache gesteigert werden konnte [112, 272]. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass auch in GALT-Spezies eine Synergie von CD40L mit IL-4 bzw. der Stimulation des B-Zellrezeptors besteht. Auf der anderen Seite lassen diese Daten jedoch auch den Schluss zu, dass dem Effekt von CD40L auf die B-Zellproliferation des Huhns eine wesentlich größere Rolle zukommt, als in den restlichen Spezies, da hier durch alleinige CD40L-Stimulation bereits eine Steigerung um das Zehnfache zu beobachten war. Da mittlerweile rChIL-4 zur Verfügung steht, kann diese Frage in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus dem Versuch mit gereinigter B-Zellen muss die Tatsache bedacht werden, dass diese Zellen einer Positivselektion mittels einem gegen den B-

Zellrezeptor gerichteten Antikörper unterzogen wurden: bei der Bindung an den B-Zellrezeptor und einer anschließenden Kreuzvernetzung kann es durchaus zu einer Stimulation der B-Zellen kommen, so ist bekannt, dass der verwendete Antikörper Ca-Signaling in B-Zellen induziert (persönliche Mitteilung von B. Viertlböck). Da jedoch in den ebenso generierten Negativkontrollen keine relevante Proliferation zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich die Stimulation mit rChCD40L essentiell für die Proliferation der B-Zellen ist. Darüber hinaus konnte Takamatsu et al. in B-Zellkulturen, die durch Entfernen der restlichen Zellpopulationen generiert wurden, ebenfalls eine dosisabhängige Proliferation erzielen [256].

Somit scheint im Gegensatz zu Maus und Mensch CD40L in den GALT-Spezies alleine in der Lage zu sein, ohne weitere kostimulatorische Faktoren eine nennenswerte Proliferation zu induzieren, wobei dieser Effekt für das Huhn am deutlichsten ausgeprägt ist.

### **6.2.3 Aktivierung von B-Zellen**

CD40L spielt nicht nur durch die Induktion der Proliferation und die Vermittlung antiapoptotischer Signale eine wichtige Rolle in der B-Zellentwicklung, sondern führt zusätzlich zu einer Aktivierung der B-Zellen. Sobald eine naive, ruhende B-Zelle generiert wird, ist es ihre Aufgabe, die Signale des B-Zellrezeptors und der kostimulatorischen Rezeptoren zu integrieren und entsprechend darauf zu reagieren. Durch die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren werden bestimmte Gene an oder abgeschaltet, was letztlich zu einer Änderung der exprimierten Proteine führt [273, 274]. Auch ein Eintritt in den Zellzyklus kann als Folge der Aktivierung beobachtet werden. Darüber hinaus sind phänotypische Effekte wie eine Größenzunahme, die Änderung des Expressionsmusters auf der Zelloberfläche und der Sekretion von Zytokinen zu erkennen. Funktionell entwickeln sie sich zu potenten Antigen präsentierenden Zellen, die T-Zellen aktivieren können um eine adaptive Immunantwort einzuleiten [275]. Diese Eigenschaft macht aktivierte B-Zellen daher auch interessant für die Tumorforschung und für die Anwendung in der Bekämpfung viraler Krankheiten [276-278].

Aufgrund der geringen Zahl von Antikörpern und Reagenzien zur Charakterisierung von B-Zellen des Huhns konnten keine umfassenden Studien bezüglich der Aktivierung von B-Zellen aufgrund rChCD40L-Stimulation vorgenommen werden, wie sie für Maus und Mensch gemacht wurden. Mit den Untersuchungen zur Expression von MHCII-Molekülen und der

IL-6-Sekretion war es möglich, zwei Kennzeichen der B-Zellaktivierung für das Huhn zu untersuchen.

### 6.2.3.1 Expression von MHCII

Die Fähigkeit, Antigen zu präsentieren ist in hohem Maße abhängig von der Expression von MHCII-Molekülen, da die über den B-Zellrezeptor aufgenommenen Antigene nach ihrer Prozessierung ausschließlich über MHCII-Moleküle anderen Zellen präsentiert werden können. Eine gesteigerte MHCII-Expression erhöht somit die Fähigkeit der B-Zellen, andere Zellen durch präsentiertes Antigen zu aktivieren. Für den Menschen ist bekannt, dass die Aktivierung durch CD40L zu einer Zunahme der MHCII-Expression führt [279, 280]. Für die GALT-Spezies konnte dies ebenfalls für das Schwein und das Rind, hier allerdings in Kombination mit anti-IgM-Antikörpern, gezeigt werden [256, 272] und wird durch die im Huhn beobachtete signifikante Zunahme der MHCII-Expression nach rChCD40L-Stimulation bestätigt. Ob es für das Huhn auch zu einer Aggregation der MHCII-Moleküle kommt, wie sie für humane B-Zellen beschrieben wurde [215], konnte nicht weiter untersucht werden. Auch die CD40L induzierte Expression von CD80 und CD86, welche essentielle T-Zell-Kofaktoren darstellen, bleibt für das Huhn aufgrund fehlender Antikörper weiterhin zu klären. Es erscheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine phylogenetisch konservierte durch CD28 und CD80/CD86 vermittelte T-Zellaktivierung existiert, da sowohl für CD80, als auch für CD28 ein Homolog für das Huhn identifiziert werden konnte [281, 282]. Darüber hinaus legen Untersuchungen mit einem ChCD28-spezifischen Antikörper in der Ente eine dem Säuger vergleichbare Funktion des CD28-CD80/CD86-Systems für das Huhn nahe [283]. Zusätzlich konnte eine CD40L-induzierte Expression von CD86 für das Schwein als GALT-Spezies bereits bewiesen werden [256]. Um die Interaktion von B- und T-Zellen im Rahmen der CD40L-abhängigen Aktivierung weiter zu untersuchen, ist die Entwicklung von Antikörpern gegen CD80 und CD86 ein geeigneter Ansatz, um so die Expressionsmuster aktivierter B-Zellen weiter studieren zu können. Im Hinblick auf die Ausbildung der immunologischen Synapse wäre es weiterhin sinnvoll, mit ICAM-1 und LFA-1 auch die Rolle von Adhäsionsmolekülen zu analysieren.

Die gesteigerte Expression von MHCII auf der Zelloberfläche zeigt, dass auch im Huhn durch verstärkte Antigenpräsentation der B-Zellen und der daraus resultierenden gesteigerten T-Zellhilfe die adaptive Immunantwort in der Lage ist, sich selbst durch das CD40-CD40L-System zu verstärken, was für die Initiierung von germinalen Zentren von Bedeutung ist.

Darüber hinaus lassen die im Huhn gewonnenen Daten die Vermutung zu, dass auch hier B-Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen agieren können, die auch in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren. Dies wurde für das Maussystem schon eingehend beschrieben [284], und ist abhängig von der Interaktion von CD40 mit CD40L [285]. Somit kann CD40L als Initiator einer gesteigerten Immunantwort auch für das Huhn eine Rolle in der Entwicklung neuartiger Vakzinen spielen.

### 6.2.3.2 Induktion von IL-6

Neben der Expression von MHCII war auch die Zytokinproduktion als Zeichen der CD40L-induzierten Aktivierung Gegenstand weiterer Untersuchungen. IL-6 war dabei von besonderer Bedeutung, da diesem Zytokin eine essentielle Rolle in der B-Zellentwicklung zukommt. So ist IL-6 neben der Proliferation maßgeblich an der Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen beteiligt. Da für humane CD40-aktivierte B-Zellkulturen neben IL-10 eine endogene IL-6-Produktion beschrieben wurde, die für die *in vitro* beobachtete Differenzierung zu Plasmazellen verantwortlich gemacht wurde, war die IL-6 Sekretion im Hinblick auf die Rolle des CD40-CD40L-Systems in der B-Zellentwicklung des Huhns von besonderem Interesse [216, 220].

Ein IL-6 Homolog konnte für das Huhn schon früh durch die Analyse von Aszites identifiziert werden. Die Generierung eines rekombinanten chIL-6 gelang allerdings erst später [286] [287]. Erste Versuche mit diesem rekombinanten chIL-6 zeigten dem Säuger vergleichbare Funktionen, wie z.B. die Induktion von erhöhten Kortikosteronspiegeln. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch verschiedene TLR-Liganden wie z.B. LPS die IL-6 Sekretion induzieren lässt [288]. Im Rahmen dieser Arbeit war es von Interesse, ob eine funktionelle Verbindung zwischen CD40L und der Induktion von IL-6 Sekretion durch B-Zellen analog zum Säugersystem besteht.

Erste Versuche mit Milzlymphozyten konnten eine signifikante IL-6 Produktion nach Stimulation mit rChCD40L nachweisen. Da aber von R. Klaas eindeutig gezeigt werden konnte, dass auch Makrophagen in der Lage sind, IL-6 zu bilden, und diese hier als CD40<sup>+</sup> Zellpopulation identifiziert wurden, waren weitere Versuche notwendig, um die zelluläre Herkunft des IL-6 zu klären [288]. Zu diesem Zweck wurden sowohl reine Makrophagenkulturen als auch gereinigte B-Zellkulturen mit rChCD40L stimuliert. Wie zu erwarten war, konnte für die Makrophagenkulturen eine signifikante Erhöhung der IL-6

Sekretion gezeigt werden, welche auch in B-Zellkulturen beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wurde auch für Säuger B-Zellen beschrieben [216].

Die Regulation der IL-6 Produktion durch das CD40-CD40L-System scheint durchaus komplex zu sein, da sowohl der Grad der Multimerisierung des CD40L als auch die vorliegende B-Zellpopulation die IL-6 Sekretion in hohem Maße beeinflussen. Zum einen konnte für murine B-Zellen gezeigt werden, dass eine IL-6 Sekretion durch membrangebundenen CD40L, jedoch nicht durch anti-CD40-Antikörper induziert werden kann [219]. Darüber hinaus scheinen B-Zellen des germinalen Zentrum nicht in der Lage zu sein, endogenes IL-6 zu bilden [218], was den über den B-Zellrezeptor vermittelten Überlebenssignalen einen höheren Stellenwert zuspricht und damit im Sinne der Affinitätsreifung ist.

Hinsichtlich der Struktur scheint auch für das Huhn die Kreuzvernetzung des CD40-Rezeptors ausschlaggebend und damit das Trimer die aktive Form des CD40L zu sein, da die Stimulation mit dem löslichen rChCD40L in einer signifikanten IL-6 Produktion resultiert. Dies muss jedoch durch Stimulationsversuche mit monomerem CD40L oder anti-CD40 Antikörper weiter bestätigt werden, da möglicherweise auch das Monomer in der Lage sein könnte, die Produktion von IL-6 zu induzieren. Inwiefern eine Differenzierung der IL-6 Sekretion innerhalb verschiedener B-Zellsubpopulationen beim Huhn vorliegt, konnte aufgrund mangelnder Marker nicht weiter untersucht werden. Die Tatsache, dass eine IL-6 Sekretion nach 48 h zu beobachten war, spricht zusammen mit der zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu beobachtenden Proliferation und vernachlässigbaren Antikörpertitern jedoch dafür, dass es sich bei diesen Zellen nicht um mit germinalen Zentrumszellen vergleichbare B-Zellen handelt. So scheinen diese B-Zellen vielmehr dem Stadium der beginnenden Zentrumsreaktion zu entsprechen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse auch im Huhn eine dem Säuger ähnliche Rolle vermuten lassen, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem mit einschließen.

#### **6.2.4 Langzeitkulturen**

Da es bisher nicht möglich war, primäre Hühner-B-Zellen länger als 72 h in Kultur zu halten, waren Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung, Reifung und Funktionen wie der Antikörperproduktion *in vitro* nicht möglich. Da die Kurzzeitkulturen schon erkennen ließen,

dass es mit rChCD40L möglich war, B-Zellen für mehr als 72 h am Leben zu erhalten und Proliferation zu messen, war daher der nächste Schritt zu überprüfen, wie lange B-Zellen mit rChCD40L in Kultur gehalten werden können.

Der erste Schritt bestand darin, das Medium der Zellkultur zu optimieren. Dazu wurden Lymphozyten in verschiedenen Medien unter CD40L-Stimulation kultiviert und die absolute Zellzahl lebender Zellen bzw. B-Zellen bestimmt.

#### **6.2.4.1 Einfluss des Mediums auf das Überleben von B-Zellen *in vitro***

Um das Kulturmedium zu optimieren, wurden zwei verschiedenen Grundmedien mit jeweils verschiedenen Zusätzen mit aus Bursa und Milz gewonnen Lymphozyten getestet. Ausschlaggebend für eine lange Lebensdauer der B-Zellen erwies sich dabei die Zugabe von Hühnerserum. Dies hatte jedoch zur Folge, dass eine Messung unspezifischer Antikörper nicht mehr möglich war und zur Klärung des Effekts von rChCD40L auf die Antikörperproduktion ein anderer Ansatz gewählt werden musste.

#### **6.2.4.2 Bestimmung der Proliferation in Langzeitkulturen**

Da in den vorangegangenen Experimenten zwar die Zellzahl bestimmt wurde, die Kulturen jedoch alle drei Tage jeweils 1:2 unter Verwerfen der Zellen geteilt wurden, waren zwar Aussagen über die generelle Viabilität der Zellen möglich, jedoch konnten keine Aussagen über die tatsächlich resultierende Zellzahl in diesen Kulturen gemacht werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Kulturen im folgenden Versuch weiterhin nach diesem Schema geteilt, jedoch wurden die abgenommenen Zellen in eine neue Delle verbracht und weiterkultiviert. Somit war es möglich, durch vereinigen aller so entstandenen Dellen die absolute B-Zellzahl ausgehend von der eingesetzten Zellzahl zu bestimmen.

Das Ergebnis aus drei verschiedenen Ansätzen von Milz-B-Zellen lässt über neun Tage eine nahezu exponentielle Zunahme der B-Zellzahl von  $1 \times 10^6$  auf ca.  $12 \times 10^6$  Zellen erkennen und bestätigt damit die in Kurzzeitkulturen gewonnen Daten. Gleichzeitig konnte in diesen Kulturen eine Zunahme an toten Zellen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Zunahme der lebenden B-Zellen hauptsächlich auf die Proliferation und weniger auf eine verlängerte Lebensdauer zurückgeht. Das Vorliegen eines organspezifischen Effekts konnte ausgeschlossen werden, da eine signifikante Zunahme der B-Zellzahlen über neun Tage auch

in gemischten Lymphozytenkulturen der Zäkaltonsille gezeigt werden konnte. Weiterhin bleibt jedoch zu klären, ob die Zunahme der Zellzahl durch die Proliferation aller eingesetzten Zellen verursacht wird, oder ob es sich dabei um eine Subpopulation handelt. Dies wird sowohl in CFSE-Experimenten, welche eine genaue Identifizierung der proliferierenden Zellen zulassen, als auch in Zellzyklusanalysen zu klären sein. Weiterhin können diese Experimente Aufschluss darüber geben, wie oft sich die Zellen nach rChD40L-Stimulation teilen. Erste eigene Beobachtungen zeigten bereits, dass sich alle B-Zellen teilen und auch nach Entzug des CD40L noch 24-48 h proliferieren.

Neben dem Huhn konnte eine anhaltende CD40L-induzierte Proliferation auch in Langzeitkulturen von porcinen B-Zellen gezeigt werden, allerdings war hier die Proliferationsrate mit einer Verdopplung der Zellzahl innerhalb einer Woche teilweise geringer, was möglicherweise auf die Verwendung von rekombinanten murinem CD40L zurückzuführen ist [256].

Interessanterweise sind B-Zell-Langzeitkulturen maturer B-Zellen für Hühner und Schweine ohne die Verwendung von IL-4 möglich; dies steht in klarem Gegensatz zu Langzeitkulturen humaner B-Zellen, welche von der Zugabe von IL-4 abhängig sind [289]. Wie schon bei der Proliferation der Hühner-B-Zellen in den Kurzzeitkulturen zu sehen war, scheint CD40L im Huhn eine ausgeprägtere Wirkung zu haben, als es für Maus und Mensch der Fall ist. Diese Vermutung setzt sich auch in der Betrachtung der Langzeitkulturen fort. Für das Schwein wäre eine ähnliche Situation denkbar, da zwar die Zugabe von exogenem IL-4 zu *in vitro* Kulturen synergistische Effekte erkennen lässt [256], aber eine IL-4 Expression in lymphatischen Organen verschiedener Rassen kaum zu beobachten ist [290]. Weiterhin konnte die Stimulation von porcinen T-Zellen durch PHA keine messbare IL-4 Sekretion auslösen [291]. Darüber hinaus wurde vor Kurzem gezeigt, dass IL-13 die Funktion von IL-4 für die Differenzierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Monozyten vollständig ersetzen kann [291]. Diese Daten lassen eine Rolle von IL-4 *in vivo* für das Schwein kritisch sehen. Auch in anderen GALT-Spezies lassen sich im Vergleich zur Maus vor allem im Hinblick auf die T-Zellen Unterschiede in der Funktion von IL-4 feststellen: während für murine T-Zellen IL-4 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor angesehen wird [292], lassen sich für das Schaf und das Rind keine Effekte auf T-Zellen erkennen [271, 293]. Darüber hinaus üben IL-4 und auch IL-10 im Gegensatz zur Maus keinen selektiven Effekt auf Th-1 Zellen aus und legt so nahe, dass das in der Maus entwickelte Modell einer strikten Trennung von Th-1 und Th-2 Antworten für das Rind nicht anwendbar scheint [294].

All diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass viele in der Maus erarbeitete Daten nicht uneingeschränkt für andere Spezies, speziell für die GALT-Spezies, übernommen werden können und somit durchaus Unterschiede in der Funktion einzelner Faktoren wie z.B. CD40L bestehen können.

#### 6.2.4.3 Phänotypisierung der B-Zellen

Um Einblick in die durch rChCD40L induzierte Entwicklung der B-Zellen zu erlangen, wurden verschiedene Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Während der Kultivierung der B-Zellen mit rChCD40L zeigte sich eine deutliche Entwicklung von kleinen Lymphozyten hin zu einer aus großen Lymphoblasten bestehenden Kultur. Dies ist schon 1986 für die Stimulation muriner B-Zellen mit Zellkulturüberständen aktivierter T-Helferzellen beschrieben worden und wurde in Zusammenhang mit dem Eintritt in den Zellzyklus und damit der Weiterentwicklung der B-Zellen gebracht [295, 296]. Diese Beobachtung wurde vor der Entdeckung des CD40-CD40L-Systems gemacht. Heute jedoch weiß man, dass dieser Effekt durch lösliches, von den aktivierten T-Zellen sezerniertes CD40L verursacht wurde. In einer späteren Studie von O’Nions et al. wurde in einer mit CD40L und IL-4 stimulierten humanen B-Zellkultur ebenfalls die Entwicklung von blastoiden Zellen beobachtet [274].

Um die entstandenen Lymphoblasten weiter zu charakterisieren, wurde die Expression verschiedener B-Zellmarker untersucht. Dabei zeigte sich, dass zu Beginn der Kultur alle B-Zellen chB6<sup>+</sup> waren und zudem IgM auf ihrer Oberfläche exprimierten, wohingegen nur ein Teil der B-Zellen zelluläres IgM aufwies. Dieser Phänotyp entspricht analog dem Maussystem einer ruhenden, maturen B-Zelle. Im weiteren Verlauf nahm jedoch die Expression von chB6 ab und das Antigen war nur noch auf einem Teil der B-Zellen zu finden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass chB6 zwar in frühen Stadien der B-Zellentwicklung und auch auf maturen B-Zellen exprimiert ist, auf Plasmazellen jedoch fehlt [297, 298]. Um diese B-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde zusätzlich die Expression von membranständigen und zytoplasmatischen IgM untersucht. Membranständiges IgM wurde auf allen B-Zellen bis Tag 12 gefunden, während erst ab Tag 6 alle B-Zellen positiv für zytoplasmatisches IgM waren. Darüber hinaus nahm die Frequenz sIgM<sup>+</sup> B-Zellen ab Tag 12 ab, so dass an Tag 18 alle B-Zellen einen chB6<sup>-</sup> sIgM<sup>-</sup> cIgM<sup>+</sup> Phänotyp aufwiesen, welcher damit Plasmazellen ähnelt. Diese sind somit ausschließlich mit cIgM zu charakterisieren, da alle restlichen Marker nicht mehr exprimiert werden. Interessant wäre es in diesem

Zusammenhang, entwicklungsabhängige Transkriptionsfaktoren zu bestimmen, um das Differenzierungsstadium eindeutig zu definieren. So ist für Maus und Mensch bekannt, dass BLIMP-1 ausschließlich während der Plasmazellentwicklung zu finden ist [299], während PAX-5 in diesem B-Zellstadium nicht mehr exprimiert wird und dessen Fehlen daher als Marker für Plasmazellen gilt [300].

Die für das Huhn beobachtete Abnahme des sIgM deckt sich mit den von Takamatsu et al. gezeigten Daten porziner B-Zellen: auch hier ließ sich IgM zunächst auf nahezu allen B-Zellen finden, während die Expression im weiteren Verlauf der Kultur kontinuierlich abnahm [256].

Die Phänotypisierung der Hühner-B-Zellen zeigt deutlich, dass durch CD40L nicht nur eine Proliferation der B-Zellen stattfindet, sondern auch eine Weiterentwicklung der B-Zellen induziert wird. Dies wird durch die Tatsache, dass rChCD40L-stimulierte B-Zellen auch in der Lage sind, IL-6 zu bilden, untermauert, da IL-6 zu einer terminalen Differenzierung zu Plasmazellen führt.

Bestätigt wird diese durch ähnliche Beobachtung in *in vitro* Kulturen humaner B-Zellen mit CD40L und IL-4. Im Gegensatz zu EBV-infizierten B-Zellen, die ein kontinuierliches Wachstum zeigten, war in Kulturen mit CD40L und IL-4 ein typischer Verlauf der Zellzahl zu sehen: innerhalb der ersten sieben Tage kam es zu einer exponentiellen Proliferation, der eine einwöchige Plateauphase folgte. In der dritten Woche konnte dann eine kontinuierliche Abnahme der B-Zellen beobachtet werden. Da diese jedoch nicht durch Seneszenz der Zellen bedingt war [232], konnte ein Verlassen des Zellzyklus und die Differenzierung zu Plasmazellen als Ursache identifiziert werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass diese Zellen im Verlauf der Kultur zunehmend IL-6 produzierten und die Expression aller untersuchten B-Zellmarker herunterreguliert wurden. Da es sich hierbei um einen durch CD40L induzierte Differenzierung handelt, konnte durch den Vergleich mit EBV-infizierten B-Zellen eindeutig geklärt werden, da diese unter Beibehaltung des blastoiden Phänotyps und des Expressionsmusters kontinuierlich proliferierten [274].

#### **6.2.4.4 Generierung KLH-spezifischer Antikörper**

Da die Hauptaufgabe der B-Zellen die Produktion spezifischer Antikörper ist und die Phänotypisierung für eine deutliche Plasmazellbildung sprach, wurde als nächstes die Bildung von Antikörpern durch rChCD40L-Stimulation *in vitro* untersucht. Da die Kultur von B-Zellen in hohem Maße von dem Zusatz von Hühnerserum abhängt (s. 5.5.1), konnte der Titer

unspezifischer Antikörper in diesem System nicht bestimmt werden. Es war daher nötig, ein System zur Generierung und Detektion spezifischer Antikörper zu etablieren. Zu diesem Zweck wurde KLH als Antigen gewählt und ein anti-KLH-ELISA für die Detektion ein KLH-spezifischer Antikörper-ELISA etabliert.

Für KLH-spezifische Antikörper vom IgM Isotyp zeigte sich in stimulierten Ansätzen eine signifikante Zunahme der Titer, während sich in den Kontrollen kaum Antikörper nachweisen ließen. Ein unterschiedlicher Verlauf konnte für KLH-spezifische IgG Antikörper beobachten: hier blieb der Titer für stimulierte Kulturen zu jedem Zeitpunkt gleich, während der Titer in Kontrollansätzen durch Teilen der Zellen sukzessive abnahm.

Somit liegt in den rChCD40L-stimulierten Kulturen tatsächlich eine Neubildung von KLH-spezifischem IgM und IgG vor. Ob dies durch eine Zunahme der IgM<sup>+</sup> bzw. IgG<sup>+</sup> Zellen oder eine verlängerte Lebensdauer dieser Zellen bedingt ist, konnte in diesem Versuch nicht geklärt werden. Weiterhin lässt sich keine Aussage über die Produktion der einzelnen Zellen machen, daher wird es nötig sein, einen ELISPOT-Assay für diese Fragestellung zu etablieren. Mithilfe dieses Assays ist es im Vergleich zu einem herkömmlichen ELISA, welcher nur die Gesamtmenge des produzierten Immunglobulins bestimmen kann, möglich, Aussagen über die Antikörpersekretion einer einzelnen Zelle zu machen.

Die im Huhn gezeigten spezifischen Antikörpertiter entsprechen mit einer ca. zweifachen Erhöhung der IgG-Titer und einem ca. sechsfachen Anstieg der IgM-Titer nicht den in der Maus gewonnenen Daten, da hier nur ein geringer oder kein Anstieg der unspezifischen Antikörperproduktion durch alleinige CD40L-Stimulation zu beobachten war [216, 270]. Um auszuschließen, dass dieser Effekt ausschließlich auf der rapiden Abnahme lebender B-Zellen in den Kontrollkulturen beruht, müssen weitere Untersuchungen mittels des bereits erwähnten ELISPOTs durchgeführt werden. Weiterhin bleibt abzuklären, ob eine weitere Steigerung der Antikörperproduktion durch die Zugabe anderer Zytokine wie z.B. IL-4 oder IL-10 [301, 302], wie sie für Maus und Mensch beschrieben ist, auch für das Huhn möglich ist.

Die erhöhten antigenspezifischen Antikörpertiter legen auch weitere Überlegungen im Rahmen der Vakzinierung nahe. CD40L wurde in neueren Studien als Adjuvans in DNA-Vakzinen eingesetzt, um die Immunantwort zu steigern. Um die langwierige Aufreinigung und die dadurch resultierende mögliche Verunreinigung zu umgehen, wird CD40L in diesen Studien direkt als Plasmid administriert. Im Mausmodell konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit einem Plasmid, das ein Fusionsprotein aus GFP und CD40L enthielt, nach drei Wochen zu einem ca. 10.000-fach höheren GFP-spezifischen Antikörpertiter führte, als die alleinige Immunisierung mit GFP. Darüber hinaus war dieser

Effekt unabhängig von der Größe des Immunogens und ausschließlich über CD40 vermittelt. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bildung von spezifischen Antikörpern *in vivo* abhängig von T-Zellen und damit von einer anhaltenden Stimulation durch CD40L ist [303]. Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien von DNA-Vakzinen in Schafen und Enten erzielt werden. Hier wurden jeweils Plasmide mit einem Fusionsprotein von CD40L und Herpesviren (bovines Herpesvirus/ Enten-Hepatitisvirus) verwendet und resultierten jeweils in einer Erhöhung der spezifischen Antikörpertiter [304, 305]. Da die Daten für das Huhn ebenfalls eine deutlich gesteigerte Antikörperproduktion zeigen, ist einer Verwendung von rChCD40L als potentielles Adjuvans somit auch dieser Spezies denkbar.

#### 6.2.4.5 Klassenwechsel

Der Klassenwechsel stellt bei Maus und Mensch eine der Hauptfunktionen des CD40-CD40L-Systems dar. Da in den stimulierten Langzeitkulturen sowohl eine Entwicklung zu Plasmazellen als auch eine Steigerung antigenspezifischen Antikörpertiter sowohl für IgM als auch für IgG zu beobachten waren, wurden die B-Zellen auch hinsichtlich ihrer Antikörperklassen untersucht.

Wie schon bei der Phänotypisierung gezeigt, waren an Tag 3 und darüber hinaus alle B-Zellen IgM<sup>+</sup>, während IgG-positive Zellen erstmals an Tag 9 in signifikanten Frequenzen zu finden waren. Ein Wechsel zu IgA war zu keinem Zeitpunkt zu beobachten. Auch für porcine B-Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild: hier konnte in CD40L stimulierten B-Zellkulturen nach einer Woche ein Isotypenwechsel zu IgG in 30% der B-Zellen festgestellt werden, während auch hier kein Wechsel zu IgA erfolgte [256].

Ausgehend von der geringen Anzahl von zwei unterschiedlichen Tieren können die Daten für das Huhn nur als vorläufige Ergebnisse gewertet werden und müssen durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Sie weisen jedoch deutlich darauf hin, dass ein CD40L induzierter Klassenwechsel, wie er für das Maussystem schon eingehend beschrieben wurde, auch im Huhn vorliegen könnte. Von besonderem Interesse wäre in diesem Zusammenhang die offensichtliche Unabhängigkeit des von CD40L induzierten Klassenwechsels zu IgG von weiteren Zytokinen, vor allem IL-4. Dies wurde schon für das Schwein beschrieben und bestärkt zusammen mit den IL-4 unabhängigen B-Zellkulturen für Schwein und Huhn die These, dass dem CD40-CD40L-System in diesen Spezies eine besondere Rolle zukommt. Dies schließt jedoch die Möglichkeit, dass eine Zugabe von IL-4 und/oder IL-10 zu einer weiteren signifikanten

Steigerung des Klassenwechsels führen kann nicht aus und bleibt weiterhin zu untersuchen. Da im Gegensatz zu IgG kein Klassenwechsel zu IgA beobachtet werden konnte, liegt die Überlegung nahe, dass auch für das Huhn eine spezifische Beeinflussung des Isotypenwechsels durch bestimmte Zytokine vorliegt. Dies ist für die Maus bereits bewiesen: hier führt beispielsweise die Zugabe von IL-4 zur Bildung von IgE [306] oder zusammen mit TGF- $\beta$  zu IgA<sup>+</sup> Zellen [307].

### 6.3 Ausblick

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit haben sich zwei weiterführende Ansätze entwickelt: einerseits konnte durch die Etablierung von Langzeitkulturen ein System zur Erforschung der B-Zellen des Huhns geschaffen werden. Dies eröffnet nun die Möglichkeit, die B-Zellentwicklung des Huhns weiter zu studieren und neue Erkenntnisse in der Differenzierung der B-Zellen zu gewinnen. Auch kann nun geklärt werden, welche Rolle verschiedene Zytokine in der Entwicklung dieser Zellen spielen. Da IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 und TGF- $\beta$  für das Huhn bereits beschrieben sind und diesen Zytokinen im Maussystem verschiedene Funktionen für die B-Zellentwicklung zukommen, bieten die Langzeitkulturen von Hühner-B-Zellen nun die Möglichkeit, deren Effekt auch im Hühnermodell zu testen. Zusätzlich ist es jetzt möglich, auch die Wirt-Pathogen-Interaktionen verschiedener Erreger im Detail zu studieren. Dies ist sowohl für die infektiöse Bursitis, welche zu einer völligen Depletion der B-Zellen führt [308], als auch für Marek, da hier in frühen Stadien der Infektion eine Replikation in den B-Zellen stattfindet [309], von Bedeutung. Diese Erkenntnisse führen letztendlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und können so Ausgangspunkt für effektivere Therapien und Vakzinen sein.

Der zweite weiterführende Ansatz liegt in der Verwendung von rChCD40L als Vakzineadjuvans. Da in der vorliegenden Arbeit sowohl eine mögliche Steigerung der Antigenpräsentation durch die vermehrte Expression von MHCII-Molekülen als auch eine Erhöhung spezifischer Antikörpertiter *in vitro* gezeigt werden konnte, kann rChCD40L durchaus ein mögliches Adjuvans darstellen, wie es für die Ente bereits beschrieben wurde. Da Hühner gegen eine Vielzahl von Krankheiten geimpft werden, sind effektive Vakzinen ein wichtiger Bestandteil in der Geflügelindustrie.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass das Huhn durchaus als Modell für die GALT-Spezies gelten kann, da viele Funktionen des CD40-CD40L-Systems für das Huhn, das Rind

und das Schwein konserviert sind. So kommt CD40L in all diesen Spezies eine Rolle in der Proliferation, der Differenzierung und der Generierung von Antikörpern zu. Ausgehend von der grundlegend verschiedenen frühen B-Zellentwicklung ist das Mausmodell in vielen Punkten für diese Spezies ungeeignet. Dies konnte durch die hier gezeigte IL-4 unabhängige Induzierung von Proliferation und Klassenwechsel, wie sie schon für das Schwein beschreiben wurde, nun auch für die späte B-Zellentwicklung gezeigt werden.

## 7 Zusammenfassung

Die B-Zellentwicklung der Vögel zeigt im Vergleich zu Maus und Mensch grundsätzliche Unterschiede. Davon ausgehend konnte in neuerer Zeit auch für die meisten Haustierspezies gezeigt werden, dass sie für die Reifung ihrer B-Zellen darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) verwenden. Da Hühner-B-Zellen in einem einzigartigen GALT-Organ, der Bursa fabricii reifen, stellt das Huhn ein exzellentes Modell dar, um die zugrunde liegenden Mechanismen der B-Zellreifung zu studieren. Zahlreiche Mausmodelle zeigen, dass TNF-TNF-R- Familienmitglieder wichtige Regulatoren der B-Zellreifung und -funktion darstellen. Um die Struktur und die Funktion des CD40-CD40L-Systems im Huhn zu untersuchen, wurde zuerst das CD40-Expressionsmuster auf hämatopoetischen Zellen und verschiedenen Zelllinien mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers AV79 analysiert. Alle B-Zellen aus Blut, Milz, Zäkaltonsillen und der Bursa exprimierten das CD40-Antigen. Im Gegensatz dazu konnte CD40 nur auf einer Subpopulation der T-Zellen gefunden werden. Bei der Analyse von Zelllinien konnten sowohl eine B-Zelllinie als auch eine T-Zelllinie sowie embryonale Fibroblasten als CD40<sup>+</sup> Zellen identifiziert werden.

Um die funktionelle Rolle von CD40 im B-Zellsystem zu studieren, wurden B-Zellen aus Bursa, Milz und Zäkaltonsillen mit einem rekombinanten CD40L-Konstrukt stimuliert. Die Zugabe von rChCD40L verlängerte die Lebensspanne von B-Zellen signifikant und induzierte sowohl eine Proliferation der B-Zellen als auch einen Klassenwechsel der Immunglobuline. Die Aktivierung der B-Zellen durch rChCD40L führt zu einer verstärkten Expression von MHCII-Molekülen sowie zur Sekretion von IL-6. Zusätzlich konnten durch rChCD40L erstmals Langzeitkulturen primärer Hühner-B-Zellen etabliert werden. In diesen Langzeitkulturen war rChCD40L in der Lage, die antigenspezifischen Antikörpertiter in *in vitro*-Kulturen von Milz-B-Zellen immunisierter Tiere signifikant zu erhöhen.

Ausgehend von diesen Daten kann auf eine essentielle Rolle des CD40-CD40L-Systems in der Entwicklung und der Funktion der B-Zellen in einem nicht zu den Säugetieren gehörenden Wirbeltier geschlossen werden. Somit stellt das CD40-CD40L-System ein phylogenetisch konserviertes System dar. Darüber hinaus bietet die Etablierung von Langzeitkulturen primärer Hühner-B-Zellen ein neues Werkzeug für Studien zur Wirt-Pathogen-Interaktion.

## 8 Summary

### Characterisation of the CD40-CD40L-system as important regulator of chicken B-cell function

B cell development in birds shows fundamental differences from that in mouse and man. However, more recently it became apparent that most domestic animal species with the chicken as model organism use gut associated lymphoid tissue (GALT) to mature their B cell repertoire. In chickens, B cells develop in a unique GALT organ, the bursa of Fabricius; hence the chicken provides an excellent model to study the underlying mechanisms. Various mouse models show that members of the TNF-TNF-R family are important regulators of B cell maturation and function. To investigate the structure and function of the CD40-CD40L system in the chicken, the CD40 expression patterns on haematopoietic cells and different cell lines were first analyzed by means of flow cytometry using mab AV79. All B lymphocytes obtained from blood, spleen, cecal tonsils and the bursa of Fabricii expressed the CD40 antigen. In contrast, CD40 expression was only found on small subpopulations of T-lymphocytes. Regarding cell lines, a B cell line as well as a T cell line and an embryonic fibroblast line were found to be CD40<sup>+</sup>. To examine the functional role of CD40 in the B cell system, bursal, cecal tonsil and spleen cell cultures were stimulated with a soluble recombinant CD40L construct. rChCD40L treatment significantly prolonged the life span of B cells and induced B cell proliferation in all B cell cultures as well as isotype switching. Activation of B cells with rChCD40L up regulated MHC class II expression and increased the secretion of IL-6. Moreover, a long term culture system for primary chicken B cells could be established for the first time using rChCD40L. Using this culture system, stimulation with rChCD40L was able to significantly enhance antigen-specific antibody titers in splenic B cell cultures from immunized birds *in vitro*.

From these data it can be concluded that the CD40-CD40L system has an essential role in B cell development and function in non mammalian vertebrates and represents a phylogenetically conserved regulatory system. Furthermore, the establishment of long term cultures of primary chicken B cells provides a new tool for studies on pathogen-host-interaction.

## 9 Literaturverzeichnis

- 1 **Kaisho, T. and Akira, S.**, Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006. **117**: 979-987; quiz 988.
- 2 **Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.**, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.
- 3 **Moser, B., Wolf, M., Walz, A. and Loetscher, P.**, Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004. **25**: 75-84.
- 4 **Banyer, J. L., Hamilton, N. H., Ramshaw, I. A. and Ramsay, A. J.**, Cytokines in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* 2000. **2**: 359-373.
- 5 **Kohl, J.**, The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006. **34**: 157-176.
- 6 **Scheltonka, R. L. and Infante, A. J.**, Neonatal immunology. *Semin Perinatol* 1998. **22**: 2-14.
- 7 **Reis e Sousa, C.**, Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004. **16**: 21-25.
- 8 **Stout, R. D. and Suttles, J.**, T cell-macrophage cognate interaction in the activation of macrophage effector function by Th2 cells. *J Immunol* 1993. **150**: 5330-5337.
- 9 **Smith, K. M., Pottage, L., Thomas, E. R., Leishman, A. J., Doig, T. N., Xu, D., Liew, F. Y. and Garside, P.**, Th1 and Th2 CD4+ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo. *J Immunol* 2000. **165**: 3136-3144.
- 10 **McHeyzer-Williams, M. G., McHeyzer-Williams, L. J., Fanelli Panus, J., Bikah, G., Pogue-Caley, R. R., Driver, D. J. and Eisenbraun, M. D.**, Antigen-specific immunity. Th cell-dependent B cell responses. *Immunol Res* 2000. **22**: 223-236.
- 11 **Snapper, C. M. and Mond, J. J.**, A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J Immunol* 1996. **157**: 2229-2233.
- 12 **Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. and Becker, J. C.**, Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006. **126**: 32-41.
- 13 **Janeway, C.**, *Immunobiology*, 5 Edn. Garland Publishing, New York: 2001.
- 14 **Carsetti, R., Rosado, M. M. and Wardmann, H.**, Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004. **197**: 179-191.
- 15 **Thorbecke, G. J., Amin, A. R. and Tsiagbe, V. K.**, Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *Faseb J* 1994. **8**: 832-840.
- 16 **Muljo, S. A. and Schlissel, M. S.**, Pre-B and pre-T-cell receptors: conservation of strategies in regulating early lymphocyte development. *Immunol Rev* 2000. **175**: 80-93.
- 17 **Sugimoto, M., Yasuda, T. and Egashira, Y.**, Development of the embryonic chicken thymus. I. Characteristic synchronous morphogenesis of lymphocytes accompanied by the appearance of an embryonic thymus-specific antigen. *Dev Biol* 1977. **56**: 281-292.
- 18 **Chen, C. L., Bucy, R. P. and Cooper, M. D.**, T cell differentiation in birds. *Semin Immunol* 1990. **2**: 79-86.
- 19 **Ratcliffe, M. J.**, B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2002. **87**: 337-340.
- 20 **Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E.**, *Lehrbuch der Anatomier der Haustiere. Bd.5 Anatomie der Vögel*. Parey Berlin, Hamburg: 1992.

- 21 **Jeurissen, S. H., Janse, E. M., Koch, G. and De Boer, G. F.**, Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res* 1989. **258**: 119-124.
- 22 **Gomez Del Moral, M., Fonfria, J., Varas, A., Jimenez, E., Moreno, J. and Zapata, A. G.**, Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil. *Anat Rec* 1998. **250**: 182-189.
- 23 **Olah, I., Nagy, N., Magyar, A. and Palya, V.**, Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poult Sci* 2003. **82**: 767-770.
- 24 **Fagerland, J. A. and Arp, L. H.**, Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. *Avian Dis* 1993. **37**: 10-18.
- 25 **Mueller, A. P., Sato, K. and Glick, B.**, The chicken lacrimal gland, gland of Harder, caecal tonsil, and accessory spleens as sources of antibody-producing cells. *Cell Immunol* 1971. **2**: 140-152.
- 26 **Andreasen, C. B., Latimer, K. S., Harmon, B. G., Glisson, J. R., Golden, J. M. and Brown, J.**, Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Vet Pathol* 1991. **28**: 419-427.
- 27 **Caxton-Martins, A. E. and Daimon, T.**, Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. *J Anat* 1976. **122**: 553-558.
- 28 **Gobel, T. W., Kaspers, B. and Stangassinger, M.**, NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 2001. **13**: 757-762.
- 29 **Houssaint, E., Mansikka, A. and Vainio, O.**, Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med* 1991. **174**: 397-406.
- 30 **Luhtala, M., Salomonsen, J., Hirota, Y., Onodera, T., Toivanen, P. and Vainio, O.**, Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 1993. **12**: 633-646.
- 31 **Gobel, T. W., Schneider, K., Schaerer, B., Mejri, I., Puehler, F., Weigend, S., Staeheli, P. and Kaspers, B.**, IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J Immunol* 2003. **171**: 1809-1815.
- 32 **Sayegh, C. E., Demaries, S. L., Pike, K. A., Friedman, J. E. and Ratcliffe, M. J.**, The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol Rev* 2000. **175**: 187-200.
- 33 **Glick, B.**, Bursa of fabricius references. *Worlds Poult Sci J* 1971. **27**: 187-188.
- 34 **Weill, J. C. and Reynaud, C. A.**, Galt versus bone marrow models of B cell ontogeny. *Dev Comp Immunol* 1998. **22**: 379-385.
- 35 **Flajnik, M. F.**, Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 688-698.
- 36 **Houssaint, E., Belo, M. and Le Douarin, N. M.**, Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Dev Biol* 1976. **53**: 250-264.
- 37 **Reynaud, C. A., Imhof, B. A., Anquez, V. and Weill, J. C.**, Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *Embo J* 1992. **11**: 4349-4358.
- 38 **Pink, J. R., Vainio, O. and Rijnbeek, A. M.**, Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius. *Eur J Immunol* 1985. **15**: 83-87.
- 39 **Le Douarin, H., Jotereau, H.**, Differentiation of the primary lymphoid organs in avian embryos: origin and homing of the lymphoid stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 1977. **88**: 29-37.

- 40 **Aliahmad, P., Pike, K. A. and Ratcliffe, M. J.**, Cell surface immunoglobulin regulated checkpoints in chicken B cell development. *Vet Immunol Immunopathol* 2005. **108**: 3-9.
- 41 **Ratcliffe, M. J., Lassila, O., Pink, J. R. and Vainio, O.**, Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur J Immunol* 1986. **16**: 129-133.
- 42 **Paramithiotis, E., Jacobsen, K. A. and Ratcliffe, M. J.**, Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius. *J Exp Med* 1995. **181**: 105-113.
- 43 **McCormack, W. T., Tjoelker, L. W., Barth, C. F., Carlson, L. M., Petryniak, B., Humphries, E. H. and Thompson, C. B.**, Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Dev* 1989. **3**: 838-847.
- 44 **Ratcliffe, M. J. and Tkalec, L.**, Cross-linking of the surface immunoglobulin on lymphocytes from the bursa of Fabricius results in second messenger generation. *Eur J Immunol* 1990. **20**: 1073-1078.
- 45 **Pike, K. A., Iacampo, S., Friedmann, J. E. and Ratcliffe, M. J.**, The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to support efficient early B cell development. *J Immunol* 2004. **172**: 2210-2218.
- 46 **Reynaud, C. A., Anquez, V., Dahan, A. and Weill, J. C.**, A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 1985. **40**: 283-291.
- 47 **Reynaud, C. A., Anquez, V., Grimal, H. and Weill, J. C.**, A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 1987. **48**: 379-388.
- 48 **McCormack, W. T., Tjoelker, L. W. and Thompson, C. B.**, Immunoglobulin gene diversification by gene conversion. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1993. **45**: 27-45.
- 49 **Weinstein, P. D., Anderson, A. O. and Mage, R. G.**, Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunity* 1994. **1**: 647-659.
- 50 **Ekino, S., Nawa, Y., Tanaka, K., Matsuno, K., Fujii, H. and Kotani, M.**, Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1980. **58**: 289-296.
- 51 **Lassila, O.**, Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *Eur J Immunol* 1989. **19**: 955-958.
- 52 **Paramithiotis, E. and Ratcliffe, M. J.**, Survivors of bursal B cell production and emigration. *Poult Sci* 1994. **73**: 991-997.
- 53 **Vainio, O., Viljanen, M. K. and Toivanen, A.**, Early ontogeny of germinal center formation in the chicken. *Dev Comp Immunol* 1978. **2**: 493-504.
- 54 **Kroese, F. G., Wubbena, A. S., Seijen, H. G. and Nieuwenhuis, P.**, Germinal centers develop oligoclonally. *Eur J Immunol* 1987. **17**: 1069-1072.
- 55 **Tew, J. G., Burton, G. F., Szakal, A. K. and Kosco, M. H.**, A subpopulation of germinal center B cells differentiate directly into antibody forming cells upon secondary immunization. *Adv Exp Med Biol* 1988. **237**: 215-220.
- 56 **Hirota, Y., Vainio, O. and Toivanen, P.**, T cell dependent B cell differentiation in the chicken. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 1981. **89**: 145-153.
- 57 **Durkin, H. G., Theis, G. A. and Thorbecke, G. J.**, Bursa of fabricius as site of origin of germinal centre cells. *Nat New Biol* 1972. **235**: 118-119.
- 58 **Yasuda, M., Kajiwara, E., Ekino, S., Taura, Y., Hirota, Y., Horiuchi, H., Matsuda, H. and Furusawa, S.**, Immunobiology of chicken germinal center: I.

- Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. *Dev Comp Immunol* 2003. **27**: 159-166.
- 59 **Arakawa, H., Furusawa, S., Ekino, S. and Yamagishi, H.**, Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. *Embo J* 1996. **15**: 2540-2546.
- 60 **Arakawa, H., Kuma, K., Yasuda, M., Furusawa, S., Ekino, S. and Yamagishi, H.**, Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers. *J Immunol* 1998. **160**: 4232-4241.
- 61 **Yasuda, M., Taura, Y., Yokomizo, Y. and Ekino, S.**, A comparative study of germinal center: fowls and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998. **21**: 179-189.
- 62 **Winding, P. and Berchtold, M. W.**, The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods* 2001. **249**: 1-16.
- 63 **Weinstein, P. D., Mage, R. G. and Anderson, A. O.**, The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv Exp Med Biol* 1994. **355**: 249-253.
- 64 **Yasuda, M., Jenne, C. N., Kennedy, L. J. and Reynolds, J. D.**, The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet Res* 2006. **37**: 401-415.
- 65 **Butler, J. E., Sinkora, M., Wertz, N., Holtmeier, W. and Lemke, C. D.**, Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet Res* 2006. **37**: 417-441.
- 66 **Butler, J. E., Sun, J., Wertz, N. and Sinkora, M.**, Antibody repertoire development in swine. *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 199-221.
- 67 **Jenne, C. N., Kennedy, L. J. and Reynolds, J. D.**, Antibody repertoire development in the sheep. *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 165-174.
- 68 **Zhao, Y., Jackson, S. M. and Aitken, R.**, The bovine antibody repertoire. *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 175-186.
- 69 **Butler, J. E.**, Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev Sci Tech* 1998. **17**: 43-70.
- 70 **Wagner, B.**, Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 155-164.
- 71 **HogenEsch, H. and Felsburg, P. J.**, Isolation and phenotypic and functional characterization of cells from Peyer's patches in the dog. *Vet Immunol Immunopathol* 1992. **31**: 1-10.
- 72 **Bodmer, J. L., Schneider, P. and Tschopp, J.**, The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 2002. **27**: 19-26.
- 73 **Gaur, U. and Aggarwal, B. B.**, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003. **66**: 1403-1408.
- 74 **Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.**, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975. **72**: 3666-3670.
- 75 **Williams, T. W. and Granger, G. A.**, Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* 1968. **219**: 1076-1077.
- 76 **Hehlgans, T. and Pfeffer, K.**, The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005. **115**: 1-20.
- 77 **Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J.**, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001. **104**: 487-501.
- 78 **Larrick, J. W. and Kunkel, S. L.**, The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. *Pharm Res* 1988. **5**: 129-139.

- 79 **Nagata, S.**, Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes Cells* 1996. **1**: 873-879.
- 80 **Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S. C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C. R., Lacey, D. L. and Boyle, W. J.**, RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 1566-1571.
- 81 **Fata, J. E., Kong, Y. Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Khokha, R. and Penninger, J. M.**, The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000. **103**: 41-50.
- 82 **Mikkola, M. L. and Thesleff, I.**, Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003. **14**: 211-224.
- 83 **Metheny-Barlow, L. J. and Li, L. Y.**, Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), an endogenous negative regulator of angiogenesis. *Semin Ophthalmol* 2006. **21**: 49-58.
- 84 **Yamashita, T., Fujitani, M., Hata, K., Mimura, F. and Yamagishi, S.**, Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int* 2005. **80**: 37-41.
- 85 **Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F. and Lesslauer, W.**, Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 1993. **268**: 26350-26357.
- 86 **Chen, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., Gambie, J., Bachinger, H. P., Ferguson, B., Zonana, J., Thomas, G. and Morris, N. P.**, Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. **98**: 7218-7223.
- 87 **Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S.**, Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998. **4**: 31-36.
- 88 **Eissner, G., Kolch, W. and Scheurich, P.**, Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004. **15**: 353-366.
- 89 **Ferran, C., Dautry, F., Merite, S., Sheehan, K., Schreiber, R., Grau, G., Bach, J. F. and Chatenoud, L.**, Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo. *J Clin Invest* 1994. **93**: 2189-2196.
- 90 **Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J. and Schneider, P.**, Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 2006. **281**: 13964-13971.
- 91 **Liu, Y., Hong, X., Kappler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C. H., Martin, W. E., Murphy, R. C., Shu, H. B., Dai, S. and Zhang, G.**, Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* 2003. **423**: 49-56.
- 92 **Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W. J.**, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997. **89**: 309-319.
- 93 **Van Zee, K. J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C. S., Moldawer, L. L. and Lowry, S. F.**, Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and

- clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 4845-4849.
- 94 **Idriss, H. T. and Naismith, J. H.**, TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000. **50**: 184-195.
- 95 **Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G.**, The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994. **76**: 959-962.
- 96 **Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J.**, A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000. **288**: 2351-2354.
- 97 **Fesik, S. W.**, Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000. **103**: 273-282.
- 98 **Lee, N. K. and Lee, S. Y.**, Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *J Biochem Mol Biol* 2002. **35**: 61-66.
- 99 **Ni, C. Z., Welsh, K., Zheng, J., Havert, M., Reed, J. C. and Ely, K. R.**, Crystallization and preliminary X-ray analysis of the TRAF domain of TRAF3. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002. **58**: 1340-1342.
- 100 **Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q. and Cheng, G.**, The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003. **14**: 193-209.
- 101 **Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L. and Wu, H.**, Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* 1999. **398**: 533-538.
- 102 **Garg, A. K. and Aggarwal, B. B.**, Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* 2002. **39**: 509-517.
- 103 **Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.**, Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999. **11**: 255-260.
- 104 **Cha, G. H., Cho, K. S., Lee, J. H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S. B. and Chung, J.**, Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2003. **23**: 7982-7991.
- 105 **Wajant, H., Muhlenbeck, F. and Scheurich, P.**, Identification of a TRAF (TNF receptor-associated factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Evol* 1998. **47**: 656-662.
- 106 **Zou, J., Secombes, C. J., Long, S., Miller, N., Clem, L. W. and Chinchar, V. G.**, Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 2003. **27**: 845-858.
- 107 **Hirono, I., Nam, B. H., Kurobe, T. and Aoki, T.**, Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Immunol* 2000. **165**: 4423-4427.
- 108 **Laing, K. J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T. and Secombes, C. J.**, Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 2001. **268**: 1315-1322.
- 109 **Kuhnert, P., Wuthrich, C., Peterhans, E. and Pauli, U.**, The porcine tumor necrosis factor-encoding genes: sequence and comparative analysis. *Gene* 1991. **102**: 171-178.
- 110 **Shoji, Y., Inoue, Y., Sugisawa, H., Itou, T., Endo, T. and Sakai, T.**, Molecular cloning and functional characterization of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) tumor necrosis factor alpha. *Vet Immunol Immunopathol* 2001. **82**: 183-192.
- 111 **Yoo, J., Stone, R. T. and Beattie, C. W.**, Cloning and characterization of the bovine Fas. *DNA Cell Biol* 1996. **15**: 227-234.

- 112 **Hirano, A., Brown, W. C. and Estes, D. M.**, Cloning, expression and biological function of the bovine CD40 homologue: role in B-lymphocyte growth and differentiation in cattle. *Immunology* 1997. **90**: 294-300.
- 113 **Bridgham, J. T. and Johnson, A. L.**, Characterization of chicken TNFR superfamily decoy receptors, DcR3 and osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. **307**: 956-961.
- 114 **Bridgham, J. T. and Johnson, A. L.**, Avian TVB (DR5-like) death receptor expression in hen ovarian follicles. *Biochem Biophys Res Commun* 2002. **291**: 226-232.
- 115 **Bridgham, J. T., Bobe, J., Goetz, F. W. and Johnson, A. L.**, Conservation of death receptor-6 in avian and piscine vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* 2001. **284**: 1109-1115.
- 116 **Hong, Y. H., Lillehoj, H. S., Hyen Lee, S., Woon Park, D. and Lillehoj, E. P.**, Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF). *Dev Comp Immunol* 2006. **30**: 919-929.
- 117 **Abdalla, S. A., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.**, Molecular study on chicken tumor necrosis factor receptor-II and tumor necrosis factor receptor-associated factor-5. *Vet Immunol Immunopathol* 2004. **98**: 31-41.
- 118 **Bridgham, J. T. and Johnson, A. L.**, Expression and regulation of Fas antigen and tumor necrosis factor receptor type I in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 2001. **65**: 733-739.
- 119 **Houghton, L., Lindon, C. and Morgan, B. A.**, The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* 2005. **132**: 863-872.
- 120 **Abdalla, S. A., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.**, Molecular cloning and characterization of chicken tumor necrosis factor (TNF)-superfamily ligands, CD30L and TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *J Vet Med Sci* 2004. **66**: 643-650.
- 121 **Schneider, K., Kothlow, S., Schneider, P., Tardivel, A., Gobel, T., Kaspers, B. and Staeheli, P.**, Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *Int Immunol* 2004. **16**: 139-148.
- 122 **Arciniegas, E., Becerra, A., De Sanctis, J. B., Graterol, A. and Ramirez, R.**, CD40 and CD40L expression in the chicken embryo aorta: possible role in the endothelial-mesenchymal transdifferentiation process. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003. **274**: 942-951.
- 123 **Tregaskes, C. A., Glansbeek, H. L., Gill, A. C., Hunt, L. G., Burnside, J. and Young, J. R.**, Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Dev Comp Immunol* 2005. **29**: 361-374.
- 124 **Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P. A., Olsen, H. S., Migone, T. S., Sosnovtseva, S., Carrell, J. A., Feng, P., Giri, J. G. and Hilbert, D. M.**, Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 2001. **97**: 198-204.
- 125 **Bossen, C. and Schneider, P.**, BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006.
- 126 **Liu, Y., Xu, L., Opalka, N., Kappler, J., Shu, H. B. and Zhang, G.**, Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell* 2002. **108**: 383-394.
- 127 **Cachero, T. G., Schwartz, I. M., Qian, F., Day, E. S., Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Krushinskie, D., Eldredge, J., Silvian, L., Lugovskoy, A., Farrington, G. K., Strauch, K., Schneider, P. and Whitty, A.**, Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor). *Biochemistry* 2006. **45**: 2006-2013.

- 128 **Gavin, A. L., Duong, B., Skog, P., Ait-Azzouzene, D., Greaves, D. R., Scott, M. L. and Nemazee, D.,** deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. *J Immunol* 2005. **175**: 319-328.
- 129 **Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M. L.,** An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001. **293**: 2111-2114.
- 130 **Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. and Schmidt-Supprian, M.,** TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* 2004. **173**: 2245-2252.
- 131 **Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., MacKay, F., Rao, S. P., Kalled, S. L. and Scott, M. L.,** B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 2004. **173**: 2331-2341.
- 132 **Hsu, B. L., Harless, S. M., Lindsley, R. C., Hilbert, D. M. and Cancro, M. P.,** Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 2002. **168**: 5993-5996.
- 133 **Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J. and Browning, J. L.,** Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999. **190**: 1697-1710.
- 134 **Brink, R.,** Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Semin Immunol* 2006.
- 135 **Groom, J., Kalled, S. L., Cutler, A. H., Olson, C., Woodcock, S. A., Schneider, P., Tschopp, J., Cachero, T. G., Batten, M., Wheway, J., Mauri, D., Cavill, D., Gordon, T. P., Mackay, C. R. and Mackay, F.,** Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 2002. **109**: 59-68.
- 136 **Gross, J. A., Dillon, S. R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K. P., Haugen, H., McMillen, S., Waggle, K., Schreckhise, R. W., Shoemaker, K., Vu, T., Moore, M., Grossman, A. and Clegg, C. H.,** TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity* 2001. **15**: 289-302.
- 137 **Woodland, R. T., Schmidt, M. R. and Thompson, C. B.,** BLyS and B cell homeostasis. *Semin Immunol* 2006. **18**: 318-326.
- 138 **Rahman, Z. S., Rao, S. P., Kalled, S. L. and Manser, T.,** Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med* 2003. **198**: 1157-1169.
- 139 **Vora, K. A., Wang, L. C., Rao, S. P., Liu, Z. Y., Majeau, G. R., Cutler, A. H., Hochman, P. S., Scott, M. L. and Kalled, S. L.,** Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* 2003. **171**: 547-551.
- 140 **Kalled, S. L.,** Impact of the BAFF/BR3 axis on B cell survival, germinal center maintenance and antibody production. *Semin Immunol* 2006. **18**: 290-296.
- 141 **Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P. and Cerutti, A.,** DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002. **3**: 822-829.
- 142 **Koskela, K., Nieminen, P., Kohonen, P., Salminen, H. and Lassila, O.,** Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius. *Scand J Immunol* 2004. **59**: 449-457.
- 143 **Kothlow, S., Morgenroth, I., Graef, Y., Schneider, K., Riehl, I., Staeheli, P., Schneider, P. and Kaspers, B.,** Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. *Int Immunol* 2007. **19**: 203-215.

- 144 **Allen, R. C., Armitage, R. J., Conley, M. E., Rosenblatt, H., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bedell, M. A., Edelhoff, S., Disteche, C. M., Simoneaux, D. K. and et al.,** CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993. **259**: 990-993.
- 145 **Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L. S., Stenkamp, R., Neubauer, M. and et al.,** The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993. **72**: 291-300.
- 146 **Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J. A. and Noelle, R. J.,** The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol* 1993. **151**: 2497-2510.
- 147 **Cronin, D. C., 2nd, Stack, R. and Fitch, F. W.,** IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. *J Immunol* 1995. **154**: 3118-3127.
- 148 **Casamayor-Palleja, M., Khan, M. and MacLennan, I. C.,** A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med* 1995. **181**: 1293-1301.
- 149 **Castle, B. E., Kishimoto, K., Stearns, C., Brown, M. L. and Kehry, M. R.,** Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993. **151**: 1777-1788.
- 150 **Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C. and Kroczeck, R. A.,** A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995. **25**: 1749-1754.
- 151 **Boisvert, J., Edmondson, S. and Krummel, M. F.,** Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites. *J Immunol* 2004. **173**: 3647-3652.
- 152 **Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Mazzei, G., Life, P., Jomotte, T., Elson, G. and Bonnefoy, J. Y.,** Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS Lett* 1993. **315**: 259-266.
- 153 **Gray, J. D., Liu, T., Huynh, N. and Horwitz, D. A.,** Transforming growth factor beta enhances the expression of CD154 (CD40L) and production of tumor necrosis factor alpha by human T lymphocytes. *Immunol Lett* 2001. **78**: 83-88.
- 154 **Lesley, R., Kelly, L. M., Xu, Y. and Cyster, J. G.,** Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. **103**: 10717-10722.
- 155 **Gauchat, J. F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J. P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., Aldebert, D. and et al.,** CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol* 1995. **25**: 863-865.
- 156 **Gauchat, J. F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J. P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores-Romo, L., Thompson, J. and et al.,** Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993. **365**: 340-343.
- 157 **Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. and Kroczeck, R. A.,** CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998. **391**: 591-594.
- 158 **Grammer, A. C., Bergman, M. C., Miura, Y., Fujita, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E.,** The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol* 1995. **154**: 4996-5010.
- 159 **Wykes, M., Poudrier, J., Lindstedt, R. and Gray, D.,** Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur J Immunol* 1998. **28**: 548-559.

- 160 **Wykes, M.**, Why do B cells produce CD40 ligand? *Immunol Cell Biol* 2003. **81**: 328-331.
- 161 **Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K. and Zappacosta, S.**, A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997. **185**: 2053-2060.
- 162 **Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J.**, Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994. **180**: 1263-1272.
- 163 **Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Bourcier, T., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S. and Libby, P.**, Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 1931-1936.
- 164 **Tsitsikov, E. N., Ramesh, N. and Geha, R. S.**, Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol Immunol* 1994. **31**: 895-900.
- 165 **Graf, D., Korthauer, U., Mages, H. W., Senger, G. and Kroczek, R. A.**, Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol* 1992. **22**: 3191-3194.
- 166 **Villa, A., Notarangelo, L. D., Di Santo, J. P., Macchi, P. P., Strina, D., Frattini, A., Lucchini, F., Patrosso, C. M., Giliani, S., Mantuano, E. and et al.**, Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 2110-2114.
- 167 **Mazzei, G. J., Edgerton, M. D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J. F., Bernard, A., Allet, B. and Bonnefoy, J. Y.**, Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 1995. **270**: 7025-7028.
- 168 **Ludewig, B., Henn, V., Schroder, J. M., Graf, D. and Kroczek, R. A.**, Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol* 1996. **26**: 3137-3143.
- 169 **Karpusas, M., Hsu, Y. M., Wang, J. H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L. and Thomas, D.**, 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995. **3**: 1031-1039.
- 170 **Singh, J., Garber, E., Van Vlijmen, H., Karpusas, M., Hsu, Y. M., Zheng, Z., Naismith, J. H. and Thomas, D.**, The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. *Protein Sci* 1998. **7**: 1124-1135.
- 171 **Bajorath, J. and Aruffo, A.**, Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins* 1997. **27**: 59-70.
- 172 **Paulie, S., Rosen, A., Ehlin-Henriksson, B., Braesch-Andersen, S., Jakobson, E., Koho, H. and Perlmann, P.**, The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. *J Immunol* 1989. **142**: 590-595.
- 173 **Grassme, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A. and Gulbins, E.**, Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002. **168**: 298-307.
- 174 **Grassme, H., Bock, J., Kun, J. and Gulbins, E.**, Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* 2002. **277**: 30289-30299.
- 175 **Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A. and Mourad, W.**, CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem* 2004. **279**: 7799-7806.

- 176 **Valle, A., Zuber, C. E., Defrance, T., Djossou, O., De Rie, M. and Banchereau, J.,** Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur J Immunol* 1989. **19**: 1463-1467.
- 177 **Ledbetter, J. A., Shu, G., Gallagher, M. and Clark, E. A.,** Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J Immunol* 1987. **138**: 788-794.
- 178 **Uckun, F. M., Gajl-Peczalska, K., Myers, D. E., Jaszcz, W., Haissig, S. and Ledbetter, J. A.,** Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells. *Blood* 1990. **76**: 2449-2456.
- 179 **Clark, L. B., Foy, T. M. and Noelle, R. J.,** CD40 and its ligand. *Adv Immunol* 1996. **63**: 43-78.
- 180 **van Kooten, C., Gaillard, C., Galizzi, J. P., Hermann, P., Fossiez, F., Banchereau, J. and Blanchard, D.,** B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40. *Eur J Immunol* 1994. **24**: 787-792.
- 181 **Armitage, R. J., Tough, T. W., Macduff, B. M., Fanslow, W. C., Spriggs, M. K., Ramsdell, F. and Alderson, M. R.,** CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 2326-2331.
- 182 **Munroe, M. E. and Bishop, G. A.,** A costimulatory function for T cell CD40. *J Immunol* 2007. **178**: 671-682.
- 183 **O'Sullivan, B. and Thomas, R.,** CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* 2003. **23**: 83-107.
- 184 **Grewal, I. S. and Flavell, R. A.,** CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998. **16**: 111-135.
- 185 **Ohkawara, Y., Lim, K. G., Xing, Z., Glibetic, M., Nakano, K., Dolovich, J., Croitoru, K., Weller, P. F. and Jordana, M.,** CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* 1996. **97**: 1761-1766.
- 186 **Valent, P., Majdic, O., Maurer, D., Bodger, M., Muhm, M. and Bettelheim, P.,** Further characterization of surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990. **91**: 198-203.
- 187 **Schonbeck, U. and Libby, P.,** The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001. **58**: 4-43.
- 188 **van Kooten, C. and Banchereau, J.,** CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000. **67**: 2-17.
- 189 **Neron, S., Racine, C., Roy, A. and Guerin, M.,** Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction. *Immunology* 2005. **116**: 454-463.
- 190 **Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K. and Armitage, R. J.,** Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol* 1994. **6**: 267-278.
- 191 **Manning, E., Pullen, S. S., Souza, D. J., Kehry, M. and Noelle, R. J.,** Cellular responses to murine CD40 in a mouse B cell line may be TRAF dependent or independent. *Eur J Immunol* 2002. **32**: 39-49.
- 192 **Pullen, S. S., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., McWhirter, S. M., Everdeen, D. S., Alber, T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.,** High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 1999. **38**: 10168-10177.
- 193 **Kuhne, M. R., Robbins, M., Hambor, J. E., Mackey, M. F., Kosaka, Y., Nishimura, T., Gigley, J. P., Noelle, R. J. and Calderhead, D. M.,** Assembly and

- regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *J Exp Med* 1997. **186**: 337-342.
- 194 **Lu, L. F., Cook, W. J., Lin, L. L. and Noelle, R. J.**, CD40 signaling through a newly identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) binding site. *J Biol Chem* 2003. **278**: 45414-45418.
- 195 **Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.**, CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 1998. **37**: 11836-11845.
- 196 **Francis, D. A., Karras, J. G., Ke, X. Y., Sen, R. and Rothstein, T. L.**, Induction of the transcription factors NF-kappa B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor. *Int Immunol* 1995. **7**: 151-161.
- 197 **Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S. and Yamamoto, T.**, Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 2000. **254**: 14-24.
- 198 **Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C. and Engelmann, H.**, TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 2874-2879.
- 199 **Xie, P., Hostager, B. S., Munroe, M. E., Moore, C. R. and Bishop, G. A.**, Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol* 2006. **176**: 5388-5400.
- 200 **He, L., Grammer, A. C., Wu, X. and Lipsky, P. E.**, TRAF3 forms heterotrimers with TRAF2 and modulates its ability to mediate NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2004. **279**: 55855-55865.
- 201 **Jabara, H., Laouini, D., Tsitsikov, E., Mizoguchi, E., Bhan, A., Castigli, E., Dedeoglu, F., Pivniouk, V., Brodeur, S. and Geha, R.**, The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching. *Immunity* 2002. **17**: 265-276.
- 202 **Hanissian, S. H. and Geha, R. S.**, Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 1997. **6**: 379-387.
- 203 **Van Gool, S. W., Vandenberghe, P., de Boer, M. and Ceuppens, J. L.**, CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* 1996. **153**: 47-83.
- 204 **Gordon, J. and Pound, J. D.**, Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues. *Immunology* 2000. **100**: 269-280.
- 205 **Schattner, E. J., Elkon, K. B., Yoo, D. H., Tumang, J., Krammer, P. H., Crow, M. K. and Friedman, S. M.**, CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med* 1995. **182**: 1557-1565.
- 206 **Lagresle, C., Mondiere, P., Bella, C., Krammer, P. H. and Defrance, T.**, Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1996. **183**: 1377-1388.
- 207 **Mizuno, T. and Rothstein, T. L.**, B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement enhances BCR-induced ERK activation. *J Immunol* 2005. **174**: 3369-3376.
- 208 **Carey, G. B., Donjerkovic, D., Mueller, C. M., Liu, S., Hinshaw, J. A., Tonnetti, L., Davidson, W. and Scott, D. W.**, B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. *Immunol Rev* 2000. **176**: 105-115.

- 209 **Gordon, J., Millsum, M. J., Guy, G. R. and Ledbetter, J. A.,** Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CD40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. *J Immunol* 1988. **140:** 1425-1430.
- 210 **Shinde, S., Wu, Y., Guo, Y., Niu, Q., Xu, J., Grewal, I. S., Flavell, R. and Liu, Y.,** CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *J Immunol* 1996. **157:** 2764-2768.
- 211 **Mayumi, M., Sumimoto, S., Ohshima, Y., Katamura, K., Heike, T., Hata, D., Kanazashi, S. and Furusho, K.,** Role of LFA-1/ICAM-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of anti-IgM antibody-induced B-cell death. *J Allergy Clin Immunol* 1995. **96:** 1136-1144.
- 212 **Sumimoto, S., Heike, T., Kanazashi, S., Shintaku, N., Jung, E. Y., Hata, D., Katamura, K. and Mayumi, M.,** Involvement of LFA-1/intracellular adhesion molecule-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of human B lymphoma cell death induced by surface IgM crosslinking. *J Immunol* 1994. **153:** 2488-2496.
- 213 **Mayumi, M., Ohshima, Y., Hata, D., Kim, K. M., Heike, T., Katamura, K. and Furusho, K.,** IgM-mediated B cell apoptosis. *Crit Rev Immunol* 1995. **15:** 255-269.
- 214 **Khanna, R., Cooper, L., Kienzle, N., Moss, D. J., Burrows, S. R. and Khanna, K. K.,** Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 1997. **159:** 5782-5785.
- 215 **Clatza, A., Bonifaz, L. C., Vignali, D. A. and Moreno, J.,** CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J Immunol* 2003. **171:** 6478-6487.
- 216 **Urashima, M., Chauhan, D., Hatziyanni, M., Ogata, A., Hollenbaugh, D., Aruffo, A. and Anderson, K. C.,** CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk Res* 1996. **20:** 507-515.
- 217 **Jego, G., Bataille, R. and Pellat-Deceunynck, C.,** Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001. **97:** 1817-1822.
- 218 **Burdin, N., Galibert, L., Garrone, P., Durand, I., Banchereau, J. and Rousset, F.,** Inability to produce IL-6 is a functional feature of human germinal center B lymphocytes. *J Immunol* 1996. **156:** 4107-4113.
- 219 **Baccam, M. and Bishop, G. A.,** Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF-kappaB-independent IL-6 production in B cells. *Eur J Immunol* 1999. **29:** 3855-3866.
- 220 **Burdin, N., Van Kooten, C., Galibert, L., Abrams, J. S., Wijdenes, J., Banchereau, J. and Rousset, F.,** Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1995. **154:** 2533-2544.
- 221 **Duddy, M. E., Alter, A. and Bar-Or, A.,** Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 2004. **172:** 3422-3427.
- 222 **Grammer, A. C., McFarland, R. D., Heaney, J., Darnell, B. F. and Lipsky, P. E.,** Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers. *J Immunol* 1999. **163:** 4150-4159.
- 223 **MacLennan, I. C.,** Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994. **12:** 117-139.
- 224 **MacLennan, I. C.,** Germinal centers still hold secrets. *Immunity* 2005. **22:** 656-657.
- 225 **Choi, Y. S.,** Differentiation and apoptosis of human germinal center B-lymphocytes. *Immunol Res* 1997. **16:** 161-174.
- 226 **Choe, J. and Choi, Y. S.,** IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 1998. **28:** 508-515.

- 227 **Han, S., Hathcock, K., Zheng, B., Kepler, T. B., Hodes, R. and Kelsoe, G.,** Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 1995. **155**: 556-567.
- 228 **Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J. C., Rangel, R. and Martinez-Valdez, H.,** Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 2002. **107**: 167-175.
- 229 **Spriggs, M. K., Armitage, R. J., Strockbine, L., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Sato, T. A., Maliszewski, C. R. and Fanslow, W. C.,** Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992. **176**: 1543-1550.
- 230 **Maliszewski, C. R., Grabstein, K., Fanslow, W. C., Armitage, R., Spriggs, M. K. and Sato, T. A.,** Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 1044-1049.
- 231 **Rush, J. S. and Hodgkin, P. D.,** B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur J Immunol* 2001. **31**: 1150-1159.
- 232 **Jung, D., Neron, S., Lemieux, R., Roy, A. and Richard, M.,** Telomere-independent reduction of human B lymphocyte: proliferation during long-term culture. *Immunol Invest* 2001. **30**: 157-168.
- 233 **Kehry, M. R.,** CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 1996. **156**: 2345-2348.
- 234 **Szocinski, J. L., Khaled, A. R., Hixon, J., Halverson, D., Funakoshi, S., Fanslow, W. C., Boyd, A., Taub, D. D., Durum, S. K., Siegall, C. B., Longo, D. L. and Murphy, W. J.,** Activation-induced cell death of aggressive histology lymphomas by CD40 stimulation: induction of bax. *Blood* 2002. **100**: 217-223.
- 235 **Garrone, P., Neidhardt, E. M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C. and Banchereau, J.,** Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 1995. **182**: 1265-1273.
- 236 **Mackus, W. J., Lens, S. M., Medema, R. H., Kwakkenbos, M. J., Evers, L. M., Oers, M. H., Lier, R. A. and Eldering, E.,** Prevention of B cell antigen receptor-induced apoptosis by ligation of CD40 occurs downstream of cell cycle regulation. *Int Immunol* 2002. **14**: 973-982.
- 237 **Billian, G., Mondiere, P., Berard, M., Bella, C. and Defrance, T.,** Antigen receptor-induced apoptosis of human germinal center B cells is targeted to a centrocytic subset. *Eur J Immunol* 1997. **27**: 405-414.
- 238 **Cattoretti, G., Buttner, M., Shakhovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B. and Niedobitek, G.,** Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 2006. **107**: 3967-3975.
- 239 **Casali, P., Pal, Z., Xu, Z. and Zan, H.,** DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends Immunol* 2006. **27**: 313-321.
- 240 **Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., Li, Z. and Casali, P.,** Induction of Ig somatic hypermutation and class switching in a human monoclonal IgM+ IgD+ B cell line in vitro: definition of the requirements and modalities of hypermutation. *J Immunol* 1999. **162**: 3437-3447.
- 241 **Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H. and Honjo, T.,** Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2004. **5**: 707-712.
- 242 **Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C. M., Kalled, S. L., Hess, D. M., Serafini, B., Aloisi, F., Wekerle, H., Hohlfeld, R. and Meinel, E.,** BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis

- lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 2005. **201**: 195-200.
- 243 **Stavnezer, J. and Schrader, C. E.**, Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet* 2006. **22**: 23-28.
- 244 **Lee, G. S., Brandt, V. L. and Roth, D. B.**, B cell development leads off with a base hit: dU:dG mismatches in class switching and hypermutation. *Mol Cell* 2004. **16**: 505-508.
- 245 **Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A. and Casali, P.**, CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J Immunol* 1998. **161**: 5217-5225.
- 246 **Zhang, K., Clark, E. A. and Saxon, A.**, CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J Immunol* 1991. **146**: 1836-1842.
- 247 **Fiedler, H., Losch, U. and Hala, K.**, Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia (IgM/IgG). *Folia Biol (Praha)* 1980. **26**: 17-25.
- 248 **Losch, U., Kuhlmann, I., Klumpner, W. and Fiedler, H.**, Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line. *Immunobiology* 1981. **158**: 416-425.
- 249 **Kuhlmann-Rabens, I., Wanke, R., Storandt, F., Altmann, B., Losch, U. and Merckenschlager, M.**, Attempts to localize the defect in dysgammaglobulinemia of UM-B19 chickens by studying the effect of immunomodulating substances on immunoglobulin and antibody production. *Vet Immunol Immunopathol* 1987. **14**: 123-143.
- 250 **Hoffmann-Fezer, G. and Losch, U.**, Distribution of IgM-, IgG-, and IgA-positive cells in lymphatic organs of normo- and dysgammaglobulinemic UM-B19 chickens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983. **70**: 346-351.
- 251 **Wallis, J. W., Aerts, J., Groenen, M. A., Crooijmans, R. P., Layman, D., Graves, T. A., Scheer, D. E., Kremitzki, C., Fedele, M. J., Mudd, N. K., Cardenas, M., Higginbotham, J., Carter, J., McGrane, R., Gaige, T., Mead, K., Walker, J., Albracht, D., Davito, J., Yang, S. P., Leong, S., Chinwalla, A., Sekhon, M., Wylie, K., Dodgson, J., Romanov, M. N., Cheng, H., de Jong, P. J., Osoegawa, K., Nefedov, M., Zhang, H., McPherson, J. D., Krzywinski, M., Schein, J., Hillier, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K. and Warren, W. C.**, A physical map of the chicken genome. *Nature* 2004. **432**: 761-764.
- 252 **Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Martin, C. and Dieterlen-Lievre, F.**, The origin of lymphoid stem cells studied in chick yold sac-embryo chimaeras. *Nature* 1978. **272**: 353-354.
- 253 **Le Douarin, N. M., Jotereau, F. V., Houssaint, E. and Belo, M.**, Ontogeny of the avian thymus and bursa of Fabricius studied in interspecific chimeras. *Ann Immunol (Paris)* 1976. **127**: 849-856.
- 254 **Grandien, A., Bras, A. and Martinez, C.**, Acquisition of CD40 expression during murine B-cell differentiation. *Scand J Immunol* 1996. **43**: 47-55.
- 255 **Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Scialabba, G., Candore, G., Lio, D., Motta, M., Malaguarnera, M. and Caruso, C.**, B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 2003. **124**: 389-393.
- 256 **Takamatsu, H., Andersen, J. K., Denyer, M. S. and Parkhouse, R. M.**, Establishment of long-term CD154-dependent porcine B-cell cultures. *Immunology* 1999. **97**: 211-218.

- 257 **Wagner, D. H., Jr., Newell, E., Sanderson, R. J., Freed, J. H. and Newell, M. K.,** Increased expression of CD40 on thymocytes and peripheral T cells in autoimmunity: a mechanism for acquiring changes in the peripheral T cell receptor repertoire. *Int J Mol Med* 1999. **4**: 231-242.
- 258 **Bourgeois, C., Rocha, B. and Tanchot, C.,** A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 2002. **297**: 2060-2063.
- 259 **Huster, K. M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K. M., Wagner, H. and Busch, D. H.,** Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**: 5610-5615.
- 260 **Stone, G. W., Barzee, S., Snarsky, V., Kee, K., Spina, C. A., Yu, X. F. and Kornbluth, R. S.,** Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol* 2006. **80**: 1762-1772.
- 261 **Estes, D. M., Brown, W. C. and Hirano, A.,** CD40 ligand-dependent signaling of bovine B lymphocyte development and differentiation. *Vet Immunol Immunopathol* 1998. **63**: 15-20.
- 262 **Griebel, P. and Ferrari, G.,** CD40 signalling in ileal Peyer's patch B cells: implications for T cell-dependent antigen selection. *Int Immunol* 1995. **7**: 369-379.
- 263 **Motyka, B. and Reynolds, J. D.,** Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection. *Eur J Immunol* 1991. **21**: 1951-1958.
- 264 **Qin, H., Wilson, C. A., Lee, S. J., Zhao, X. and Benveniste, E. N.,** LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood* 2005. **106**: 3114-3122.
- 265 **Tumang, J. R., Negm, R. S., Solt, L. A., Schneider, T. J., Colarusso, T. P., Hastings, W. D., Woodland, R. T. and Rothstein, T. L.,** BCR engagement induces Fas resistance in primary B cells in the absence of functional Bruton's tyrosine kinase. *J Immunol* 2002. **168**: 2712-2719.
- 266 **Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G.,** NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 9136-9141.
- 267 **Benson, R. J., Hostager, B. S. and Bishop, G. A.,** Rapid CD40-mediated rescue from CD95-induced apoptosis requires TNFR-associated factor-6 and PI3K. *Eur J Immunol* 2006. **36**: 2535-2543.
- 268 **Andersen, J. K., Takamatsu, H., Pullen, L. and Parkhouse, R. M.,** Systematic characterization of porcine ileal Peyer's patch, II. A role for CD154 on T cells in the positive selection of immature porcine ileal Peyer's patch B cells. *Immunology* 1999. **98**: 622-629.
- 269 **Griebel, P., Beskorwayne, T., Van den Broeke, A. and Ferrari, G.,** CD40 signaling induces B cell responsiveness to multiple members of the gamma chain-common cytokine family. *Int Immunol* 1999. **11**: 1139-1147.
- 270 **Armitage, R. J., Macduff, B. M., Spriggs, M. K. and Fanslow, W. C.,** Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 1993. **150**: 3671-3680.
- 271 **Estes, D. M., Hirano, A., Heussler, V. T., Dobbelaere, D. A. and Brown, W. C.,** Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol* 1995. **163**: 268-279.
- 272 **Haas, K. M. and Estes, D. M.,** Activation of bovine B cells via surface immunoglobulin M cross-linking or CD40 ligation results in different B-cell phenotypes. *Immunology* 2000. **99**: 272-278.

- 273 **Corcoran, L. M.**, Transcriptional control of B cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005. **290**: 105-146.
- 274 **O'Nions, J. and Allday, M. J.**, Proliferation and differentiation in isogenic populations of peripheral B cells activated by Epstein-Barr virus or T cell-derived mitogens. *J Gen Virol* 2004. **85**: 881-895.
- 275 **Evans, D. E., Munks, M. W., Purkerson, J. M. and Parker, D. C.**, Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* 2000. **164**: 688-697.
- 276 **Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G. and Nadler, L. M.**, CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 1997. **100**: 2757-2765.
- 277 **Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. and Hwu, P.**, CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003. **63**: 2836-2843.
- 278 **von Bergwelt-Baildon, M., Schultze, J. L., Maecker, B., Menezes, I. and Nadler, L. M.**, Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003;63:2836-43. *Cancer Res* 2004. **64**: 4055-4056; author reply 4056-4057.
- 279 **Yoon, S. H., Cho, H. I. and Kim, T. G.**, Activation of B cells using Schneider 2 cells expressing CD40 ligand for the enhancement of antigen presentation in vitro. *Exp Mol Med* 2005. **37**: 567-574.
- 280 **Ivanov, R., Aarts, T., Hagenbeek, A., Hol, S. and Ebeling, S.**, B-cell expansion in the presence of the novel 293-CD40L-sCD40L cell line allows the generation of large numbers of efficient xenoantigen-free APC. *Cytotherapy* 2005. **7**: 62-73.
- 281 **O'Regan, M. N., Parsons, K. R., Tregaskes, C. A. and Young, J. R.**, A chicken homologue of the co-stimulating molecule CD80 which binds to mammalian CTLA-4. *Immunogenetics* 1999. **49**: 68-71.
- 282 **Young, J. R., Davison, T. F., Tregaskes, C. A., Rennie, M. C. and Vainio, O.**, Monomeric homologue of mammalian CD28 is expressed on chicken T cells. *J Immunol* 1994. **152**: 3848-3851.
- 283 **Kothlow, S., Mannes, N. K., Schaerer, B., Rebeski, D. E., Kaspers, B. and Schultz, U.**, Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol* 2005. **29**: 733-748.
- 284 **Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. and Bottomly, K.**, B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol* 1995. **155**: 3734-3741.
- 285 **Rodriguez-Pinto, D. and Moreno, J.**, 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* 2005. **35**: 1097-1105.
- 286 **Rath, N. C., Huff, W. E., Bayyari, G. R. and Balog, J. M.**, Identification of transforming growth factor-beta and interleukin-6 in chicken ascites fluid. *Avian Dis* 1995. **39**: 382-389.
- 287 **Schneider, K., Klaas, R., Kaspers, B. and Staeheli, P.**, Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem* 2001. **268**: 4200-4206.
- 288 **Klaas, R.**, Charakterisierung der biologischen Aktivität von Hühner Interleukin-6 und erste Untersuchungen zum Toll-like Rezeptor-System des Huhns. *Inaugural-Dissertation* 2003.

- 289 **Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E. and Rousset, F.**, Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 1991. **251**: 70-72.
- 290 **Raymond, C. R. and Wilkie, B. N.**, Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine* 2004. **22**: 1016-1023.
- 291 **Diaz, I. and Mateu, E.**, Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2005. **106**: 107-112.
- 292 **Lotze, M. T.**, T-cell growth factors and the treatment of patients with cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 1992. **62**: S47-54.
- 293 **Chaplin, P. J., Casey, G., De Rose, R., Buchan, G., Wood, P. R. and Scheerlinck, J. P.**, The expression and biologic effects of ovine interleukin-4 on T and B cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res* 2000. **20**: 419-425.
- 294 **Brown, W. C., Rice-Ficht, A. C. and Estes, D. M.**, Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998. **63**: 45-55.
- 295 **Leclercq, L., Cambier, J. C., Mishal, Z., Julius, M. H. and Theze, J.**, Supernatant from a cloned helper T cell stimulates most small resting B cells to undergo increased I-A expression, blastogenesis, and progression through cell cycle. *J Immunol* 1986. **136**: 539-545.
- 296 **Thompson, C. B., Scher, I., Schaefer, M. E., Lindsten, T., Finkelman, F. D. and Mond, J. J.**, Size-dependent B lymphocyte subpopulations: relationship of cell volume to surface phenotype, cell cycle, proliferative response, and requirements for antibody production to TNP-Ficoll and TNP-BA. *J Immunol* 1984. **133**: 2333-2342.
- 297 **Tregaskes, C. A., Bumstead, N., Davison, T. F. and Young, J. R.**, Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure. *Immunogenetics* 1996. **44**: 212-217.
- 298 **Mansikka, A., Sandberg, M., Veromaa, T., Vainio, O., Granfors, K. and Toivanen, P.**, B cell maturation in the chicken Harderian gland. *J Immunol* 1989. **142**: 1826-1833.
- 299 **Sciammas, R. and Davis, M. M.**, Blimp-1; immunoglobulin secretion and the switch to plasma cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005. **290**: 201-224.
- 300 **Nera, K. P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J. M. and Lassila, O.**, Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 2006. **24**: 283-293.
- 301 **Tangye, S. G., Ferguson, A., Avery, D. T., Ma, C. S. and Hodgkin, P. D.**, Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol* 2002. **169**: 4298-4306.
- 302 **Briere, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M. and Banchereau, J.**, Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* 1994. **179**: 757-762.
- 303 **Li, W.**, Synergistic antibody induction by antigen-CD40 ligand fusion protein as improved immunogen. *Immunology* 2005. **115**: 215-222.
- 304 **Manoj, S., Griebel, P. J., Babiuk, L. A. and van Drunen Littel-van den Hurk, S.**, Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J Immunol* 2003. **170**: 989-996.
- 305 **Gares, S. L., Fischer, K. P., Congly, S. E., Lacoste, S., Addison, W. R., Tyrrell, D. L. and Gutfreund, K. S.**, Immunotargeting with CD154 (CD40 ligand) enhances DNA vaccine responses in ducks. *Clin Vaccine Immunol* 2006. **13**: 958-965.
- 306 **Bacharier, L. B. and Geha, R. S.**, Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000. **105**: S547-558.

- 
- 307 **McIntyre, T. M., Kehry, M. R. and Snapper, C. M.,** Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *J Immunol* 1995. **154**: 3156-3161.
- 308 **Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. and Yeh, H. Y.,** Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* 2000. **24**: 223-235.
- 309 **Lin, J. A., Kodama, H., Onuma, M. and Mikami, T.,** The early pathogenesis in chicken inoculated with non-pathogenic serotype 2 Marek's disease virus. *J Vet Med Sci* 1991. **53**: 269-273.

---

## Anhang I: Herstellerverzeichnis

- 1 Applichem, Darmstadt
- 2 Biochrom, Berlin
- 3 Ratiopharm, Ulm
- 4 Gibco, England
- 5 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- 6 Greiner Bio-One, Frickenhausen
- 7 Freundlicherweise von K. Schneider, Institut für Med. Mikrobiologie zur Verfügung gestellt
- 8 Roche, Grenzach-Wyhlen
- 9 Nunc, Wiesbaden
- 10 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- 11 BioRad, München
- 12 Becton Dickinson, Heidelberg
- 13 Freundlicherweise von C.Tregaskes und J.Young, Institute for Animal Health, Compton, England, zur Verfügung gestellt
- 14 Sigma. Deisenhofen
- 15 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 16 Miltenyi, Bergisch Gladbach
- 17 Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, München
- 18 PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Monza, Italien
- 19 Calbiochem, La Jolla, USA

## Anhang II: Geräteverzeichnis

Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Durchflusszytometer	FACScan	Beckton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Harvester	Omnifilter-96 Harvester	PerkinElmer, Monza, Italien
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer-Küvette	Spectrophotometer, Quartzküvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Plattenschüttler	Titertek	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Power-supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	Bio-Rad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Szintillationsmessgerät	TopCount, 6-Detector, 96-Well	PerkinElmer, Monza, Italien
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Wasserbad	Lauda M3	Lauda, Königshofen

---

Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Kaspers für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sonja Kothlow für die fachliche Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Gewährung des Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 1029.

Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl, Ramona Schmitt, Dr. Birgit Viertlböck, Dr. Susanne Rehfeld und allen anderen Labormitgliedern danke ich für das freundliche Arbeitsklima und für ihre stete Hilfsbereitschaft. Auch dem Graduiertenkollegs danke ich für die hervorragende Ausbildung, sowie den Mitstipendiaten für die freundliche Atmosphäre untereinander.

Für die Betreuung der Tiere danke ich Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz und Thomas Hoschka.

Auch meinen Mitdoktoranden Jenny Dieckmann, Christian Seliger, Matthias Hanczaruk, Ferdinand Schmitt, Frank Altmann, Christina Buse und Hannah Zipplies möchte ich an dieser Stelle danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Max Bielohuby, die mich in Allem unterstützt und motiviert haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit wohl nicht fertig gestellt worden