Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin

# Megakaryozyten bilden eine funktionelle Komponente der Plasmazellnische im Knochenmark

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
**Oliver Winter**

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16.02.2010

Berlin 2010
D 83

*Immer am Wind,*
*auch bei negativem Log.*
*Tiefe Schnitte,*
*in die anrollende See.*

*Sie liegt gut in der Hand,*
*sie ist hierfür gemacht.*
*Herr Schipper, Herr Schipper,*
*wie tief ist das Wasser?*

C.E. Dronson – „Der Eskapismus der SY MARLA“

Für Ellen Mae, Rika Milla und Anna Rosa

**1. EINLEITUNG ..... 1**

1.1. DAS IMMUNSYSTEM ..... 1

*1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität ..... 1*

*1.1.2. Die humorale Immunantwort ..... 2*

1.1.2.1. B-Zellreifung ..... 2

1.1.2.2. B-Zell Aktivierung und terminale Differenzierung zur Plasmazelle ..... 3

1.1.2.3. Aufbau und Funktion der Antikörper ..... 5

1.1.2.4. Autoimmunität und die pathologische Rolle von Antikörpern ..... 7

1.1.2.5. Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen ..... 8

1.2. DIE PLASMAZELLNISCHE ..... 10

*1.2.1. Das Nischenkonzept und potentielle Plasmazellüberlebensfaktoren ..... 10*

*1.2.2. Aufbau des Knochenmarks ..... 12*

1.3. MEGAKARYOZYTEN UND THROMBOPOESE ..... 13

*1.3.1. Megakaryopoese ..... 13*

*1.3.2. Megakaryozyten in der Klinik ..... 14*

1.4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT ..... 15

**2. MATERIAL UND METHODEN ..... 16**

2.1. VERWENDETE MATERIALIEN ..... 16

*2.1.1. Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterial ..... 16*

*2.1.2. Antigene, Adjuvanz und rekombinante Zytokine ..... 16*

*2.1.3. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe ..... 17*

*2.1.4. Geräte und Software ..... 18*

2.2. MAUSSTÄMME UND BEHANDLUNG ..... 19

*2.2.1. Verwendete Mausstämme ..... 19*

*2.2.2. Immunisierung ..... 19*

*2.2.3. Induktion der Megakaryopoese durch Thrombopoetinbehandlung ..... 19*

*2.2.4. Unterscheidung langlebiger und neu gebildeter Plasmazellen mittels BrdU-Einbau ..... 20*

2.3. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE ..... 20

*2.3.1. Herstellen von Einzelzellsuspensionen ..... 20*

*2.3.2. Oberflächenfärbungen ..... 21*

*2.3.3. Intrazelluläre Färbung ..... 21*

*2.3.4. Prinzip der Durchflusszytometrie ..... 21*

*2.3.5. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ..... 22*

*2.3.6. Zellzahlbestimmung ..... 22*

2.4. HISTOLOGISCHE ANALYSE VON GEWEBESCHNITTEN ..... 23

*2.4.1. Anfertigen von Gewebeschnitten ..... 23*

*2.4.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten ..... 23*

*2.4.3. Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie ..... 24*

2.5. UNTERSUCHUNGEN IN DER ZELLKULTUR ..... 24

*2.5.1. Plasmazellkultur ..... 24*

*2.5.2. Plasmazell Kokultur* ... *25*
*2.5.3. Enzyme Linked Immuno Spot Technique (ELISPOT)* ... *25*
*2.5.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ... *26*
2.6. REVERSE TRANSKRIPTASE POLYKETTENREAKTION (RT-PCR) UND QUANTITATIVE (Q)PCR ... 27

**3. ERGEBNISSE ... 29**

3.1. UNTERSUCHUNG DES PLASMAZELLKOMPARTIMENTS IN MILZ UND KNOCHENMARK ... 29
*3.1.1. Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen* ... *29*
*3.1.2. Die Entwicklung des Plasmazellkompartiments im Knochenmark* ... *30*
*3.1.3. Histologische Analyse von Plasmazellen* ... *32*
3.2. ZELLULÄRE CHARAKTERISIERUNG DER PLASMAZELLNISCHE IM KNOCHENMARK ... 35
*3.2.1. Lokalisation von Knochenmarkplasmazellen im Verlauf einer sekundären Immunantwort* 35
*3.2.2. Histologische und durchflusszytometrische Charakterisierung von Megakaryozyten* ... *38*
*3.2.3. Verteilung von Plasmazellen und Megakaryozyten in Milz und Knochenmark* ... *41*
*3.2.3. Untersuchung der Kontaktfläche von Plasmazelle und Megakaryozyt auf Zell-Zell Interaktion* ... *43*
*3.2.4. Plasmazellen und Megakaryozyten sitzen gemeinsam in der SDF-1 (CXCL12) positiven perivaskulären Nische* ... *44*
*3.2.5. Megakaryozyten produzieren Plasmazellüberlebensfaktoren* ... *46*
3.3. DIE TPO REZEPTOR DEFIZIENTE MAUS (C-MPL -/-) ... 50
*3.3.1. Das Plasmazellkompartiment der c-Mpl-/- Maus in Milz und Knochenmark* ... *50*
*3.3.2. Analyse des antigenspezifischen Plasmazellkompartiments in der c-Mpl-/- Maus nach Primär- und Sekundärimmunisierungen* ... *51*
*3.3.3. Kolokalisationsstudien in der c-Mpl-/- Maus* ... *55*
3.4. MANIPULATION DER PLASMAZELLNISCHE MITTELS THROMBOPOETIN (TPO) ... 58
*3.4.1. Eine fünftägige TPO Behandlung induziert die Megakaryopoese und führt zu einer Erneuerung des Megakaryozytenkompartiments* ... *58*
*3.4.2. Untersuchung der Genexpression des TPO-Rezeptors c-Mpl und der Wirkung von TPO auf Plasmazellen in Kultur* ... *61*
*3.4.3. Die Wirkung der TPO Behandlung auf ausgewählte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, sowie auf reife Leukozyten* ... *62*
*3.4.4. Auswirkung der TPO Behandlung auf pre-existente Plasmazellen* ... *64*
*3.4.5. Auswirkung der TPO Behandlung auf die Bildung des Gedächtnisplasmazellkompartiment in Folge einer Immunisierung* ... *65*
3.5. PLASMAZELLEN UND MEGAKARYOZYTEN IN KOKULTUR ... 68
3.6. DIE AUSWIRKUNG EINER IMMUNISIERUNG AUF DIE MEGAKARYOPOESE ... 70

**4. DISKUSSION ... 71**

4.1. EINLEITUNG ... 71
4.2. DISKUSSION DER METHODIK ... 72
*4.2.1. Verwendung der Maus als Modell für immunologische Studien* ... *72*
*4.2.2. BrdU Einbau zur Unterscheidung langlebiger und kurzlebiger Plasmazellen* ... *73*
*4.2.3. Die Ova bzw. NP Immunisierung als Modell einer Immunreaktion* ... *73*

*4.2.4. Die c-Mpl defiziente Maus als Modell für beeinträchtigte Megakaryopoese* ..... *75*
*4.2.5. Die wiederholte TPO Applikation zur Stimulation der Megakaryopoese* ..... *75*
4.3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE ..... 76
*4.3.1. Das Plasmazellkompartiment muss sich entwickeln* ..... *76*
*4.3.2. Die Plasmazellen im Knochenmark sitzen in der vaskulären Nische assoziiert mit SDF-1 positiven Zellen und ein Teil kolokalisiert mit Megakaryozyten* ..... *79*
*4.3.3. Retikuläre SDF-1 positive Zellen bilden das Gerüst der Plasmazellnische* ..... *81*
*4.3.4. Megakaryozyten produzieren Plasmazellüberlebensfaktoren im Knochenmark und sind eine Hauptquelle für IL-6* ..... *82*
*4.3.5. Die c-Mpl -/- Maus hat ein kleineres Plasmazellkompartiment und die schnelle Akkumulation von Plasmazellen in Folge eines wiederholten Antigenkontaktes ist gestört.* ..... *83*
*4.3.6. Die TPO Behandlung führt zu einer Depletion pre-existenter langlebiger Plasmazellen und ermöglicht eine verbesserte Besiedlung des Knochenmarks mit neu gebildeten Plasmazellen.* ... *86*
*4.3.7. Es gibt ein bidirektionales Zusammenspiel zwischen Immunantwort und Megakaryopoese* ..... *87*
*4.3.8. Megakaryozyten können Plasmazellen in der Kultur unterstützen* ..... *89*
**5. ZUSAMMENFASSUNG UND MODELL DER MULTIKOMPONENTEN PLASMAZELLNISCHE** ..... **92**
**6. AUSBLICK** ..... **95**
**7. REFERENZEN** ..... **97**
**8. ANHANG** ..... **103**

# 1. Einleitung

## *1.1. Das Immunsystem*

Das Immunsystem dient dem Schutz des Individuums vor körperfremden Organismen und Substanzen. Dabei muss es zwischen einer Vielzahl verschiedenartiger Pathogene und körpereigener Strukturen unterscheiden können. Im Wechselspiel mit den Umweltkeimen hat sich daher ein komplexes Netzwerk aus Barriere- und Reaktionselementen evolviert, um schnell, ausreichend stark und reguliert auf mögliche Bedrohungen zu reagieren. Dieses Netzwerk umfasst verschiedene lymphatische Organe und Zellen, die über Botenstoffe eine koordinierte Immunantwort ausführen.

### 1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem hat viele Facetten, jedoch kann man grundsätzlich zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität unterscheiden. Die angeborene, natürliche Immunität ermöglicht eine allgemeine Differenzierung zwischen selbst und fremd über die Erkennung mikrobieller Strukturen wie LPS, CpG reicher DNA oder dsRNA durch Toll-like Rezeptoren (TLR). Myeloide Zellen wie phagozytierende Makrophagen, natürliche Killer (NK) Zellen und Granulozyten werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Ein weiterer Mechanismus der Immunantwort ist die Ausschüttung von Botenstoffen in Folge einer Aktivierung - den so genannten Zytokinen. Die Zytokine vermitteln Signale an verschiedene Leukozyten und ermöglichen die Koordinierung der Immunantwort. Dieses stellt somit gleichzeitig eine Schnittstelle zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem dar. Die adaptive Immunität muss erworben werden, da sie im Gegensatz zur angeborenen, natürlichen Immunität keine allgemeinen, sondern ganz spezifische Zielstrukturen erkennt. Die Zellen des adaptiven Immunsystems – die Lymphozyten – werden in B(one marrow) und T(hymus) Zellen unterteilt. Beide Zelltypen tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die nur ein ganz bestimmtes Epitop - das Antigen - erkennen. Diese hohe Antigenspezifität der Zellen spiegelt sich in der immensen Menge von T- und B-Lymphozyten mit verschiedenen Rezeptorspezifitäten wider. Sie kommt durch die zufällige Zusammenlagerung verschiedener Gensegmente im Laufe der B- und T-Zell-Entwicklung („somatische Rekombination“) zustande. Findet und bindet der Lymphozyt „sein“ Antigen, kommt es zur Zellaktivierung. Vervielfältigung und Differenzierung zu Effektorzellen ist die Folge. Das ermöglicht eine schnelle und gezielte Eliminierung des Pathogens, wobei ein Großteil der aktivierten Zellen

später abstirbt. Teilweise werden jedoch Gedächtniszellen gebildet, die bei einem erneuten Antigenkontakt schneller und effektiver reagieren können.

Dieses hochspezifische immunologische Gedächtnis stellt einen enormen Vorteil des Organismus beim ständigen Kampf gegen die Infiltration durch Umweltpathogene dar.

### 1.1.2. Die humorale Immunantwort

Die humorale Immunität wird durch lösliche Proteine, den Immunglobulinen (Ig) – so genannte Antikörper –, in den Flüssigkeiten [von latein. umor = Flüssigkeit] des Organismus vermittelt. Anders als die T-Zell vermittelte zelluläre Immunität, welche gegen infizierte bzw. entartete Körperzellen gerichtet ist, trägt die humorale Immunität zur extrazellulären Bekämpfung von Pathogenen bei. Die dafür notwendigen Antikörper werden von terminal differenzierten B-Zellen - den Plasmazellen – sezerniert. Im Folgenden wird die B-Zellreifung, die Aktivierung und Ausdifferenzierung zur Plasmazelle genauer beschrieben. Ebenso werden die verschiedenen Wirkmechanismen der Antikörper und die Plasmazelle im Detail besprochen.

#### 1.1.2.1. B-Zellreifung

Wie für viele Blutzellen, findet die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark statt. Ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle reift der B-Lymphozyt über verschiedene Zwischenstadien zur unreifen B-Zelle und verlässt das Knochenmark. In der Milz entwickelt sie sich zur reifen, naiven B-Zelle und kann anschließend in der Peripherie rezirkulieren. Als reife B-Zelle trägt sie einen funktionellen B-Zell Rezeptor - membranständiges Immunglobulin einer einzigen Spezifität - auf ihrer Oberfläche, während die Aktivierung durch körpereigene Strukturen - so genannte Autoantigene - in frühen Entwicklungsstadien im Knochenmark und in der Peripherie zur Apoptose führt [1]. Die obige Entwicklung beschreibt die Reifung eines Teils der B-Lymphozyten, der follikulären B2-Lymphozyten. Follikel sind Areale von B-Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen wie der Milz, Lymphknoten oder Peyer Plaques, welche in Folge eines Antigenkontaktes Keimzentren bilden können. Die Keimzentren entwickeln sich infolge Thymus abhängiger (TD) Immunantworten, ermöglichen eine Affinitätsreifung des B-Zellrezeptors und tragen entscheidend zur Entwicklung des humoralen Gedächtnisses bei [2].

Eine alternative Population der B-Lymphozyten stellen die B1-Zellen dar [3]. Diese unterscheiden sich in Entstehung, Lokalisation und Rezeptorrepertoire. So sind B1-Zellen in

hoher Zahl in der fötalen Leber vorhanden, jedoch nicht im Knochenmark. Sie besitzen im Vergleich zu B2-Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und exprimieren B-Zell Rezeptoren, die typischerweise Thymus unabhängige Antigene Typ 2 (TI-2) erkennen. TI-2 Antigene besitzen eine sich wiederholende Sequenz identischer Epitope, wie man sie auf Bakterien- oder Virusoberflächen findet. Dieses führt zur Quervernetzung der B-Zell Rezeptoren und so zur Aktivierung der B1-Zelle. Die B1-Zellen können daher ein breites Spektrum an mikrobiellen Erregern erkennen. Die daraus resultierenden polyreaktiven Antikörper werden in Anlehnung an das angeborene, natürliche Immunsystem „natürliche" Antikörper genannt.

Die B1- und die B2-Lymphozyten tragen somit auf unterschiedliche Weise zur humoralen Immunität bei. Das Folgende bezieht sich jedoch auf die hochspezifischen B2-Zellen, da diese für das humorale Gedächtnis entscheidend sind.

### 1.1.2.2. B-Zell Aktivierung und terminale Differenzierung zur Plasmazelle

Bindet Antigen an dem komplementären B-Zellrezeptor, wird die B-Zelle aktiviert. Um jedoch die Schwellenwert zur vollständigen Aktivierung zu überschreiten, bedarf es weiterer kostimulatorischer Signale. Diese stammen von mikrobiellen Bestandteilen (TI-Reaktion), können aber auch von T-Helfer- (TH-) Zellen kommen, die auf das gleiche Antigen reagieren (TD-Reaktion).

TI-Antigene wie bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide aktivieren zumeist Marginalzonen B-Zellen. Diese haben eine niedrigere Aktivierungsschwelle als follikuläre B-Zellen und reagieren schneller und mit stärkerer klonaler Expansion als Letztere [4]. Die Plasmazellen, die aus einer solchen Reaktion hervorgehen, sezernieren vorwiegend Antikörper geringer Affinität der Klasse IgM, auch wenn der Klassenwechsel selbst nicht keimzentrumsgebunden ist [5]. Von dieser ersten Welle an Plasmazellen werden nur wenige langlebig [6, 7]. Es wurde lange vermutet, dass ein immunologisches Gedächtnis in Form von Gedächtnis-B-Zellen nicht ausgebildet werden kann [8]. Eine neuere Studie belegt jedoch, dass eine optimale Kombination an Kostimuli sowohl zu erhöhten langlebigen Plasmazellzahlen als auch zur Ausbildung von TI-Gedächtnis-B-Zellen führt [9]. Ob und wie stark diese Art der Immunreaktion unter physiologischen Bedingungen *in vivo* vorkommt, bleibt jedoch unklar. Als gesichert gilt aber, dass TD-Reaktionen, mit starken kostimulatorischen Signalen und der Affinitätsreifung im Keimzentrum die Hauptquelle für das humorale Gedächtnis sind [2, 4, 8].

Bei der TD-Immunreaktion wandern B-Zellen, die Antigen aufgenommen haben und auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) Klasse II präsentieren, innerhalb der lymphatischen Organe in den Grenzbereich zwischen B- und T-Zell-Zone. Aktivierte TH-Zellen wandern ebenfalls in diese Zone und treten in Kontakt mit B-Zellen gleicher Antigenspezifität. Dabei kommt es zur gegenseitigen Stimulation über MHCII-Antigen/ TCR sowie CD40/CD40L Verbindungen, in deren Folge die verschiedene Zytokine sezerniert werden. Die Art der ausgeschütteten Zytokine entscheidet über den weiteren Verlauf der Immunreaktion. So induzieren IFN-γ und IL-2 vor allem die zelluläre, IL-4 und IL-6 jedoch die humorale Immunantwort. Dementsprechend unterscheidet man zwischen TH1 Zellen (IFN-γ Produzenten) und TH2 Zellen (IL-4 Produzenten) und spricht allgemein von einer TH1 bzw. TH2 dominierten Antwort. Generell wird sowohl die zelluläre als auch die humorale Antwort nach einem Antigenkontakt induziert, jedoch entscheiden die kostimulatorischen Signale, welche die T-Zelle während ihrer Aktivierung durch dendritische Zellen (DC) bzw. Makrophagen enthält, über die Polarisierung zwischen TH1 bzw. TH2 [10-15]. Für die Generierung des humoralen Gedächtnisses und eines protektiven Antikörpertiters im Serum ist allerdings eine starke Th2-Antwort erwünscht [10, 16].

Ein Teil der aktivierten B-Zellen einer TD-Immunreaktion differenziert über das Zwischenstadium unreifer teilungsfähiger Plasmazellen – den Plasmablasten (PB) – zu reifen Plasmazellen aus, welche nicht mehr teilungs- und migrationsfähig sind [17]. Ein anderer Teil kann die so genannte Keimzentrumsreaktion durchlaufen. Diese Reaktion ist mit Phasen starker Proliferation und Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors, welche durch somatische Hypermutation - Punktmutationen im Bereich der Antigenbindungsstelle - eingeführt werden, verbunden. B-Zellen aus Keimzentrumsreaktionen tragen daher einen hochaffinen B-Zellrezeptor mit zumeist klassengewechselter Immunglobulinklasse. Anstelle von IgM und IgD auf naiven B-Zellen synthetisieren sie IgG, IgA oder IgE [5]. Diese B-Zellen entwickeln sich entweder zu Gedächtniszellen weiter, welche bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen sehr rasch und effizient aktiviert werden, oder in Plasmazellen, welche das intrinsische Potential besitzen, für mehrere Monate bis Jahre zu überleben [18, 19].

Die Differenzierung von der B-Zelle zur Plasmazelle resultiert aus der Umstellung des genetischen Programms [4]. Gene wie pax5, bcl6, mta3, welche den B-Zell Phänotyp manifestieren, werden reprimiert, und Plasmazellgene wie prdm1, xbp-1 und irf4 werden aktiviert. Dadurch werden Oberflächenmoleküle wie der B-Zell-Rezeptor, MHCII und der B-Zell Marker B220 herunterreguliert. Außerdem wird der für die Plasmazellmigration wichtige Chemokinrezeptor CXCR4 anstelle von CXCR5 auf B-Zellen exprimiert, und das Proteoglykan Syndekan-1 (CD138) erscheint auf der Oberfläche [20]. Die Differenzierung

von der B-Zelle zur Antikörper sezernierenden Plasmazelle geht zudem mit morphologischen Veränderungen der Zelle einher. Um die großen Mengen löslichen Antikörpers zu sezernieren (bis zu $10^4$ Moleküle pro Sekunde), wächst das endoplasmatische Retikulum, die Zelle wird größer (10-15 µm), und der Kern wird an den Rand gedrängt, wodurch die Plasmazelle ihre typische ovale Form entwickelt.

### 1.1.2.3. Aufbau und Funktion der Antikörper

Antikörper treten als membranständiger B-Zell-Rezeptor oder als lösliche Form auf. Letzteres ist das Effektormolekül, welches die spezifische humorale Immunität vermittelt und von Plasmazellen in großer Zahl sezerniert wird.

Antikörpermoleküle sind aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, aufgebaut und besitzen eine Y-förmige Grundstruktur. Bei den leichten Ketten gibt es zwei verschiedene Typen - kappa (κ) und lambda (λ) -, die sich in ihrer Funktion allerdings nicht von einander unterscheiden. Die Ig leichte Kette κ stellt jedoch mit einem Anteil von 66% beim Menschen und 95% bei der Maus die Hauptklasse dar. Bei den schweren Ketten, die die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls bestimmen, unterscheidet man zwischen fünf verschiedenen Klassen (µ, γ, α, ε und δ). Dementsprechend werden die Antikörper Isotypen auch als: IgM, IgG, IgA, IgE bzw. IgD bezeichnet. IgM ist die dominante Klasse von Antikörpern, die zu Beginn nach einem Erst-Kontakt mit Antigenen gebildet wird, und liegt als Pentamer vor. IgG macht den Hauptteil der Antikörper im Serum aus. Auch die Mehrheit der Gedächtnis-B-Zellen exprimiert diese Ig Klasse. IgA wird auf die Schleimhäute (Mukosa) der Atemwege, der Augen, des Magen-Darm-Trakts sezerniert und schützt diese exponierten Flächen vor dem Eindringen von Pathogenen. Sezerniertes IgA kommt als Monomer oder Dimer vor. IgE dient dem Schutz vor Parasiten, wie z. B. Würmern. Dazu aktiviert an Fcε - Rezeptoren gebundenes IgE Mastzellen und Granulozyten. Aus diesem Grund ist nahezu alles IgE membrangebunden und im Blut praktisch nicht vorhanden.

Die konstante Region der schweren Kette – der Fc-Teil - vermittelt, wie oben bereits angesprochen, die funktionelle Aktivität des Antikörpers. Dieser Teil wird über komplementäre Fc-Rezeptoren auf Leukozyten gebunden und beeinflusst somit maßgeblich den Verlauf der Immunreaktion [21, 22]. So spielt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den Fc-Teil häufig eine entscheidende Rolle bei der Keimneutralisation.

Die Antigenerkennungsstelle, welche von den aminoterminalen Sequenzen der schweren und leichten Ketten gebildet wird, wird als variable Region bezeichnet. Aufgrund des Y-

förmigen Aufbaus hat jeder Antikörper zwei Antigenbindungsstellen. Durch Modifikationen der Gene, welche für die Antigenerkennungsstelle kodieren, kommt es zur Ausbildung verschiedener Spezifitäten der einzelnen B-Zell Klone während der Reifung im Knochenmark. Nach Antigenkontakt kann die Affinität der Antigenerkennungsstelle in einer Keimzentrumsreaktion durch Einleitung von Punktmutationen in der variablen Region noch erhöht werden. Die Affinität der gebildeten Antikörper für das spezifische Pathogen nimmt dementsprechend im Verlauf der Immunreaktion zu. Diese Affinitätsreifung wird in vielen Studien mit dem Potential, langlebig werden zu können, assoziiert [2, 17].

Einige Pathogene können direkt neutralisiert werden, indem sie durch die Antikörperbindung ihre Wirkung nicht mehr entfalten können. Dieses beinhaltet die Bindung von Toxinen und die Maskierung von Andockstellen auf Viren und Bakterien, wodurch ihr Eindringen in Zellen oder Gewebe verhindert wird. Als weiterer direkt vermittelter Neutralisierungsprozess wirkt die Agglutination von kleineren Pathogenen. Hierbei vernetzten die Antikörper dank ihrer beiden Antigenbindungsstellen mehrere Antigene miteinander. Ein weiterer Mechanismus wirkt durch das Einhüllen von Krankheitserregern und Fremdpartikeln mit Antikörpern, die so genannte Opsonisierung. Hierbei erkennen Phagozyten den Fc-Teil des Antikörpers, welcher beispielsweise an ein Bakterium gebunden hat, und verdauen dieses. Dieser Prozess spielt vor allem bei der Bekämpfung extrazellulärer, teilungsaktiver Bakterien eine wichtige Rolle. Gebundene Antikörper können außerdem das Komplementsystem - ein speziellen Systems von Serumproteinen - aktivieren, was wieder zur Aktivierung von Phagozyten führt bzw. direkt eine Lyse des Bakteriums zur Folge hat. Zur Eliminierung infizierter oder entarteter Zellen induzieren Antikörper die so genannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxität (ADCC), wobei der Fc-Teil von NK-Zellen erkannt wird, welche die markierte Zelle abtöten.

Antikörper haben also eine Schlüsselstellung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem, da sie Antigene hochselektiv erkennen und durch dessen Markierung Zellen des eher unspezifischen angeborenen Immunsystems gezielt auf das Pathogen richten.

Neben der Koordination und Aktivierung von Immunantworten wirken Antikörper auch selbst regulierend. Der inhibitorische Fc-Rezeptor FcγIIB auf B-Zellen verhindert bei einem ansteigendem Antikörpertiter das ungebremste Weiterlaufen der Immunreaktion. Zusätzlich leitet die Aktivierung von FcγIIB auf Plasmazellen die Apoptose ein, um bei einer zu hohen Konzentration an Antikörpern die Produzenten zu reduzieren [22, 23].

### 1.1.2.4. Autoimmunität und die pathologische Rolle von Antikörpern

Das Kennzeichen der adaptiven Immunabwehr ist die hochspezifische Erkennung von Pathogenen. Durch zusätzliche Aktivierung und Koordinierung des angeborenen Immunsystems gelingt es, eine schnelle, starke und selektive Immunreaktion durchzuführen. Dieses effiziente System kann sich jedoch gegen den eigenen Organismus wenden, wenn körpereigene Antigene anstelle von fremden erkannt werden. Um dieses zu verhindern durchlaufen T- und B-Lymphozyten während ihrer Entwicklung verschiedene negative Selektionsprozesse auf Autoantigene [24]. Zusätzlich werden reife B- sowie Plasmazellen über FcγIIB negativ reguliert. Dennoch kann es hierbei zu Störungen kommen, die zur Reifung und Aktivierung einer autoreaktiven B-Zelle führen [25-28]. Diesem als Toleranzbruch bezeichneten Phänomen liegt ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen Defekten und Umwelteinflüssen zugrunde. So sind als Auslöser von Krankheitsschüben unter anderen Hormonstörungen, Infektionen, physikalische sowie chemische Faktoren wie ultraviolettes Licht oder bestimmte Medikamente bekannt [29].

Die Rolle der Autoantikörper bei Autoimmunerkrankung ist nicht eindeutig. Grundsätzlich können sie an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein, sekundär aus krankheitsbedingten Gewebeschädigungen resultieren oder harmloses Merkmal eines Toleranzbruches sein [27]. So haben einige Menschen einen positiven Serotiter für Autoantikörper, ohne klinische Symptome zu zeigen. Daher ist es unklar, ob Autoantikörper ein frühes Anzeichen für eine spätere Autoimmunerkrankung darstellen. Ausschlaggebend scheint jedoch die Höhe des serologischen Autoantikörpertiters zu sein, denn Autoantikörper sind meist physiologisch (beispielsweise Antinukleärer Antikörper (ANA), dsDNA-Antikörper und Anti-Phospholipid-Antikörper (APA)). Erst ein Überschreiten eines bestimmten Titers gilt dann als pathologisch. Manche Autoantikörper sind allerdings von vornherein als pathologisch zu werten (beispielsweise Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) und Endomysiale Antikörper (EMA)). Dieses unterschiedliche pathologische Potential resultiert aus dem Zielepitop des Antikörpers. Antikörper gegen Oberflächenmoleküle wie Zytokin- oder Hormonrezeptoren sind streng pathologisch, während Antikörper gegen lösliche Substanzen im Serum wie z.B. phospholipidbindende Proteine oder intrazelluläre, nicht zugängliche Antigene wie Kern- oder DNA Epitope nur bedingt oder keine direkte pathologische Wirkung zeigen. Diese Antikörper können jedoch durch Ansammlung von Immunkomplexen in der Niere zu klinischen Symptomen einer Glomerulonephritis führen. Aufgrund der genetischen Prädisposition und der anhaltenden Autoimmunreaktion kann es häufig zu weiteren Toleranzbrüchen und zur Entwicklung sekundärer Autoimmunerkrankungen kommen. Autoantikörper stellen damit in Patienten mit multiplen Autoimmunerkrankungen mehr als nur eine diagnostisches Referenz dar. Sie

fördern vielmehr die Pathogenese über die unter 1.1.2.3. beschriebenen Mechanismen. Hier zeigt sich zum ersten Mal ein Problem bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit Plasmazellen. Während cytotoxische T- und NK-, sowie B- Zellen durch Zytostatika und Immunsuppressiva eliminiert werden können, werden langlebige, nicht proliferierende Plasmazellen durch diese Therapie nicht angegriffen [30-32]. Die Antikörper, welche die Autoantigene markieren, induzieren nach Absetzen der Medikation die Immunreaktion über Fc-Rezeptoren von neuem. Vor kurzem gelang es allerdings, Plasmazellen mittels des Proteasominhibitors Bortezumib in autoimmunen NZB/W F1 Mäusen zu eliminieren. Diese Tiere entwickeln ein Lupus ähnliches klinisches Bild. Nach der Behandlung mit Bortezumib zeigte sich eine deutlichen Rückgang der Symptome [32]. Eine präventive Medikamentengabe verhinderte den Ausbruch der Krankheit komplett.

### 1.1.2.5. Lokalisation und Lebensdauer von Plasmazellen

Infolge eines Antigenkontaktes kommt es zu der in 1.1.2.2. beschriebenen Aktivierung der B-Zelle mit anschließender Ausdifferenzierung zur Plasmazelle. Die erste Welle an Plasmazellen produziert schwach affine IgM Antikörper. Im Verlauf der Immunreaktion machen die B-Zellen eine Affinitätsreifung durch. Dabei kommt es zur Änderung des Fc-Teils der produzierten Antikörper, dem so genannten Klassenwechsel, was mit einer Modifikation des Wirkspektrums des Antikörpers einhergeht (siehe 1.1.2.2. und 1.1.2.3.). Neben der B-Zellaktivierung in Follikeln oder der Marginalzone der Follikel sekundärer lymphatischer Organe wie Milz, Lymphknoten oder Peyer Plaques können B-Zellen auch extrafollikulär aktiviert werden. Dieses ist vor allem im Zusammenhang mit den kostimulatorischen Signalen wichtig, die die B-Zelle während der Aktivierung erhält. Insbesondere sei hier die T-Zellhilfe und das Zytokinmillieu erwähnt. Denn aufgrund unterschiedlicher Aktivierungswege und -orte können sich die Plasmazellen in ihrem Migrationsverhalten, der Ausprägung der Ig Klasse und Adhäsionsmoleküle, sowie dem Potential, langlebig zu werden, unterscheiden [4, 7, 8, 19, 33-35].

Während der Differenzierung zu Plasmazellen verändern B-Zellen ihr Chemokinrezeptorrepertoire, was ihnen ermöglicht, in andere Orte als die der Antigenpräsentation und B-Zellaktivierung zu wandern. Da Chemokine gewebespezifisch bzw. lokal gebildet werden, ermöglichen sie Zellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen, aktiv entlang eines Gradienten zu den Orten höchster Konzentration zu wandern. Trotz der Expression von Chemokinrezeptoren während aller Reifestadien, können nur unreife Plasmazellen – die Plasmablasten - nicht aber reife Plasmazellen wandern [36]. Alle Plasmazellen tragen den Rezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche und können somit gegen

dessen Liganden CXCL12 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1α) migrieren. Dieser wird von Stromazellen im Knochenmark sezerniert und spielt eine ganz entscheidende Rolle für die Lokalisation der Plasmazellen in diesem Organ. So zeigen CXCR4 defiziente Plasmazellen eine gestörte Akkumulation im Knochenmark [37]. CXCL12 wird jedoch ebenfalls in der roten Pulpa der Milz sowie im mukosalem Epithelium sezerniert und steuert dort die Lokalisation der Plasmazellen. Für die Einwanderung in mukosale Gewebe ist allerdings CCR10 von größerer Bedeutung, da dessen Ligand CCL28 (mucosa-associated epithelial chemokine, MEC) spezifisch von Epithelzellen in den Schleimhäuten produziert wird. CCR9, ebenfalls ein Rezeptor für die mukosale Migration, ermöglicht die selektive Einwanderung in die Dünndarmschleimhäute, da sein Ligand CCL25 (thymus-expressed chemokine, TECK) ausschließlich in Peyers Plaques und den mesenterialen Lymphknoten exprimiert wird [33, 38]. Beide mukosalen Chemokinrezeptoren, CCR9 und CCR10, werden hauptsächlich auf IgA Plasmazellen exprimiert. Somit stellt dimeres IgA, welches in großen Mengen (bis zu 66mg pro kg Körpergewicht und Tag) durch die Schleimhäute sezerniert wird, eine wichtige Schutzbarriere und die Hauptklasse an Ig in diesen Geweben dar. Ein weiterer Chemokinrezeptor auf Plasmazellen ist CXCR3, dessen Liganden CXCL9 (MIG), -10 (IP-10) und -11 (I-TAC) von verschiedenen Zellen in entzündeten Geweben produziert werden. Dieses ermöglicht den Plasmazellen, als Effektorzellen direkt in potentiell infizierte Areale einzuwandern und mittels der unter 1.1.2.3. beschriebenen Mechanismen Pathogene schnell und lokal zu bekämpfen.

Plasmazellen die in Folge einer Primärantwort in sekundären lymphatischen Organen gebildet werden, haben eine kurze Lebensspanne (weniger als drei Tage) und sterben im Zusammenhang mit ihrer hohen Antikörpersynthese an ungefaltetem Protein Stress [39]. Im Knochenmark finden sich nach einer Primärantwort meist nur wenige Plasmazellen. Nach einem wiederholten Antigenkontakt werden Plasmazellen aufgrund der Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen deutlich schneller generiert und ihre Zahl sinkt in der Milz auch schneller wieder ab (Tag 1- Tag 8). Nach einer solchen Sekundärimmunisierung lässt sich die Plasmazellmigration von der Milz in das Knochenmark beobachten. Beginnend an Tag 3 hat die Plasmazellzahl zwischen Tag 6 und 7 ihr Maximum im Knochenmark [36]. Auch nach einer Sekundärantwort stirbt innerhalb der ersten zwei Wochen der Großteil der Knochenmarkplasmazellen (80-90%) ab. Die verbleibenden Plasmazellen sind in ihrer Zahl über Monate bis Jahre stabil und sorgen so für den persistierenden Antikörpertiter im Blut [18, 19]. Diese langlebigen Knochenmarkplasmazellen stellen somit Gedächtnisplasmazellen dar, die zum Großteil im Knochenmark lokalisiert sind, obgleich sich langlebige Plasmazellen in geringeren Zahlen auch in anderen Organen finden [40, 41].

Die unterschiedlichen Potentiale für eine Plasmazelle, langlebig zu werden, bzw. für ein Organ, Plasmazellen lange Zeit am Leben zu halten, ergeben somit intrinsische und extrinsische Faktoren, die das Schicksal der Plasmazelle bestimmen. Die hohe Antikörpersyntheserate führt zu endoplasmatischem Stress, welcher stark apoptotisch wirkt. Um diesem entgegenzuwirken, muss die ungefaltete Protein Antwort (UPR) induziert werden, was maßgeblich über den Transkriptionsfaktor XBP-1 reguliert wird [4, 17]. Die Überlegenheit von Plasmazellen, mit affinitätsgereiften Immunglobulin gegenüber solchen mit schwachaffinen Ig langlebig zu werden, ist unter anderem ein Unterschied zwischen der primären und sekundären Immunreaktion und wurde in vielen Studien gezeigt und diskutiert [2, 8, 42]. Aiolos ist hierfür der entscheidende Transkriptionsfaktor, der zwar nicht die Affinitätsreifung in den B-Zellen beeinflusst, jedoch die Akkumulation von Plasmazellen mit hochaffinen Ig im Knochenmark reguliert [43].

Auch bei gleichem intrinsischem Potential ist die Langlebigkeit für Plasmazellen nicht per se gesichert, sondern hängt von der Stimulation antiapoptotischer Signale durch die Umgebung ab [44]. Die unterschiedliche Verteilung langlebiger Plasmazellen zwischen den einzelnen Organen belegt zudem die ungleichen Kapazitäten der Organe, Milieus mit diesen Stimuli bereitzustellen.

## *1.2. Die Plasmazellnische*

Um überleben zu können, benötigt die Plasmazelle eine permanente Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden. Diese Stimuli erhält sie aus ihrer Mikroumgebung – der so genannten Überlebensnische –, in der sie für mehrere Monate bis Jahre persistieren kann.

### 1.2.1. Das Nischenkonzept und potentielle Plasmazellüberlebensfaktoren

Das Konzept einer Nische ist ein weit verbreitetes Modell bei der Hämatopoese [45, 46]. Von der Stammzelle beginnend erhalten die reifenden Zellen Überlebens- und Entwicklungssignale in ihrer Mikroumgebung (siehe Abb. 1) [47]. Diese können jedoch für jeden Entwicklungstand unterschiedlich sein, weshalb die Zellen mittels Chemokin dirigierter Migration in das entsprechende Mikrokompartimente gelenkt werden. So prägen Plasmazellen den Chemokinrezeptor CXCR4 aus, was eine Migration gegen CXCL12 (SDF-1) ermöglicht und vor allem für die Wanderung in das Knochenmark wichtig ist [36, 48]. Ein Teil der Plasmazellen trägt auch die Chemokinrezeptoren CCR9, CCR10, welche für die mukosale Migration entscheidend sind, oder CXCR3, welcher die Plasmazellen in entzündete Gewebe dirigiert [33].

Neben Chemokinen sind Adhäsionsmoleküle immer Bestandteil einer Nische, da diese es den Zellen mit dem komplementären Molekül auf der Oberfläche ermöglichen, sich in der Nische zu verankern. So exprimieren alle Plasmazellen das $\alpha_4\beta_1$-Integrin VLA-4 (Very late antigen-4), welches an VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) bindet. Mukosal induzierte Plasmazellen exprimieren zusätzlich $\alpha_4\beta_7$, was ihnen eine Lokalisation in diesen Geweben ermöglicht, da der $\alpha_4\beta_7$-Ligand MadCAM-1 (Mucosal addression cell-adhesion molecule-1) ausschließlich in den Schleimhäuten gebildet wird. Unterbindet man die Plasmazelladhäsion an stromale Zellen durch VLA-4 blockierende Antikörper, führt dieses zu einer Reduktion der Plasmazellen [49]

Die dritte Faktorengruppe bilden diejenigen Moleküle, welche der Zelle Entwicklungs- bzw. Überlebenssignale vermitteln. Entfernt man Plasmazellen aus ihrer Nische und übersetzt sie in eine Kultur, sterben sie innerhalb weniger Tage. Wie oben bereits erwähnt, benötigen die Plasmazellen daher eine permanente Stimulation antiapoptotischer Signale, wie die ausreichende Induktion der ungefalteten Protein Antwort (UPR), welche dem endoplasmatischen Stress aufgrund der hohen Antikörper Synthese entgegenwirkt. Mittels löslicher Zytokine kann so die durchschnittliche Überlebensrate auf drei bis fünf Tage verlängert werden, wobei IL-6, SDF-1, APRIL und TNF-a die beste Wirkung erzielten. Eine zusätzliche Steigerung der Überlebensrate ließ sich durch Synergieeffekte zwischen IL-6 und CD44 bzw. BCMA Stimulation erreichen [50, 51]. Liganden von CD44 sind die extrazellulären Matrixmoleküle Hyaloronsäure, Kollagen und Fibronektin, welche unter anderem die Eigenschaft haben, Zytokine zu binden und so lokal aufzukonzentrieren [52]. Neben *in vitro* Studien wurden potentielle Plasmazellfaktoren vor allem in Knock-out Mäusen identifiziert. In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, ob ein Faktor essentiell ist, wie z.B. die BCMA Stimulation durch APRIL / BAFF [51], oder sie sich auf die Akkumulation auswirken, wie z.B. CXCR4 oder IL-6 [37, 53, 54].

Einige Zytokine haben demnach zwar das Potential, als Plasmazellüberlebensfaktoren mit guten synergistischen Effekten zu wirken, sind *in vivo* jedoch nicht essentiell. So können z.B. über gp130 vermittelte Signale durch die Mitglieder der IL-6 Familie kompensiert werden [53]. Die Untersuchung der unmittelbaren Umgebung der Plasmazelle auf Überlebensfaktoren erscheint daher unumgänglich. Dennoch konnte bisher einzig die SDF-1+, VCAM-1+ retikuläre Zelle als Komponente der Nische identifiziert werden [55]. Aufgrund dessen ist ebenfalls nicht geklärt, ob eine oder mehrere Zellen zur Nische beitragen, wie es von verschiedenen Autoren diskutiert wird [45, 47].

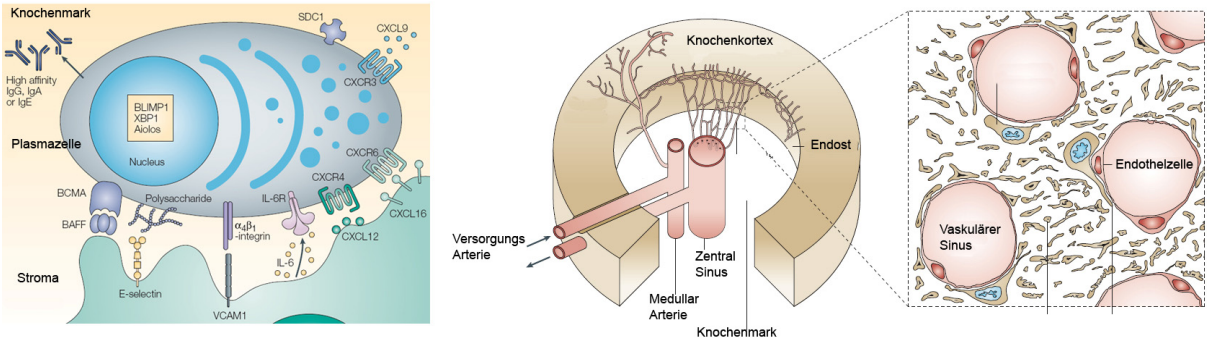



**Abb. 1: Potentielle Faktoren der Plasmazellnische und Aufbau des Knochenmarks.** Links: Faktoren, die einen stimulierenden Einfluss auf Plasmazellen gezeigt haben und Teil der Plasmazellnische sein könnten. Mitte und Rechts: Aufbau des Knochenmarks. Für Details siehe Text. Adaptiert aus Shapiro-Shelef,2005, *Nat.Rev.Immun* und Nagasawa, 2006, *Nat.Rev.Immun.*

## 1.2.2. Aufbau des Knochenmarks

Das Knochenmark befindet sich in Knochenhohlräumen des gesamten Skelettes. Es ist das Hauptorgan der Hämatopoese und daher maßgeblich an der Blutbildung beteiligt.

Die Hämatopoese findet in einem Netzwerk verschiedener Mikrokompartimente - dem roten Knochenmark - statt, während das gelbe Knochenmark aus Fettzellen besteht und nicht an der Blutbildung beteiligt ist.

Das Knochenmark wird von zwei Arten retikulärer Zellen durchzogen. Zum einem von Fibronektin+ Fibroblasten mesenchymalen Ursprungs und zum anderen von Knochenmarkendothelzellen (BMEC). Die Endothelzellen spannen, vom Knochenrand (Endost) ausgehend, ein dichtes Netzwerk aus gefensterten Kapillaren auf, welche sich über Sinusoide in den zentralen Sinus sammeln (siehe Abb. 1) [47]. Dieses ermöglicht eine optimale Emigration gereifter Blutzellen, aber auch die Immigration rezirkulierender Zellen. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen hat sich die Unterteilung in endostale und vaskuläre Nische entwickelt [45, 56]. Zwischen diesen makroskopischen Nischen wird das Knochenmark von heterogenen retikulären Stromazellen durchzogen, welche mit Leukozyten verschiedener Entwicklungsstadien assoziiert sind [47]. So produzieren Subpopulationen dieser Stromazellen verschiedenste hämatopoetische Faktoren, darunter auch das für Plasmazellen relevante CXCL12. CXCL12+ Fibroblasten finden sich vorwiegend in der Nähe von Gefäßen und ermöglichen so die Lokalisation in der vaskulären Nische, weshalb CXCL12 auch eine tragende Rolle bei Einwanderung und Verlassen des Knochenmarks spielt. Es ist somit kein Plasmazell spezifisches Chemokin, sondern zieht unter anderem auch HSC und Megakaryozyten an [57-59].

Aufgrund dieser mikrostrukturellen Aufteilung des Knochenmarks scheinen Plasmazellen über das gesamte Organ verteilt zu liegen, weshalb es einer genauen Untersuchung der Mikroumgebung bedarf.

## *1.3. Megakaryozyten und Thrombopoese*

Die Thrombopoese ist Teil der Hämatopoese und bezeichnet den Prozess der Thrombozyten- bzw. Blutplättchenbildung im Knochenmark. Die hämatopoetische Stammzellen entwickeln sich über Megakaryoblasten zu Megakaryozyten weiter, welche in die vaskuläre Nische migrieren und dort die Thrombozyten durch die Gefäßwände des gefensterten Endothels direkt in das Blut abschnüren. Die Thrombozyten sind daher kernlos und nur in geringer Zahl im Knochenmark zu finden. Als Effektorvesikel besteht ihre Hauptaufgabe in der Verschließung von Wunden, der Freisetzung von bioaktiven antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen wie z.B. SDF-1 und IL-6, welche weitere Zellen anlocken und aktivieren [60, 61]. Dadurch wird eine Kaskade zur Wundheilung und Bekämpfung eingedrungener Pathogene initiiert. Die Zytokine, welche in den Thrombozyten eingeschlossen werden, werden von den Megakaryozyten produziert und dienen im Fall von IL-6 und APRIL auch als autokriner Faktor [62-64]. Interessanterweise verändert sich die Zytokinsynthese mit fortschreitender Reifung und bevorstehender Thrombozytenabschnürung [65].

Häufig wird die Entwicklung der kernhaltigen Thrombozytenproduzenten, der großen polyploiden Megakaryozyten, auch als separater Prozess, der Megakaryopoese, untersucht und beschrieben.

### 1.3.1. Megakaryopoese

Die Megakaryopoese, welche die Reifung des Megakaryozyten bis zur Abschnürung der Thrombozyten beschreibt, wird maßgeblich durch das Zytokine Thrombopoetin (TPO) angetrieben [66-69]. TPO, welches an den Rezeptor c-Mpl bindet, rekrutiert HSC für die Megakaryopoese und fördert die Zellteilung und die Vervielfältigung der DNA zu polyploiden Kernen (Chromosomensätze (n)= 2 bis 128) [70] [68, 71]. Die Applikation von TPO führt somit zur Erhöhung der Megakaryozytenzahlen in Knochenmark und Milz, zu einer verlängerten Reifung der Megakaryozyten mit höheren Ploidiegraden und zu einem Anstieg zirkulierender Thrombozyten [70]. Die Megakaryopoeseinduktion über TPO ist selbstregulierend, da systemisches TPO, welches konstitutiv in der Leber produziert wird, an c-Mpl auf der Oberfläche von Thrombozyten bindet. Eine Erhöhung der Thombozytenzahlen

im Blut führt somit zu einer Erniedrigung der TPO Konzentration und somit zur Abnahme der Megakaryopoese. TPO spielt besonders für die frühe Megakaryopoese eine wesentliche Rolle [68]. Später im Verlauf der fortschreitenden Reifung stabilisieren Knochenmarkstromazellen die Megakaryozyten über Fibronektin und verhindern eine vorzeitige Thrombozytenabschnürung [72, 73]. Für die Abschnürung der Thrombozyten tragen vor allem Faktoren wie SDF-1 und Fibroblast Growth Faktor 4 (FGF-4) bei [57]. Beide sorgen für eine bessere Bindung der VLA-4+ Megakaryozyten in der vaskulären Nische durch die Hochregulation von VCAM-1.

Zytokine wie SCF, IL-11, IL-3 und IL-6 beeinflussen ebenfalls die Megakaryopoese und wirken zum Teil synergistisch mit TPO [72] [74, 75], ermöglichen aber auch eine TPO unabhängige Megakaryopoese [57]. Dieses führt unter anderem dazu, dass es in der c-Mpl Knock-out zu keiner Komplettdepletion von Megakaryozyten kommt [66, 69]. Besonders komplex scheint hierbei die Rolle von IL-6 zu sein. In Kulturexperimenten mit Knochenmarkzellen zeigt sich, dass IL-3 für die frühe Megakaryopoese entscheidend ist und IL-6 vor allem auf die anschließende Proliferation, Differenzierung und das Zellwachstum [74] wirkt. Weiterhin konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass IL-6 die TPO Synthese in Milzzellen (HepG2) bzw. der Milz von IL-6 behandelten Patienten induziert und zu einer erhöhten TPO Konzentration im Serum führt [76].

### 1.3.2. Megakaryozyten in der Klinik

Die Thrombozytenzahl im Serum ist ein wichtiger klinischer Parameter und das Unterschreiten (Thrombozytopenie) bzw. das Überschreiten (Thrombozytose) des Normwertes von 150.000 – 380.000 Thrombozyten/µl Blut kann zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Die Thrombozytose führt zur verstärkten Bildung von Thrombosen, Fibrosen, Mikrozirkulationsstörungen und Embolien, während es bei einer Thrombozytopenie zur Bildung von Hämatomen und dem Auftreten gefährlicher Spontanblutungen kommt. Beide Erkrankungen können durch direkte Störung der Thrombopoese bedingt sein, wie bei der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT) oder der essentiellen Thrombozythämie, sowie als Sekundärerscheinung auftreten. Hier sei vor allem die Autoimmunerkrankung der Immunthrombozytopenie genannt, bei der thrombozytenspezifische Antikörper für das Absinken der Thrombozytenzahlen im Serum verantwortlich sind.

Zur Behandlung von thrombozytopenen Patienten werden TPO und insbesondere TPO Mimetika erfolgreich eingesetzt [77].

## *1.4. Zielstellung der Arbeit*

Langlebige Plasmazellen im Knochenmark sorgen für einen persistierenden Antikörpertiter im Blut. Es ist daher das Ziel von Schutzimpfungen, eine möglichst hohe Zahl an langlebigen Gedächtnisplasmazellen im Knochenmark zu etablieren und so einen protektiven Antikörpertiter zu erreichen. Andererseits stellen Autoantikörper bei Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes und der Immunthrombozytopenie ein Problem dar. Denn langlebige autoreaktive Plasmazellen sind einer konventionellen immunsuppressiven Therapie häufig nicht zugänglich, was zu einem wesentlich schnelleren Krankheitsrückfall führt.

Man geht davon aus, dass langlebige Plasmazellen in einer Nische geschützt sind, in der sie anitapoptotitische Signale erhalten. So konnten in den letzten Jahren einige potentielle Plasmazellüberlebensfaktoren identifiziert werden. Diese Daten stammen allerdings meist aus Kulturexperimenten oder Mausmutanten, daher ist bis heute kaum etwas über die zelluläre Zusammensetzung der Plasmazellnische bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die zelluläre Umgebung der Knochenmarkplasmazellen zu identifizieren und den molekularen Beitrag an Plasmazellüberlebensfaktoren der Nischenzellen zu untersuchen. Ebenso sollte im Hinblick auf eine Verbesserung von Impfprotokollen und der Therapie von Autoimmunerkrankungen die Nischenzellpopulation manipuliert und die Auswirkung auf das Plasmazellkompartiment untersucht werden.

# 2. Material und Methoden

## *2.1. Verwendete Materialien*

### 2.1.1. Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterial

| **Bezeichnung** | **Zusammensetzung** | **Herkunft** |
|---|---|---|
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) | 8 g/l NaCl,<br>0,2 g/l KCl,<br>1,44 g/l Na2HPO4 | Roth, D<br>Sigma-Aldrich, D<br>Sigma-Aldrich, D |
| PBS mit bovinem Serum Albumin (PBS/BSA) | PBS 0,5 % BSA | Biomol, D |
| PBS mit 3% bovinem Serum Albumin (PBS/ 3% BSA) | PBS 3 % BSA | Biomol, D |
| RPMI Plus | RPMI Medium<br>10 mM L-Glutamat<br>10 % fetales Kälberserum<br>20 µM β-Mercaptoethanol<br>100 U/l Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin | Life Technologies, GB<br>Invitrogen, USA<br>Invitrogen, USA<br>Invitrogen, USA<br>Invitrogen, USA<br>Invitrogen, USA |
| FITC BrdU Flow Kit | BD Cytofix/Cytoperm Buffer<br>BD Cytoperm Plus Buffer<br>BD DNAse solution<br>BD Perm/Wash Buffer | BD Pharmingen, D |
| Bromodeoxyuridine (BrdU) | Bromodeoxyuridine | Sigma-Aldrich, D |
| ELISPOT Substrat | BCIP/NBT | GeneTex, USA |
| ELISA Entwicklungspuffer | ALP Kit | Roche, D |
| MultiScreen HTS Filter Plates for ELISPOT | | Millipore, USA |
| LD MACS Säule | | Miltenyi, D |
| Einbettmedium | O.C.T. Medium | Sakura, USA |
| Objektträger | SuperFrost Ultra Plus-Objektträgern | Menzel-Gläser, D |

### 2.1.2. Antigene, Adjuvanz und rekombinante Zytokine

| **Bezeichnung** | **Hersteller** |
|---|---|
| Aluminiumhydroxid | Thermoscientific, D |
| Ovalbumin | Sigma-Aldrich, D |

| | |
|---|---|
| NP-KLH | Sigma-Aldrich, D |
| rekombinantes IL-6 | R&D Systems, USA |
| rekombinantes TPO | PreproTech, D |

## 2.1.3. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

| **Spezifität** | **Klon / Wirt** | **Konjugat** | **Herkunft** |
|---|---|---|---|
| APRIL | Kaninchen | ungekoppelt | Stressgen |
| B220 | RA3.6B2 | FITC, Cy5, | DRFZ, D |
| BrdU | 3D4 | FITC | BD Pharmingen, D |
| CD138 (Syndecan-1) | 281-2 | Pe | BD Pharmingen, D |
| CD150 | 9D1 | Bio | AbD Serotec, D |
| CD3 | | FITC | DRFZ, D |
| CD41 | MWReg30 | FITC, Bio | AbD Serotec, D |
| CD48 | OX-78 | FITC | AbD Serotec, D |
| CD61 | 2C9.G2 | FITC | BD Pharmingen, D |
| c-Kit | ACK4 | Cy5 | DRFZ, D |
| Endothel | B78 | Dig, Cy5 | DRFZ, D |
| FcγR II / III (CD32/CD16) | 2.4G2 | ungekoppelt | DRFZ, D |
| Fibronectin | Kaninchen | ungekoppelt | Sigma-Aldrich, D |
| Gr-1 | RB6-8C5 | Dig | DRFZ, D |
| IgA | Ziege | Bio | Southern Biotech, USA |
| IgD | 11.26c | Cy5 | DRFZ, D |
| IgG1 | A85-1 | FITC | BD Pharmingen, D |
| IgM | | Bio | BD Pharmingen, D |
| IL-4 | 11B11 | Dig | DRFZ, D |
| IL-6 | MP5-20F3 | Dig | DRFZ, D |
| κ-leichte Kette | 187.1 | FITC, Cy5, A405 | DRFZ, D |
| λ-leichte Kette | JC5-1 | FITC | BD Pharmingen, D |
| Mac-1 | M1/70.15.11 | Cy5 | DRFZ, D |
| Ovalbumin | | Cy5 | DRFZ, D |
| PI | | | Sigma-Aldrich, D |
| SDF-1 α | MAB350 | Bio | R&D Systems, USA |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sca-1 | E13-161.7 | PE | BD Pharmingen, D |
| Sytox orange | | | Invitrogen, D |
| Ter119 | | Dig, FITC | DRFZ, D |
| TNF-α | MP6-XT22 | Bio | DRFZ, D |
| VCAM-1 | 429 | Cy5 | BD Pharmingen, D |
| SA | | Cy5, A546, | DRFZ, D |
| SA | | AP | BD Pharmingen, D |
| Anti-Dig | Schaf | A405, A546 | DRFZ, D |
| Anti-FITC | | Magnetic Beads | Miltenyi, D |
| Anti-Kaninchen | Ziege | A647, A546 | Invitrogen, D |
| Anti-Ziege | Esel | A647 | Invitrogen, D |

## 2.1.4. Geräte und Software

| **Bezeichnung** | **Hersteller** |
|---|---|
| Brutschrank Heraeus 6000 | Heraeus, D |
| Durchflusszytometer FACS LSR II | BD, D |
| konfokales Laser-Scanning Mikroskop, LSM DM IRE2 | Leica Microsystems, D |
| Kryostat Microm HM 500 OM | Microm-Laborgeräte, D |
| MidiMACS | Miltenyi, D |
| Sterile Werkbank HERA safe | Heraeus, D |
| Zellsorter FACS Diva | BD, D |
| Zentrifuge Biofuge fresco | Heraeus, D |
| Zentrifuge Multifuge 3 S-R | Heraeus, D |
| Zellzählgerät Casy DT | Schärfe Systems, D |
| | |
| **Software** | |
| Prism 4 | GraphPad |
| Softmax Pro 3& 5 | Molecular Devices, USA |

| | |
|---|---|
| Image J | National Institute of Health, USA |
| Leica Confocal Software | Leica, D |
| FlowJoe7 | Tree Star Inc., USA |

## *2.2. Mausstämme und Behandlung*

### 2.2.1. Verwendete Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme BABL/c und C57BL/6 wurden in der Versuchstieranlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Die Thrombopoetinrezeptor defizienten Mäuse (c-Mpl -/-) wurden von Warren Alexander, WEHI generiert und von Christof Dame, Charité, zur Verfügung gestellt. Die APRIL-/- Mäuse waren eine freundliche Gabe von Raif Geha und die Blimp1-/- Mäuse von Stephen Nutt. Die IL-6-/- Tiere wurden über Jackson Lab bezogen Die Haltung und die durchgeführten Experimente entsprachen den Tierschutzbestimmungen und wurden von der LAGeSo-Berlin genehmigt.

### 2.2.2. Immunisierung

Für die Primärimmunisierung wurde Ova (1 µg/ 1µl PBS) 1:1 mit Alum präzipitiert und 200µl dieser Suspension den Mäusen intraperitoneal (i.p.) appliziert. Drei Wochen später erhielten die Tiere eine Sekundärimmunisierung durch intravenöse Injektion von 100µg Ova in 100µl PBS. Für die NP Immunisierung erhielten die Tiere einmal oder in einem Abstand von drei Wochen 50µg Alum-präzipitiertes NP-KLH i.p.

Die Sekundärimmunisierung in den Experimenten mit c-Mpl -/- Tieren wurde verändert, da diese sehr stark darauf reagierten und es zu einer hohen Mortalität kam. Daher wurde 30µg/100µl PBS an 100µl Alum präzipitiert und i.p. verabreicht.

### 2.2.3. Induktion der Megakaryopoese durch Thrombopoetinbehandlung

Zur Induktion der Megakaryopoese wurde BALB/c Mäusen TPO verabreicht. Jedes Tier erhielt an fünf aufeinander folgenden Tagen (Tag 0– 4) eine Injektion (i.p) mit 0,3 µg

TPO, gelöst in 100 µl PBS/BSA, was einer Menge von 10µg/kg entspricht. Die Kontrollgruppe erhielt 100ml PBS/ BSA.

### 2.2.4. Unterscheidung langlebiger und neu gebildeter Plasmazellen mittels BrdU-Einbau

Proliferierende und nicht proliferierende Plasmazellen wurden über den Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU) unterschieden. BrdU ist ein Analogon der endogenen Base Thymidin und wird kompetitiv an Stelle dieser Base in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA teilungsaktiver Zellen eingebaut. Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut haben, können so später mit einem spezifischen anti-BrdU-Antikörper durchflusszytometrisch und immunhistologisch identifiziert werden. Für BALB/c Mäuse hat sich gezeigt, dass die Effizienz des Einbaus in Plasmazellen sehr zuverlässig ist [18] und dass eine Fütterung über 14 Tage zur Unterscheidung zwischen kurz (BrdU+)- und langlebigen (BrdU-) Plasmazellen ausreichend ist [31]. Die BrdU Gabe erfolgte kontinuierlich über das Trinkwasser in einer Konzentration von 1 mg/ml, welchem 1 % Glukose zur besseren Akzeptanz durch die Tiere zugesetzt war. Da in Wasser gelöstes BrdU lichtempfindlich ist, wurden die Wasserflaschen mit Alufolie umwickelt und alle drei bis vier Tage erneuert.

## *2.3. Durchflusszytometrische Analyse*

### 2.3.1. Herstellen von Einzelzellsuspensionen

Nach Töten der Maus durch zervikale Dislokation und der Desinfektion des Fells mit 70%igem Ethanol wurden die Milz, sowie ein Femur und beide Tibia entnommen. Anschließend wurde zur Herstellung einer Einzelzellsuspension die Milz durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 70 µm (BD Falcon, D) gedrückt und in kaltem PBS/ EDTA aufgenommen. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Enden der Röhrenknochen entfernt, das Mark mit PBS/EDTA herausgespült und dann ebenfalls durch ein Zellsieb gedrückt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 10 min bei 300 g zentrifugiert, das Pellet in PBS/BSA aufgenommen und erneut zentrifugiert.

### 2.3.2. Oberflächenfärbungen

Die Färbungen und Inkubationen erfolgten in 100µl PBS/ BSA bei 4°C im Dunkeln. Zuerst wurde die Einzelzellsuspension mit unmarkiertem Anti-FcγR-Antikörper (10 µg/ml) für 10 min inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper über den Fc-Teil zu unterdrücken. Die anschließende Primärfärbung erfolgte mit markierten Antikörpern. Die Inkubationszeit variierte mit den verwendeten Antikörpern und lag zwischen 15 Minuten und einem Tag. Ebenso wurde die adäquate Konzentration für jeden Antikörper in Vorversuchen ermittelt und lag bei 1 – 5 µg/ml. Im Anschluss folgte ein Waschschritt mit 1 ml kaltem PBS (10 min, 4°C, 300 g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen gegebenenfalls in einem Sekundärreagenz aufgenommen, wie zuvor beschrieben gefärbt und gewaschen. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen in PBS/BSA aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert.

### 2.3.3. Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Pharmingen, D) nach den Anweisungen des Herstellers fixiert und permeabilisiert. Die daraufhin zugänglichen intrazellulären Antigene konnten anschließend gefärbt werden, und fixierte Zellen verblieben bis zur Analyse in PBS/BSA bei 4°C.

### 2.3.4. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung von Einzelzellen aufgrund ihrer Größe und Granularität sowie der Ausprägung membranständiger und intrazellulärer Moleküle. Da Leukozyten ein bestimmtes Muster an Oberflächenmolekülen - den cluster of differentiation, CD - exprimieren, lassen sie sich bestimmten hämatopoetischen Linien und Entwicklungsstadien zuordnen. Diese CDs müssen jedoch für die durchflusszytometrische Detektion zuvor mit fluorochromgekoppelten Antikörper markiert werden. Die Zelle wird im Durchflusszytometer mit Laserlicht verschiedener Wellenlängen bestrahlt und emittiert abhängig von der gebundenen Fluoreszenz Licht, welches durch spezielle Filter absorbiert wird. Zusätzlich können Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten durch die Lichtbrechung an ihrer Oberfläche identifiziert werden. Hierfür sind die Größe und die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen entscheidend. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird in einem Winkel von 3 – 10° gemessen und lässt auf die Zellgröße schließen. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) wird orthogonal von der Zelle gemessen und zeigt die Granularität der Zelle an. Die

FSC, SSC und Fluoreszenzsignale lassen sich im zweidimensionalen Punktdiagramm (dot plot) oder im Histogramm darstellen, wodurch es möglich wird, Aussagen über die Frequenz und Signalstärke selektierter Zellpopulationen zu treffen. Die Anzahl der Laser determiniert die Anzahl der messbaren Parameter bzw. Fluorochrome und somit die Merkmale, über die eine Zelle charakterisiert werden kann. Das für die Versuche verwendete Durchflusszytometer LSR II der Firma Becton Dickinson ist mit 4 Lasern ausgestattet, UV (Anregungswellenlänge: 355 nm), violett (Anregungswellenlänge: 405 nm), blau (Anregungswellenlänge: 488 nm) und rot (Anregungswellenlänge: 633 nm). Die akquirierten Daten wurden mit der FlowJoe7 Software (Tree Star Inc., USA) analysiert und ausgewertet.

### 2.3.5. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung werden spezifische Zellpopulationen nach Markierung der Zellen mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern getrennt. Somit entspricht das Prinzip dem des Durchflusszytometers. Der Flüssigkeitsstrahl im Gerät wird so verdünnt, dass einzelnen Tröpfchen maximal eine Zelle enthalten. Die gewünschte Zellpopulation wird über die Software ausgewählt, woraufhin die Tröpfchen, wenn sie die gewünschte Zelle enthalten, durch einen elektrischen Impuls abgelenkt und separat aufgefangen werden. Die Steuerung des Gerätes erfolgte mit der Cytomation Summit Software, V3.1 (Cytomation, USA). Die Zellsortierung fand am FACS Diva statt.

### 2.3.6. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl in der Einzelzellsuspension wurde mit dem vollautomatische CASY DT System bestimmt. Es basiert auf der elektronischen Pulsanalyse und erlaubt die Messung der Lebendzellzahl und der Zellgröße mit einer Messungenauigkeit von 0,1 µm. Zur weiteren Analyse wurden Zellen im Größenbereich von 5,5 – 15 µm gezählt. Die Zellzahl wurde dreimal gemessen und der Mittelwert vom Gerät als Zellkonzentration pro ml ausgegeben. Mit den aus Femur und Tibia gewonnenen Zellen wurden entsprechend ihres Anteils am Gesamtknochenmark die Zahlen für das gesamte Organ berechnet (ein Femur=6,3%; ein Tibia=3,1%) [78].

## *2.4. Histologische Analyse von Gewebeschnitten*

### 2.4.1. Anfertigen von Gewebeschnitten

Für histologische Analysen wurde der Maus ein Femur entnommen und gründlich von Fett- und Geweberesten gesäubert, flach in ein Schälchen mit O.C.T. Medium (Sakura, USA) gebettet und innerhalb von 10min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die gefrorenen Organe wurden bei -80°C gelagert. Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurden die Organe für mindestens eine Stunde im Microtom akklimatisiert. Das anschließende Schneiden erfolgte bei -17°C Objekttischtemperatur und -21°C Boxtemperatur. Für Standardanalysen wurden 8 µm dicke und für Tiefen- bzw. 3D Analysen wurden 30- 40µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost Ultra Plus-Objektträgern (Menzel-Gläser, D) aufgenommen. Die Schnitte wurden anschließend lichtgeschützt luftgetrocknet, für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert (Fixierung durch Wasserentzug) und wiederum luftgetrocknet. Die Objektträger mit den fertigen Schnitten wurden bei -80°C gelagert und entnommen, um Antauen und Wasserkondensation auf den getrockneten Schnitten zu vermeiden. Dies galt insbesondere für diejenigen, die in der Lagerung verbleiben, da die Wasserkristallisation beim erneuten Einfrieren zu Gewebeschädigungen führen kann.

### 2.4.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst bei RT aufgetaut und Reste des OCT-Mediums durch fünfminütige Inkubation in PBS und mehrmaliges Abspülen entfernt. Die Gewebe wurden, um ein Abfließen der Inkubationslösungen zu verhindern, mit einem Wachsstift (Dako Cytomation, DK) umrundet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit Fc-Block (10 µg/ml gelöst in PBS/3 %BSA) vorinkubiert, um unspezifische Bindung bei der Färbung zu minimieren. Die nachfolgenden Antikörper-Färbungen wurden mit PBS/ 3%BSA Puffer in einer dunklen, feuchten Kammer durchgeführt. Die optimale Färbekonzentration wurde in Vorversuchen für jeden Antikörper ermittelt. Sie betrug für immunhistologische Färbungen in der Regel 5 – 10 µg/ml. Die Primärfärbung erfolgte standardmäßig bei RT für 30 – 60 Minuten. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten entfernt. Einige Antikörper wurden jedoch aufgrund der schwachen und langsamen Bindung bei 4°C über Nacht inkubiert. Ebenso wurden die 30µm Schnitte länger gefärbt (2-3h) und gewaschen (30min). Wenn nötigt, erfolgte anschließend für ca. 30 Minuten eine Inkubation mit Sekundärreagenzien. Nach drei

weiteren Waschschritten wurde das Gewebe mit Einbett-Medium (Fluoreszent Mounting Medium, Dako Cytomation, DK) und Deckgläschen (Menzel-Gläser, D) eingeschlossen. Zum Erreichen der optimalen optischen Eigenschaften musste das Einbettmedium durchhärten. Dazu wurde das Präparat in Dunkelheit an der Luft getrocknet und bis zur Analyse am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ebenso gelagert.

### 2.4.3. Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Die durch Immunofluoreszenz angefärbten Gewebeschnitte wurden mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) analysiert (LSM Modell DM IRE2, Leica). Der Vorteil der LSM gegenüber konventioneller Mikroskopie besteht in der Verwendung monochromatischen Lichts und dem Einsatz von Lochblenden vor Detektor („Detektionspinhole“) und Laser („Anregungspinhole“). Dieses verstärkt die laterale und die Tiefenauflösung (z-Achse), denn die Lochblende vor dem Detektor engt den Schärfentiefebereich stark ein, weshalb nur Objekte scharf dargestellt werden, die genau in der Fokusebene liegen. Durch die Stapelaufnahme mehrerer Einzelbilder in verschiedenen Fokusebenen (z-Ebenen) lassen sich dreidimensionale Strukturen darstellen. Das DM IRE2 ist mit drei Lasern ausgestattet: einem Argon- (Anregungswellenlängen 488 nm), einem grünen (Anregungswellenlängen 543 nm) und einem roten HeNe-Laser (Anregungswellenlängen 633 nm). Dementsprechend ließen sich drei Merkmale in den Gewebeschnitten anfärben und untersuchen.

## *2.5. Untersuchungen in der Zellkultur*

### 2.5.1. Plasmazellkultur

Um den direkten Einfluss von TPO auf die Überlebensfähigkeit von Plasmazellen zu überprüfen, wurden Knochenmarkplasmazellen für drei Tage mit verschiedenen Kombinationen von TPO und dem Überlebensfaktor IL-6 kultiviert. Hierfür wurden je 300 reife, CD138(++) B220(-) MHCII(-) Plasmazellen direkt in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte sortiert. In diesen war je 250 µl Kulturmedium (RPMI Plus) vorgelegt, welches kein Zytokin, IL-6 oder TPO, bzw. beide Zytokine enthielt. Verwendet wurden IL-6 und TPO in folgenden Konzentrationen (IL-6: c = 10 ng/ml, TPO: c = 50 ng/ml). Den Kulturen war zusätzlich der Proliferationshemmer Hydroxyurea in einer Konzentration von 0,5 mM beigefügt, um ein artifizielles Ansteigen der Zellzahl durch Zellteilung zu unterdrücken. Die Kulturen wurden als 5-fach-Ansätze angelegt und für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 inkubiert.

Die Quantifizierung überlebender Plasmazellen erfolgte durch die unter 2.5.3. beschriebenen ELISPOT Methode.

## 2.5.2. Plasmazell Kokultur

Für die Gewinnung junger, migrationsfähiger Plasmazellen für die Plasmazell Kokultur wurden Balb/c Mäusen vier Tage nach einer Sekundärimmunisierung mit Ova die Milz entnommen. Anschließend erfolgte eine Erythrozytendepletion mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Dazu wurden die Erythrozyten mittels Ter119-FITC und anti-FITC-MagneticBeads Färbungen magnetisch markiert und über eine LD-Säule im MidiMACS entfernt. Im nächsten Schritt wurden je 2000 CD138++ Plasmazellen in verschiedene Zellkulturansätze durchflusszytometrisch sortiert. Zu den Kulturen gehörten jeweils dreifach Ansätze mit Medium, IL-6 (c = 10 ng/ml), CD61- (Kontrollzellen) und CD61+ Zellen (Megakaryozyten) aus einer fetalen Leberkultur. Die fetalen Leberzellen wurden 14 Tage nach der Verpaarung entnommen und für drei Tage mit TPO-haltigen Stromazellüberstand kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels MACS in CD61+ Megakaryozyten und CD61- Kontrollzellen aufgetrennt. Die Megakaryozytenansätze der Plasmazell Kokultur wurden mit rekombinanten TPO (c = 50 ng/ml) inkubiert; ein Teil erhielt zusätzlich IL-6 (c = 10 ng/ml). Um für die Plasmazellen möglichst gute Vorraussetzungen für eine Kolokalisation zu schaffen, wurde die Anzahl der CD61+ und CD61- Zellen so gewählt, dass sie ca. 80% der Gefäßbodens bedeckten. Die Kulturen wurden für vier bzw. fünf Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand für die Antikörperbestimmung im ELISA abgenommen und die Plasmazellzahl mittels ELISPOT bestimmt.

## 2.5.3. Enzyme Linked Immuno Spot Technique (ELISPOT)

Die Frequenzen der NP spezifischen Plasmazellen wurden mit NP sensitivem ELISPOT ermittelt. Dazu wurden 96 Loch ELISPOT Platten (Cellulose Ester Membran) mit $NP_{24}$- oder $NP_{13}$-Bovine Serum Albumin (BSA) beschichtet. Anschließend wurde mit einer Einzelzellsuspension aus Milz oder Knochenmark eine Verdünnungsreihe erstellt und diese für 2h bei 37°C und 5%$CO_2$ inkubiert. Danach wurden die Platten gründlich mit PBS/ Tween gewaschen, um die Zellen möglichst vollständig zu entfernen. Von den Zellen sezernierter und an der Platte gebundene Antikörper wurden mittels Meerrettichperoxidase gekoppeltem anti-Maus-IgG1 Antikörper (Southern Biotech, USA) markiert. Durch die enzymatische Farbreaktion nach Zugabe von 3-aminoethyl carbazole wurden die „Spots“ sichtbar gemacht und konnten mithilfe eines Mikroskops ausgezählt werden.

Die Überlebensrate der dreitägigen Plasmazellkultur wurde ebenfalls mittels ELISPOT bestimmt. Hierbei wurden flachbodige, hochbindende Mikrotiterplatten (Costar, D) mit einem Mix aus anti-Maus-IgA, IgG und IgM Antikörper beschichtet. Auf diese Platten wurden die Plasmazellen aus der Kultur nach Waschen mit PBS/ BSA in Verdünnungsreihen aufgetragen. Die Elispotplatten wurden nun, wie oben beschrieben, im Brutschrank inkubiert und anschließend gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt in diesem Fall mit biotinylierten Antikörpern gegen IgA, IgG und IgM und anschließender Inkubation mit SA-AP. Als Substrat wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) gelöst in AMP-Puffer und geschmolzener Agarose (0,6 %) zugegeben. Nach Aushärten der Agarose und deutlicher enzymatischer Farbreaktion konnten auch hier die „Spots“ mithilfe eines Mikroskops ausgezählt werden.

Die ELISPOT Analysen von Ova spezifischen und totalen IgG Plasmazellen aus der Kokultur wurde auf HTS Multiscreen Membranplatten nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Platten wurden dementsprechend mit Ova bzw. ungekoppelten anti-IgG Antikörper beschichtet. Die Auszählung der Spots erfolgte am ELISPOT Reader unter visueller Prüfung.

### 2.5.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Prinzip des ELISAs entspricht dem des ELISPOTs, jedoch findet die enzymatische Farbreaktion nicht im festen sondern im flüssigen Milieu statt. Flachbodige, hochbindende Mikrotiterplatten (Costar, D) wurden mit Ovalbumin, bzw. Fangantikörper für IgG beschichtet (c=5µg/ml). Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden überschüssiges Ovalbumin bzw. anti-IgG Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt und noch offene, unspezifische Bindungsstellen durch eine halbstündige Inkubation mit 3% BSA/PBS abgesättigt. Anschließend wurden 50µl Zellkulturüberstand aus der Plasmazell Kokultur zu 150µl 3% BSA/PBS gegeben und in Dreierschritten verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten dreifach mit PBS gewaschen und mit SA gekoppeltem anti-IgG Antikörper (c=2µg/ml) inkubiert. Nachdem die ungebundenen Antikörper durch einen Waschschritt entfernt wurden, erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit SA-AP (1:3000) bei RT. Überschüssiges SA-AP wurde gründlich entfernt und im Anschluss Entwicklungspuffer 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) zugegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 0,5 bis 3 Stunden erreichte der Farbumschlag in den Gefäßen mit den höchsten Konzentrationen eine Sättigung. Das Absorptions - Konzentrationsdiagramm zeigte dementsprechend einen sigmoidalen Verlauf an, von dem der lineare mittlere Teil für die Analyse verwendet wurde.

## *2.6. Reverse Transkriptase Polykettenreaktion (RT-PCR) und quantitative (q)PCR*

Die RT-PCR wurde von Dr. Harald Schulze, Charité Berlin, durchgeführt. Dazu wurden B-Zellen (B220+/ IgD+) und Plasmazellen (CD138++) von mir durchflusszytometrisch sortiert und Megakaryozyten (CD61+) in seinem Labor aus einer Zellkultur gewonnen und über MACS aufgereinigt. Die mRNA wurde mittels Trizol aus den Zellen extrahiert und anschließend nach Herstellerangaben mit dem iScript kit (Biorad) in cDNA revers transkribiert. Die gewonnene cDNA wurde für die Genexpressionsanalyse folgender Gene mittels Standard PCR (35 Zyklen) verwandt: cd19, c-mpl, gapdh, pax5, pf4, prdm1(Blimp1).

Für die quantitativen Genexpressionsanalysen von B-Zellen (B220+), Makrophagen (CD11b+, F4/80+, Gr1-) und Megakaryozyten (CD41+/ CD61+) wurden 300 bzw. 1000 Zellen von mir mittels FACS Sortierung aufgereinigt und direkt in RT-Puffer sortiert. Anschließend wurden die Zellen auf Trockeneis verschickt und von Dr. Elodie Mohr, Universität Birmingham, auf mRNA für APRIL, IL-6, CD11b und CD41 analysiert. Die Anzahl der spezifischen Transkripte wurde auf β-Aktin bzw. β2 Globulin Transkripte normalisiert. CD11b und CD41 cDNA wurden zur Überprüfung der Reinheit mitttels iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) quantifiziert.

<u>Primer Sequenzen</u>

*prdm1/ blimp1:* Vorwärtsprimer 5'- CCAGGTCTGCCACAAGAGATT-3'
Rückwärtsprimer 5'- TCCGATGACTCATAGAGGCTG -3'

*pax5:* Vorwärtsprimer 5'- CTGCGACATCTCCAGGCA-3'
Rückwärtsprimer 5'-GACACTATGCTGTGACTG-3'

*cd19:* Vorwärtsprimer 5'- GCGGAATTCCCAGTCATGAAGAAGATGCA-3'
Rückwärtsprimer 5'-GCGGGATCCGCAGCACTTGAgTAGGTTCAC-3'

*c-mpl:* Vorwärtsprimer 5'-GCTTCTCCCAAACATTTGAGGA-3
Rückwärtsprimer 5'- AGCAGGTTTCCACACTATCCA -3'

*gapdh:* Vorwärtsprimer 5'-CTCCTCCTGTTCGACAGTCAGC-3
Rückwärtsprimer 5'-GGCGCCCAATACGACCAAATCC-3

*april:* Vorwärtsprimer 5'-CGAGTCTGGGACACTGGAATTT-3';
Rückwärtsprimer 5'-AGATACCACCTGACCCATTGTGA-3';
Sonde 5'-TGCTCTATAGTCAGGTCCTGTTTCATGATGTGAC-3';

*il-6:* Vorwärtsprimer 5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTC-3';
Rückwärtsprimer 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-3';
Sonde 5'-CAGAATTCCCATTGCACAACTCTTTTCTCAT-3';

*β-actin:* Vorwärtsprimer 5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3';
Rückwärtsprimer 5'-TGGTACGACCAGAGGCATACAG-3';
Sonde 5'-TCAACACCCCAGCCATGTACGTAGCC-3';

*β2 microglobulin:* Vorwärtsprimer 5'-CATACGCCTGCAGAGTTAAGCA-3';
Rückwärtsprimer 5'-ATCACATGTCTCGATCCCAGTAGA3';
Sonde 5'-CAGTATGGCCGAGCCCAAGACCG.

*cd11b* Vorwärtsprimer 5'-ATGGACGCTGATGGCAATACC-3',
Rückwärtsprimer 5'- TCCCCATTCACGTCTCCCA-3'

*cd41:* Vorwärtsprimer 5'-TTTCTGCAGCCTAAGGGCC-3';
Rückwärtsprimer 5'-GGCAGCCACAGCAATATCATT-3'.

# 3. Ergebnisse

## *3.1. Untersuchung des Plasmazellkompartiments in Milz und Knochenmark*

Wie in der Einleitung (1.1.2.2.) beschrieben, gehen langlebige Plasmazellen im Knochenmark vermutlich aus wiederholtem Antigenkontakt und Aktivierung von Gedächtniszellen hervor. Eine systemische Immunantwort führt in der Milz zur Bildung von unreifen Plasmazellen, welche wenige Tage später in das Knochenmark migrieren und zu reifen Plasmazellen differenzieren. Daher sollte zu Beginn die Zusammensetzung des Plasmazellkompartiments in der für die systemischen Immunantwort und das immunologische Gedächtnis in den relevanten lymphatischen Organen, Milz und Knochenmark, untersucht werden.

### 3.1.1. Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen

Zuerst wurde die durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen etabliert. Dazu wurden CD138 und die Immunglobulin leichte Kette kappa (im Folgenden kurz - kappa) zur Identifizierung der Plasmazellen, sowie die Ig Sub-Klassen IgM und IgA gefärbt. Außerdem wurden, um das Alter der Plasmazellen zu untersuchen, Balb/c Mäuse für einen Zeitraum von zwei Wochen vor der Analyse mit dem Basenanalogon BrdU gefüttert. Durch den Einbau von BrdU in die DNA sich teilender Zellen ist es möglich, zwischen reifen langlebigen Plasmazellen (BrdU-) und jungen neu gebildeten Plasmazellen (BrdU+) zu unterscheiden. Für die Verfolgung von induzierten antigenspezifischen Plasmazellen (Ova sekundärimmunisiert) wurde die Identifizierung von Plasmazellen, welche anti-Ova Antikörper produzieren, notwendig.

In Abbildung 2 sind die oben genannten Färbungen und durchflusszytometrischen Analysen dargestellt.

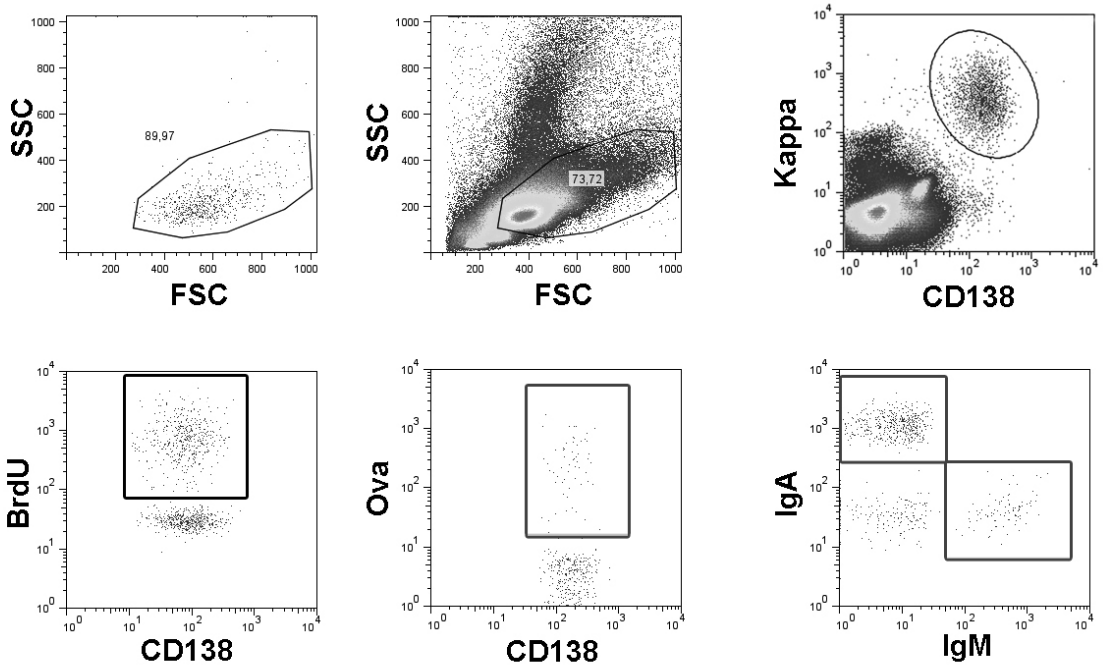



**Abb. 2: Durchflusszytometrische Identifizierung und Charakterisierung von Plasmazellen.** Obere Reihe: um die Lage der kappa positiven Plasmazellen im FSC/SSC wurde eine Analysefenster (Gate) gezogen (links), welches zur Vorselektion angewandt wurde (Mitte). Die Plasmazellen wurden mittels Färbung von Ig leichte Kette kappa und CD138 identifiziert (rechts). Untere Reihe: Die Plasmazellen aus dem Analysefenster (oben rechts) wurden weiter für BrdU Einbau, Ova Spezifität und die Immunglobulinklassen IgA und IgM untersucht.

## 3.1.2. Die Entwicklung des Plasmazellkompartiments im Knochenmark

Das immunologische Gedächtnis spiegelt die Infektionsgeschichte des Individuums wider. Zugleich entwickeln sich und altern die Organe, welche die Gedächtniszellen beherbergen. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob und wie sich die Zusammensetzung des Plasmazellkompartiments im Knochenmark mit dem Alter ändert. Dazu wurden Tiere verschiedenen Alters für zwei Wochen mit BrdU gefüttert und die Plasmazellen mit dem Durchflusszytometer analysiert. Kurzlebige Plasmazellen haben eine Halbwertszeit von etwa drei Tagen (Ho et al. 1986; Hauser et al. 2002). Plasmazellen, die in den zwei Wochen kein BrdU aufgenommen haben, sich also nicht mehr geteilt haben, werden daher im Folgenden als langlebig bezeichnet.

Bei der Analyse stellte sich heraus, dass die Plasmazellzahl sich zwischen einem Alter von drei bis fünf Monaten verdoppelte (Abb.3 oben links). Ebenso nahm das langlebige (BrdU-) Kompartiment beständig zu, während die neu gebildeten (BrdU+) Zellen in ihrer Zahl schwankten (Abb.3 oben Mitte und rechts). Interessant ist dabei, dass sich der Anteil

langlebiger Plasmazellen bereits ab dem vierten Monat auf 60 Prozent einpegelte im Vergleich zu 30 Prozent im dritten Monat (Abb.4 unten rechts). Auch bei der Zusammensetzung des Plasmazellkompartiments in Bezug auf die Immunglobulinklasse zeigen sich Unterschiede. So sind IgA+ Plasmazellen die ersten Plasmazellen, die das Knochenmark besiedeln. Ihre Zahl bleibt über den untersuchten Zeitraum relativ stabil (Abb.3 unten links). Somit stellen IgA+ Plasmazellen eine dominante Ig-Klasse bei unter SPF Bedingungen gehaltenen Mäusen dar. Die Anzahl der IgM+ aber vor allem der IgM-/ IgA- Plasmazellen hat vom dritten bis zum sechsten Monat deutlich zugenommen (Abb.3 unten Mitte und rechts). Wodurch die letztere, die vermutlich zu großen Teilen aus IgG+ Plasmazellen besteht, die zweite große Plasmazellpopulation im Knochenmark darstellt.

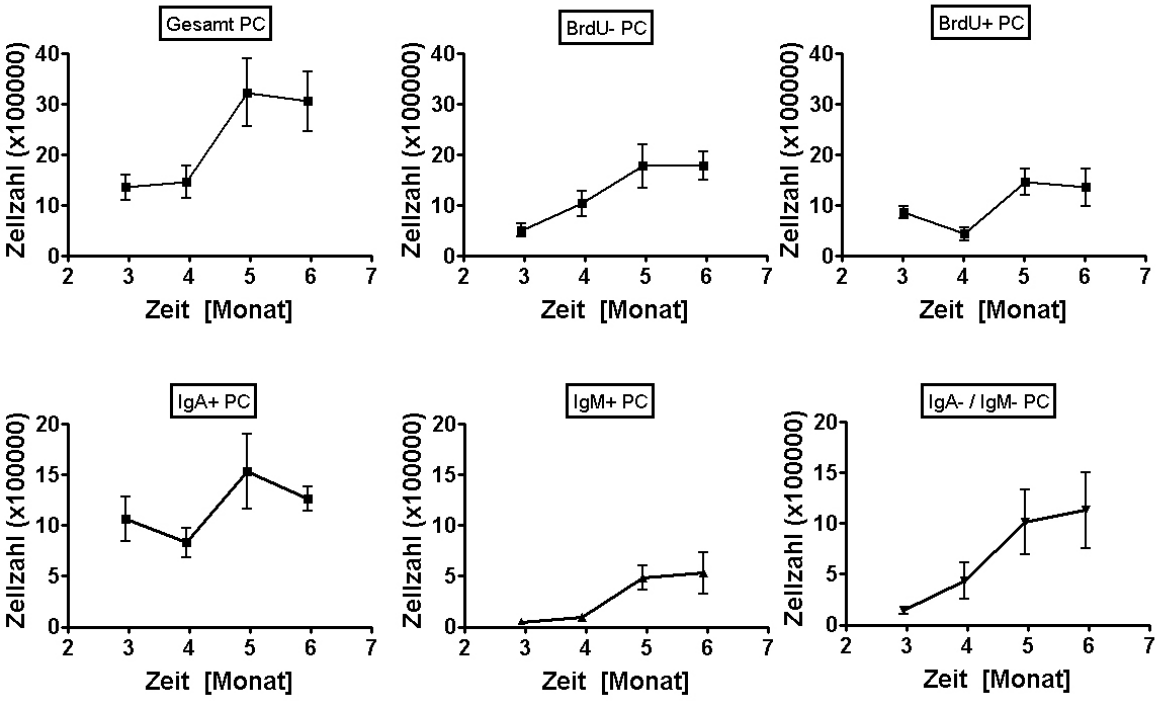



**Abb.3: Die Entwicklung des Plasmazellkompartiments im Knochenmark.** Nach zwei Wochen BrdU Fütterung wurde die Plasmazellreife (BrdU- reif/langlebig; BrdU+ unreif) und die Immunglobulinklasse (IgM, IgA) in 3-6 Monate alten Mäusen durchflusszytometrisch untersucht.

Wenn man die prozentuale Zusammensetzung des Plasmazellkompartiments betrachtet, kann man mit dem Alter deutlich einen fallenden Trend für IgA+ und einen steigenden Trend für IgA- / IgM- Plasmazellen erkennen.

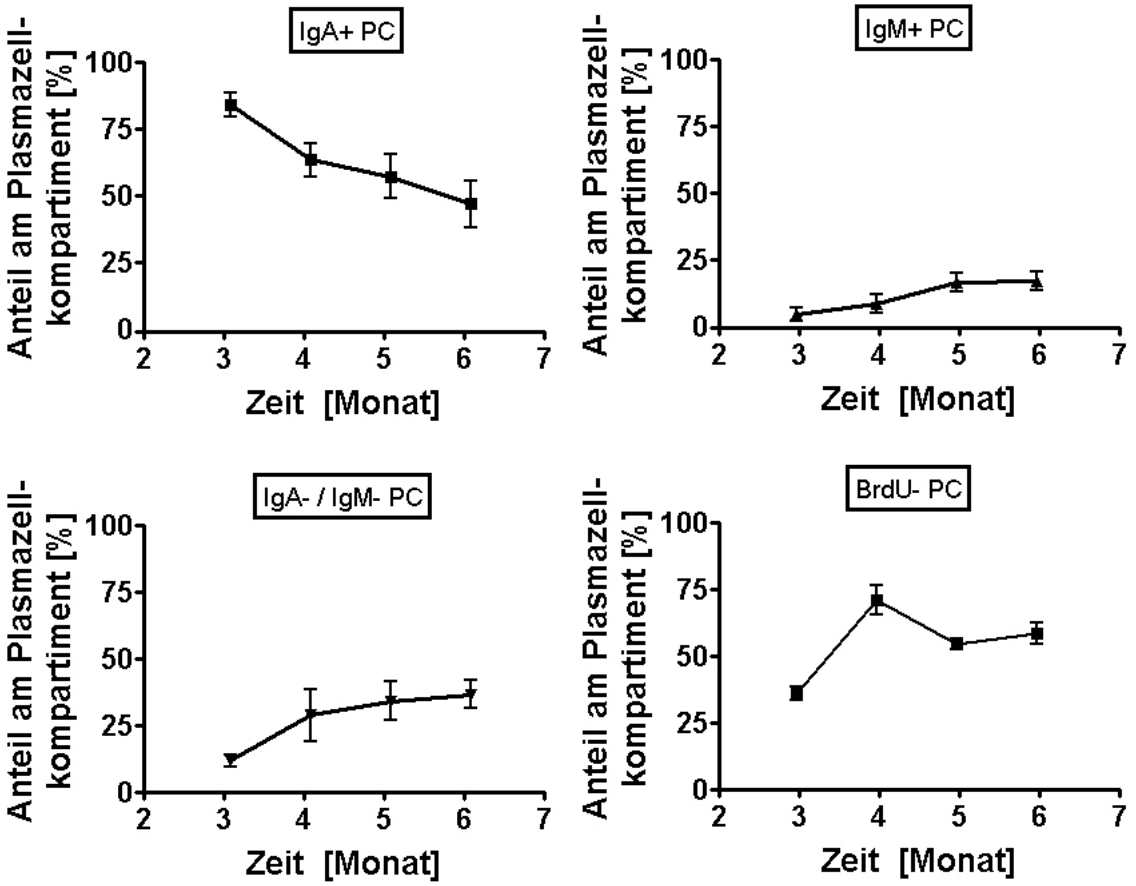



**Abb.4: Die anteilige Zusammensetzung des Plasmazellkompartiments im Knochenmark.** Darstellung des prozentualen Anteils langlebiger Plasmazellen (BrdU-) und Plasmazellen verschiedener Immunglobulinklassen (IgM, IgA) am Plasmazellkompartiments.

Das Plasmazellkompartiment braucht demnach vier bis fünf Monate, um sich bei unter SPF Bedingungen gehaltenen Mäusen zu entwickeln und sowohl für die Gesamtplasmazellen als auch für die langlebigen Plasmazellen ein Plateau zu erreichen. Daher wurden für die folgenden Versuche keine jüngeren Tiere als vier Monate verwendet.

### 3.1.3. Histologische Analyse von Plasmazellen

Um das Plasmazellkompartiment histologisch analysieren zu können, mussten Plasmazellen eindeutig im Gewebe identifizierbar sein. Daher wurden aus tiefgefrorenen Geweben angefertigte Kryoschnitte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Plasmazellen produzieren große Mengen an Antikörper, wodurch sie im Durchflusszytometer als kappa ++ Zellen erscheinen (siehe Abb. 2). Jedoch tragen auch B-Zellen Immunglobuline auf ihrer Oberfläche, wodurch auch sie kappa positiv sein können. Um zu überprüfen, ob

eine kappa Färbung ausreicht, um Plasmazellen histologisch zu identifizieren, wurden Femurschnitte von Mäusen analysiert, welche GFP unter dem Plasmazell-Reifemarker Blimp1 exprimieren. Wie man in Abbildung 5 erkennen kann, sind die kappa+ Zellen doppelt positiv für GFP/Blimp1. Daher scheint die kappa Färbung hinreichend für die Identifizierung von Plasmazellen im Gewebe zu sein und kann somit für die histologischen Analysen verwendet werden.

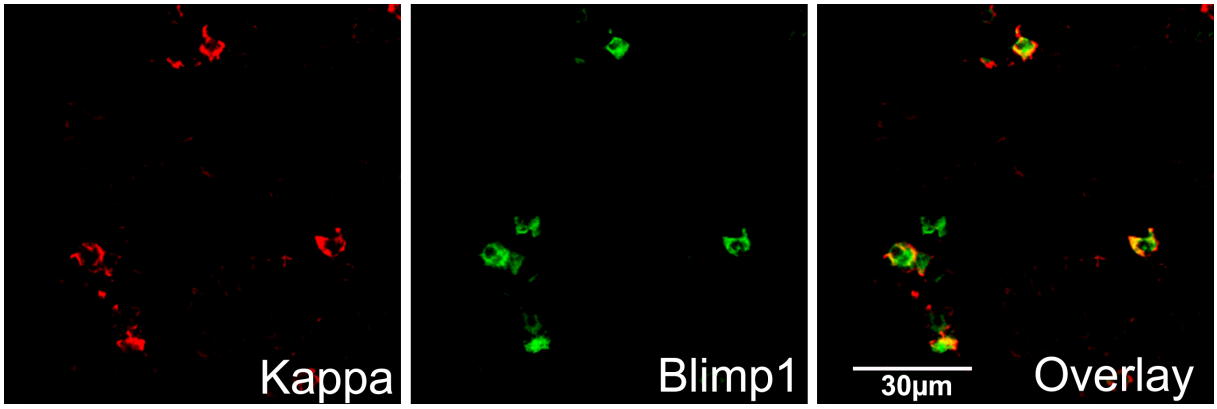



**Abb.5: Histologische Identifizierung von Plasmazellen.** Femurschnitte von Mäusen, welche den Farbstoff GFP gekoppelt an Blimp produzieren, wurden für kappa gegengefärbt. Reife Plasmazellen exprimieren Blimp1 und sind daher immer Blimp1 positiv, weshalb kappa positive Plasmazellen immer doppelt positiv sein müssen.

Makroskopisch lässt sich die Lokalisierung der Plasmazellen nur schwer beschreiben, da sie im vaskulären bzw. peri-vaskulären Bereich über das ganze Knochenmark verteilt zu sein scheinen (Abb.6 oben). Eine Orientierung der Plasmazellen Richtung hypoxischer Endostnische konnte nicht beobachtet werden. Es macht jedoch den Eindruck, dass es Areale von höherer oder niedriger Plasmazelldichte gibt (Abb. 6 oben und unten). In Kombination mit einer T-Zell Färbung (CD3+) zeigt sich, dass diese T-Zell und Plasmazell Areale sich im Groben nicht überlappen, wobei es jedoch keine scharfe Gebietstrennung wie in rote und weiße Pulpa bei der Milz gibt. Im Knochenmark kommt es auch zu Kontakt zwischen T- und Plasmazellen (Abb. 6 Pfeile).

Diese Untersuchungen deuten auf Mikrostrukturen im Knochenmark hin, die für die Lokalisation und das Überleben verantwortlich sein könnten. Diese Mikrostrukturen, so genannte Nischen (siehe 1.2.), sollen daher im Folgenden untersucht werden.

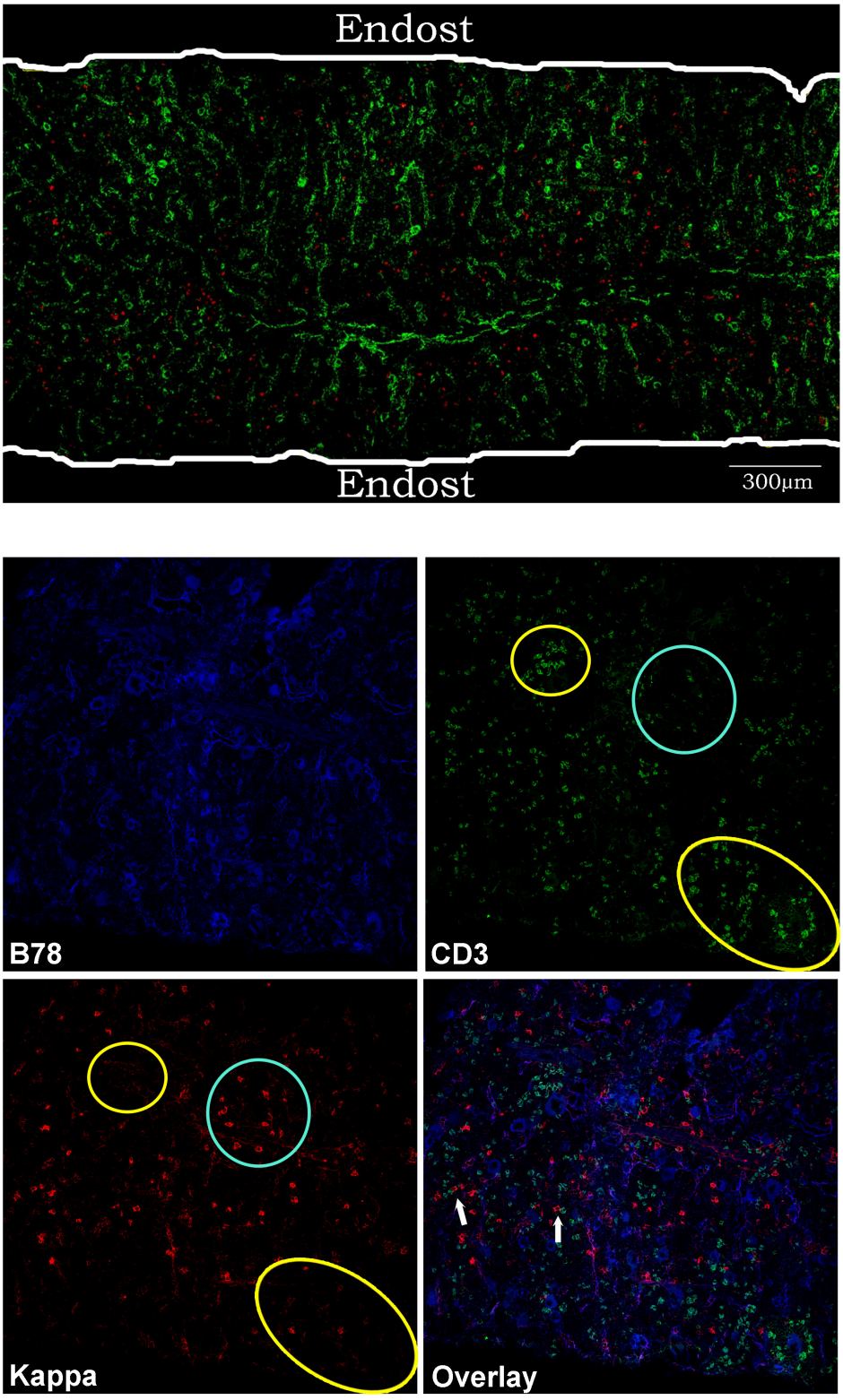



**Abb.6: Verteilung der Plasmazellen im Knochenmark.** oben: Schnitt durch einen Femur im Bereich des Zentralsinuses. Die Plasmazellen (kappa, rot) sind über das Knochenmark verteilt, jedoch selten mehr als 30µm von einem Gefäß (Endothel, B78, grün) entfernt. Unten: Es gibt allerdings Areale mit Mikrostrukturen (Nischen), in denen Plasmazellen lokalisiert sind (gelbe Elipsen). Diese Nischen unterscheiden sich von denen für T-Zellen, die woanders lokalisiert sind (blaue Elipse). Es kommt jedoch auch zu Berührungen zwischen T- und Plasmazellen (weiße Pfeile).

## *3.2. Zelluläre Charakterisierung der Plasmazellnische im Knochenmark*

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass Plasmazellen für ihr Überleben externe Stimuli, z.B. April, IL-6 und SDF-1, brauchen (siehe 1.2.). Zwar gibt es verschiedene Zellen, die diese Faktoren produzieren [79, 80], jedoch ist bisher nicht bekannt, welche Zellen die Stimuli für die Plasmazelle im Knochenmark bereitstellen und damit die Nische für die Plasmazellen bilden. Außerdem ist unbekannt, ob es Fluktuationen in diesem Stromazellkompartiment, welches die Nische bildet, gibt. Wobei in diesem Kontext Stroma linienunabhängig ist und sich einzig über den Beitrag an Entwicklung und Überleben der Plasmazelle definiert. Daher soll in diesem Abschnitt der Zellkontakt der Plasmazelle von der Immigration in das Knochenmark bis zu vier Monate nach ihrer Bildung untersucht und beschrieben werden.

### 3.2.1. Lokalisation von Knochenmarkplasmazellen im Verlauf einer sekundären Immunantwort

Balb/c Mäuse wurden mit dem Antigen Ovalbumin primär und drei Wochen später sekundär immunisiert (Boost Immunisierung). Die im Verlauf dieser Immunreaktion gebildeten Ovalbumin spezifischen Plasmazellen wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie verfolgt (Abb. 7).

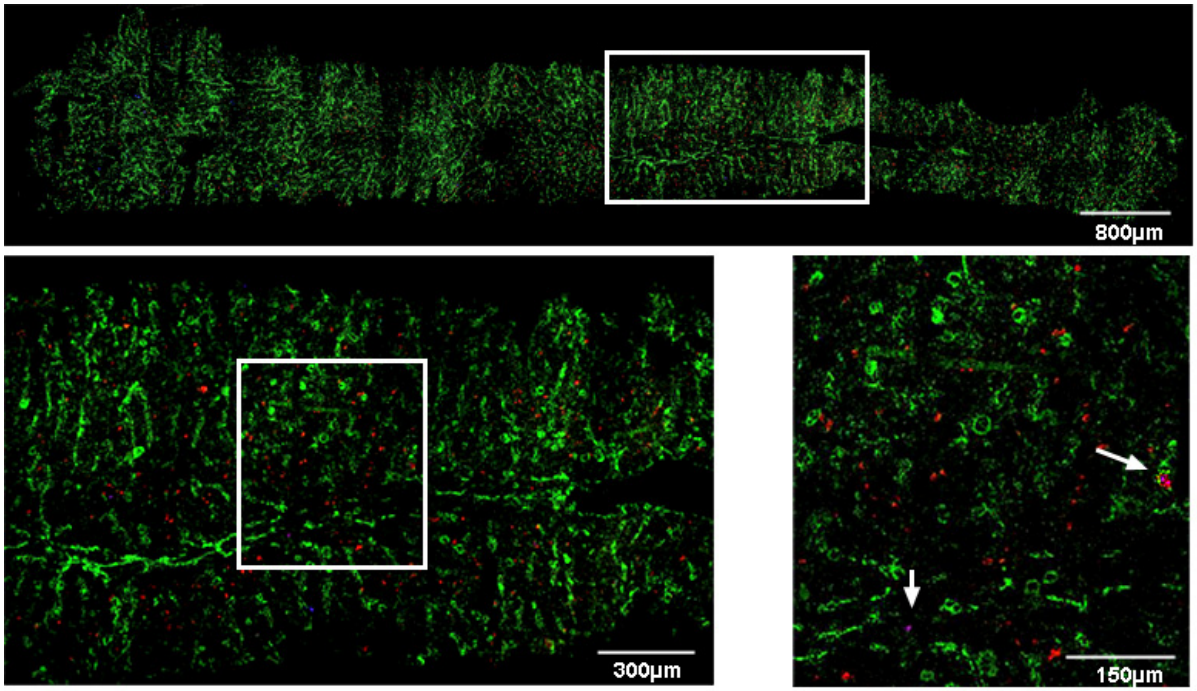



**Abb.7: Lokalisation Ova spezifischer Plasmazellen im Knochenmark.** Femurschnitte wurden für kappa (rot), Ova (blau) und einem zu untersuchenden dritten Zellmarker (hier B78, grün) gefärbt. Ova positive Plasmazellen wurden lokalisiert und der Kontakt zu den zu analysierenden Zellen wurde ausgezählt. Die weißen Vierecke zeigen die Vergrößerungsausschnitte und die Pfeile zeigen auf Ova Plasmazellen.

Als erster Analysezeitpunkt wurde Tag 6 nach der Ova Sekundärimmunisierung gewählt, da die unreifen Ova Plasmazellen zu diesem Zeitpunkt im Knochenmark akkumulieren und dementsprechend das Maximum an Ova Plasmazellen gefunden wird. Wohingegen am letzten Analysezeitpunkt, vier Monate nach der Sekundärimmunisierung, nur noch Gedächtnisplasmazellen vorhanden sind, die als langlebig angesehen werden können (siehe 1.1.2.5.).

Mittels spezifischer Färbungen verschiedener Knochenmarkzellen und Ova Plasmazellen wurde das zelluläre Umfeld der Plasmazellen erfasst und durch Auszählen der Zellkontakte statistisch analysiert. Hierbei fiel auf, dass die Plasmazellen zu allen Zeitpunkten Kontakt zu großen B78 schwach positiven Zellen hatten, die als Megakaryozyten identifiziert werden konnten (siehe Abb. 9). Die Kolokalisationsfrequenz zwischen Ova Plasmazellen und verschiedenen Knochenmarkzellen ergaben, dass der häufigste Kontakt mit Granulozyten (60-70%) und der geringste mit B-Lymphozyten (10-20%) stattfindet. Die Kolokalisation zu Megakaryozyten und Endothelzellen liegt bei ca. 30% (Abb. 8 links), wobei die einwandernden unreifen Plasmazellen eine höhere Kontaktfrequenz zu Endothelzellen

haben als die langlebigen Gedächtnisplasmazellen (Abb. 8 links). Allerdings lässt sich sagen, dass sich auch die reifen Plasmazellen selten weiter als 30µm von einem Gefäß entfernt befinden.

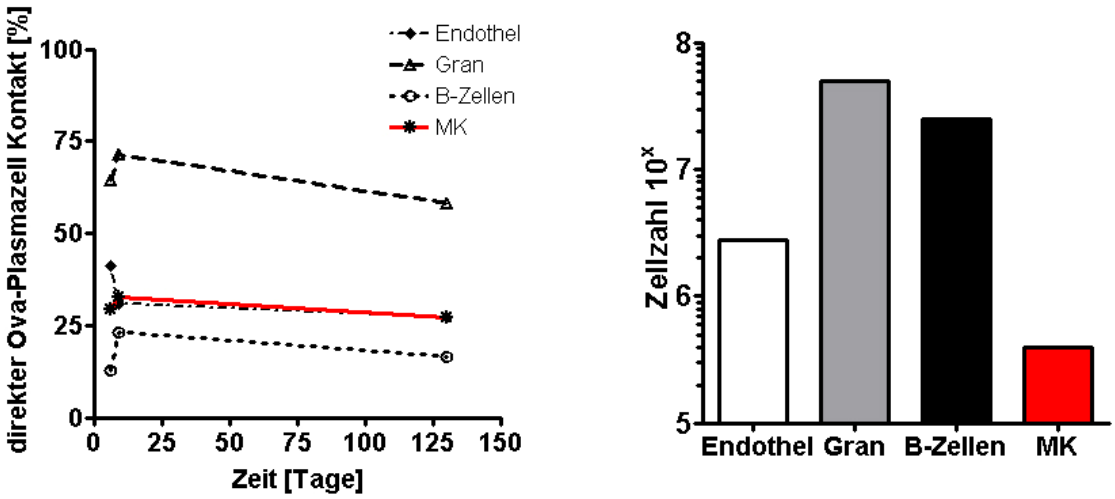



**Abb.8: Die Kolokalisation von Ova Plasmazellen mit anderen Zellen und deren Vorkommen im Knochenmark.** Links: Der Verlauf der Kontaktfrequenz von Ova Plasmazellen mit Endothelzellen (Endo), Granulozyten (Gran), B-Zellen (B) und Megakaryozyten (MK) 6- 130 Tage nach der Sekundärimmunisierung. Rechts: Die Größe der jeweiligen Zellpopulationen im Knochenmark.

Berücksichtigt man die Zellgröße und die Zellzahl der einzelnen Populationen im Knochenmark (Abb.8 rechts), lässt sich die Gesamtoberfläche der einzelnen Populationen berechnen und die Kontakthäufigkeit auf eine Fläche normieren (Tab. 1).

| Zellpopulation | Zellzahl im Knochenmark | Durchmesser [µm] | Zelloberfläche der gesamten Population [mm²] | Kontakt-frequenz [%] | Oberflächen-normierte Kontaktfrequenz [%/mm²] |
|---|---|---|---|---|---|
| Endothelzellen | 30*10^5 | unbekannt | unbekannt | 30% | unbekannt |
| Granulozyten | 300*10^5 | 11 µm | 11404 mm² | 60% | 0.53 |
| B-Zellen | 200*10^5 | 8 µm | 4021 mm² | 17% | 0.42 |
| Megakaryozyten | 3*10^5 | 30 µm | 848 mm² | 30% | 3.50 |

**Tabelle 1: Die Kolokalisation in Bezug auf die Gesamtoberfläche der verschiedenen Zellpopulationen im Knochenmark.** Für die untersuchten Zellpopulationen wurde aus der Zellgröße und der Zellzahl im Knochenmark die Gesamtoberfläche dieser Population berechnet. Die statistisch ermittelte Kolokalisationsfrequenz mit Ova Plasmazellen wurde auf eine Fläche von einem mm² normiert. Für die Endothelzellen ließ sich dies aufgrund der retikulären Zellstruktur nicht ermitteln.

### 3.2.2. Histologische und durchflusszytometrische Charakterisierung von Megakaryozyten

Aufgrund der unerwartet hohen Kolokalisation zwischen Plasmazellen und Megakaryozyten und zusätzlichen Hinweisen aus der Literatur, wonach Megakaryozyten die Plasmazellüberlebensfaktoren IL-6 und APRIL produzieren können, sollte ihr Potential für die Plasmazellnische untersucht werden.

Dafür wurde zunächst die histologische (Abb. 9) und durchflusszytometrische (Abb. 10) Analyse der Megakaryozyten etabliert. Infolgedessen konnten Megakaryozyten durch Adaption beschriebener Protokolle aufgrund ihrer Morphologie, den linienspezifischen Markern CD41, CD61 und ihrer Polyploidie eindeutig identifiziert werden.

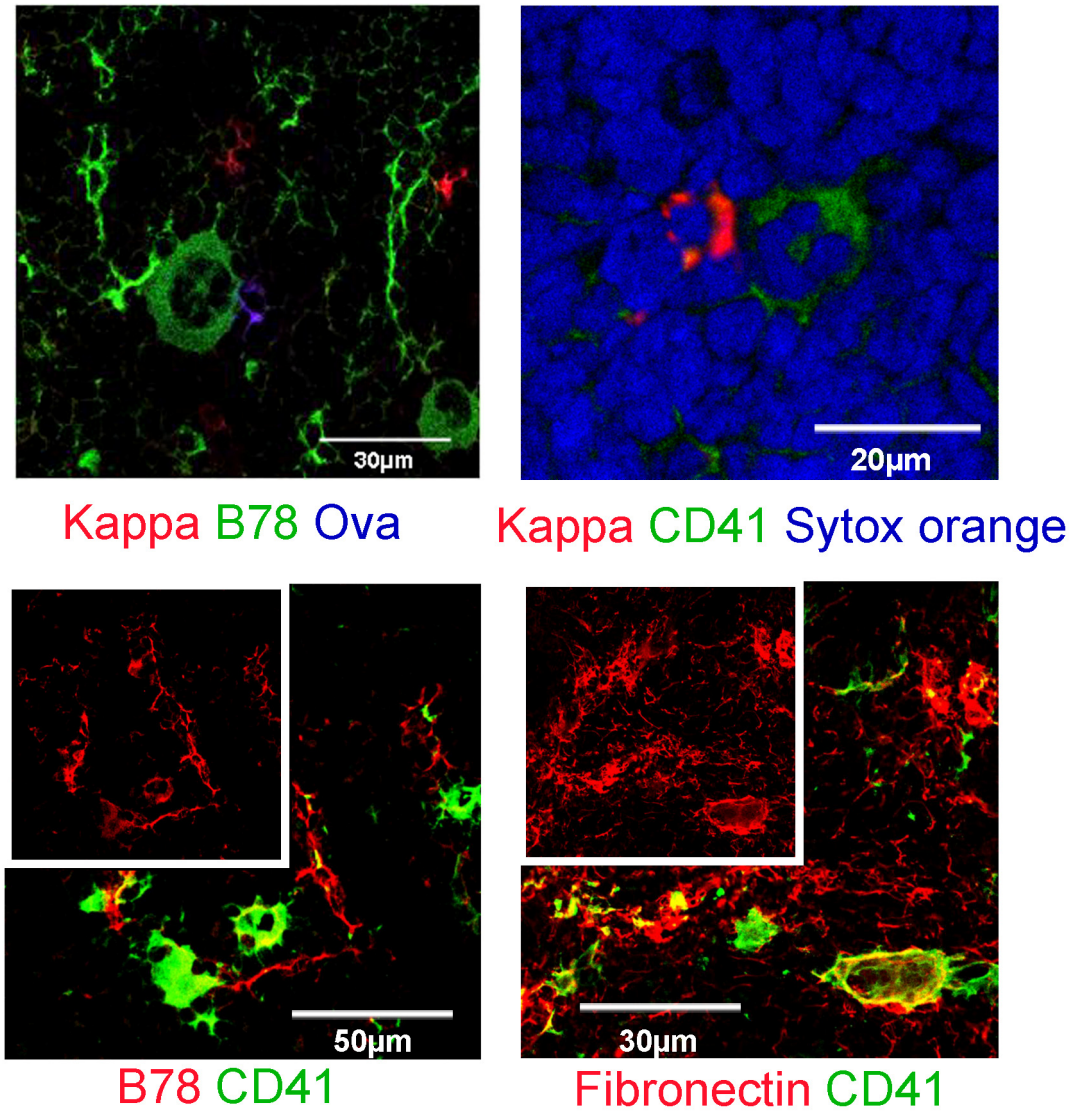



**Abb.9: Histologische Analyse von Megakaryozyten.** Oben links: Während der Kolokalisationsanalysen fiel auf, das Ova Plasmazellen (Ova, blau; kappa, rot -> violett) Kontakt mit großen runden schwach B78 positiven Zellen hatten (B78, grün).Mitte: die B78 schwach positiven Zellen wurden über CD41 als MK identifiziert. Oben rechts: Histologisch wurden Megakaryozyten als CD41 positiv, groß und polyploid (kappa, rot; CD41, grün; Kernfarbstoff, Sytox Orange, blau) identifiziert. Unten rechts: MK sind Fibronektin reich.

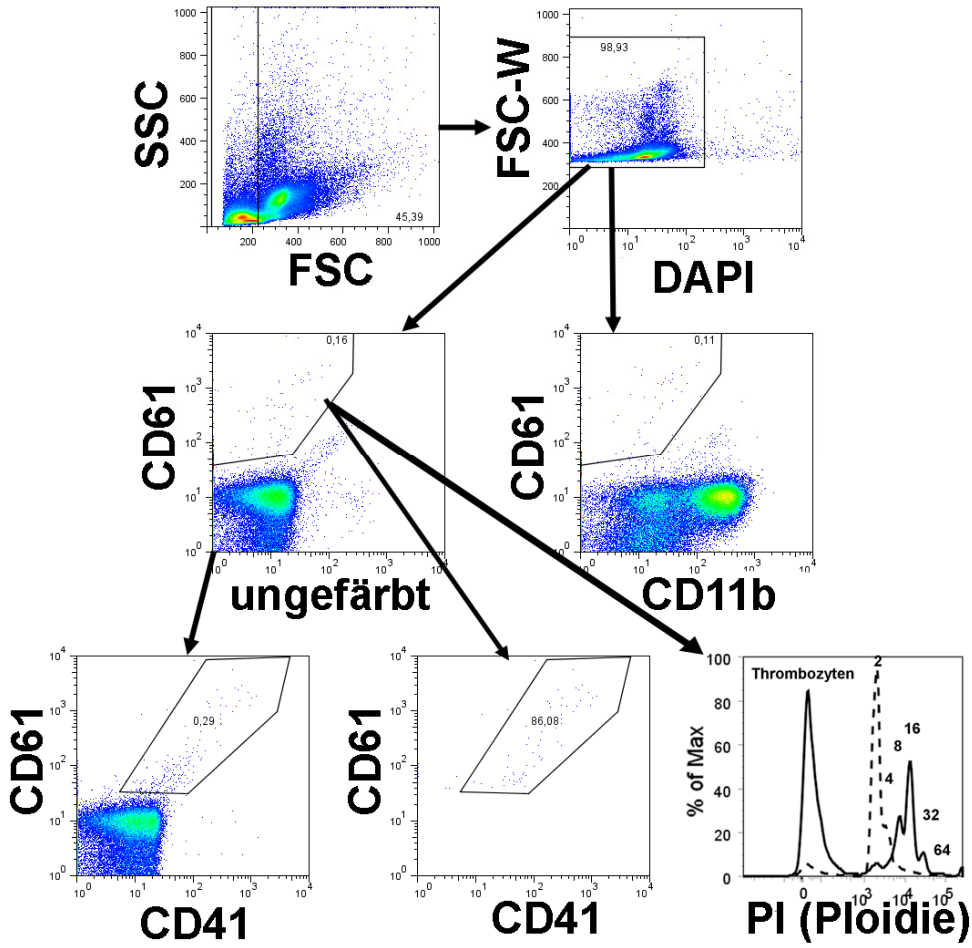



**Abb.10: Durchflusszytometrische Analyse von Megakaryozyten.** Eine Knochenmark Zellsuspension wurde gegen CD41, CD61 und CD11b gefärbt Die Megakaryozyten sind CD11b negativ und CD41/ CD61 doppelt positiv. Mit dem Kernfarbstoff Propidium Jodid (PI) konnte der Ploidiegrad näher bestimmt werden. Die gestrichelte Linie zeigt den Ploidiegrad der Gesamtknochenmarkzellen. Thrombozyten sind als kernlos erkennbar.

### 3.2.3. Verteilung von Plasmazellen und Megakaryozyten in Milz und Knochenmark

Megakaryozyten, Produzenten der Thrombozyten, stellen ähnlich den Plasmazellen eine kleine Population im Knochenmark dar (< 0,5%) und erreichen in der Milz sogar nur ein Zehntel der Knochenmarkzellzahl (Abb. 11 links).

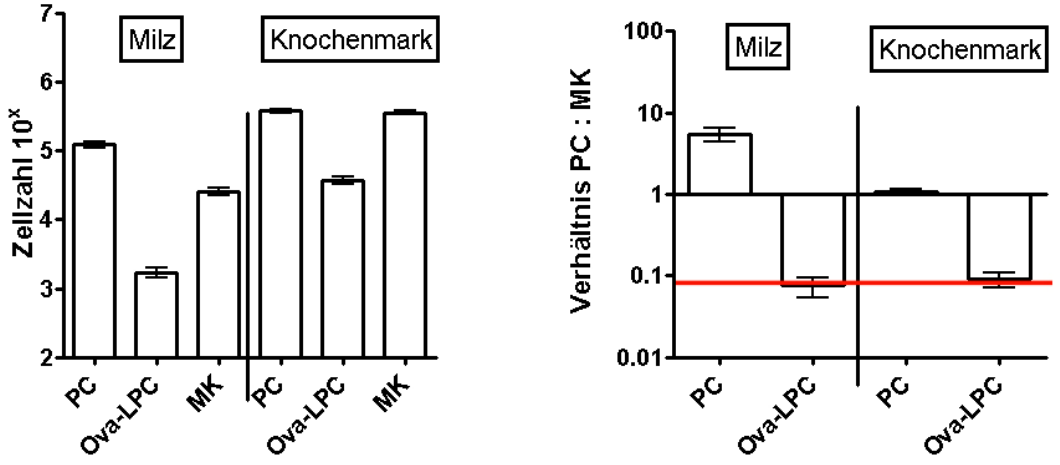



**Abb.11: Verteilung von Plasmazellen und Megakaryozyten in Milz und Knochenmark.** Links: Die Anzahl von Gesamtplasmazellen (PC), langlebigen Ova spezifischen Gedächtnisplasmazellen (OVA-LPC) und Megakaryozyten (Mk) in Milz und Knochenmark. Rechts: Die Anzahl von Gesamtplasmazellen und langlebigen Ova spezifischen Gedächtnisplasmazellen in Milz und Knochenmark bezogen auf die Megakaryozytenzahl in dem jeweiligen Organ.

Wenn man die Gesamtplasmazellzahl und die Anzahl an Gedächtnisplasmazellen auf die Megakaryozytenzahl relativiert, erhält man für Milz und Knochenmark die in Abbildung 11 rechts dargestellten Verhältnisse. Obwohl das Verhältnis Gesamtplasmazellen zu Megakaryozyten in der Milz viel höher ist, ist interessanterweise das Verhältnis der Gedächtnisplasmazellen und Megakaryozyten in beiden Organen gleich (Abb. 11 rechts).

Im Knochenmark und Milz fanden sich auch Plasmazellen (kappa+), die nicht Ova spezifisch waren, mit Megakaryozyten kolokalisiert (Abb. 12), wobei im Knochenmark Plasmazellen und Megakaryozyten verteilt sind und in der Regel ein bis zwei Plasmazellen am Megakaryozyt sitzen. In der Milz bietet sich dagegen ein anderes Bild. Dort findet man die Plasmazellen häufig als Cluster vor, die entweder unabhängig oder direkt um den Megakaryozyten lokalisiert sind (Abb. 12). Was die Milz weiterhin vom Knochenmark unterscheidet, ist das Vorhandensein von Thrombozyten im Gewebe, genauer in der Roten Pulpa, welche im Knochenmark fast vollständig fehlen (Vergleich Abb. 12 links und Mitte).

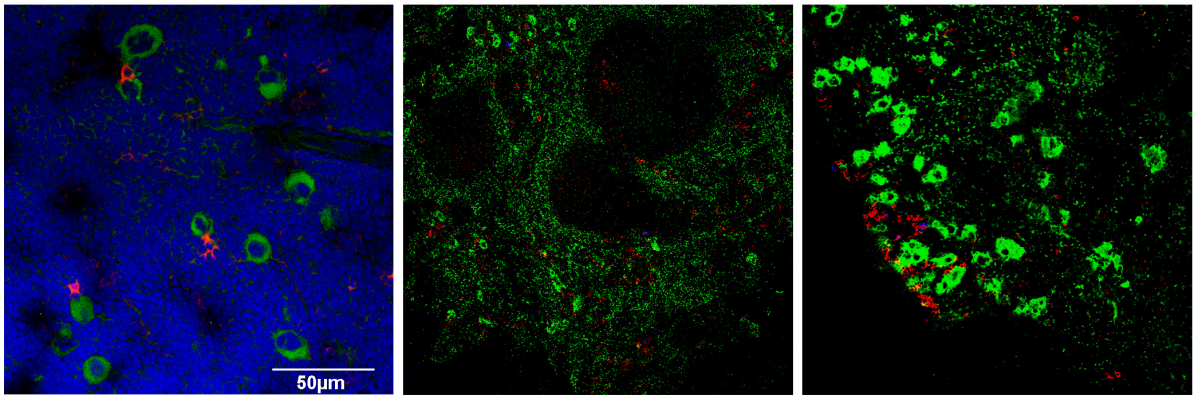



**Abb.12: Verteilung der Plasmazellen und Megakaryozyten in Knochenmark und Milz.** Links: Im Knochenmark sitzen Plasmazellen (kappa, rot) und Megakaryozyten (CD41, grün) gleichmäßig verteilt. Die Kernfärbung (Sytox Orange, blau) verdeutlich das geringe Vorkommen beider Zellen (< 0,5 % aller Zellen) im Organ. Mitte und Rechts: In der Milz kommen Plasmazellen (kappa, rot) und Megakaryozyten (CD41, grün) häufig als Cluster vor. Ebenso sieht man in der Milz viele Thrombozyten (klein, grün), im Knochenmark jedoch kaum.

Im Knochenmark sind ca. 30% der Ova bzw. Gesamtplasmazellen mit Megakaryozyten kolokalisiert. Der Wert schwankt jedoch zwischen 10-60% (Abb. 13). Bei der Analyse der Kontaktfrequenz für die Plasmazellen unterschiedlicher Immunglobulinklassen zeigt sich, dass IgG1 und IgA Plasmazellen besonders häufig und IgM eher selten mit Megakaryozyten assoziiert sind (Abb.13 rechts).

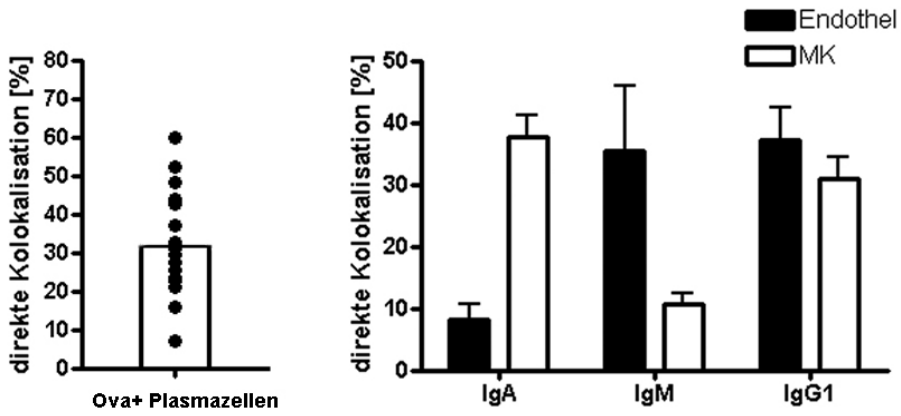



**Abb.13: Kolokalisation Ova spezifischer Plasmazellen und kappa+ Plasmazellen verschiedener Ig-Klassen im Knochenmark.** Statistische Auswertung von Femurschnitten. Links: Die Kolokalisation von Ova Plasmazellen mit Megakaryozyten liegt im Mittel bei 30 Prozent. Rechts: IgA und IgG1 Plasmazellen kolokalisieren häufiger mit Megakaryozyten als IgM Plasmazellen.

Plasmazellen die durch wiederholten Antigenkontakt entstanden sind (Ova Sekundärimmunisierung), finden sich ab ca. zwei Wochen nach der letzten Immunisierung mehrheitlich im Knochenmark. Ebenso zeigen IgA und IgG1 Plasmazellen, welche den Hauptteil des Plasmazellkompartiments im Knochenmark ausmachen, eine stärkere Assoziation mit Megakaryozyten als IgM. Daher bleibt der Fokus weiterhin auf dem Knochenmark und wird insbesondere auf die Megakaryozyten als potentielle Plasmazellnische gelegt.

### 3.2.3. Untersuchung der Kontaktfläche von Plasmazelle und Megakaryozyt auf Zell-Zell Interaktion

Um die Kontaktfläche zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt zu untersuchen, wurden Knochenmarkschnitte mit Phallodin inkubiert, welches filamentöses Aktin (F-Aktin) anfärbt. F-Aktin ist eine Grundkomponente bei Adhäsionsverbindungen und dient ebenso der örtlichen Fixierung von Rezeptoren an der Membranoberfläche [81]. Durch die Färbung von F-Aktin ist es somit möglich, ein möglichst breit gefächertes Interaktionspektrum abzudecken. In Abbildung 14 kann man gut erkennen, dass die Kontaktfläche zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt besonders F-Aktin haltig ist, was auf eine aktive Interaktion hindeutet. In Abbildung 14c sieht man eine häufig beobachtete, intensive Verschmelzung zwischen Plasmazell- und Megakaryozytmembran.

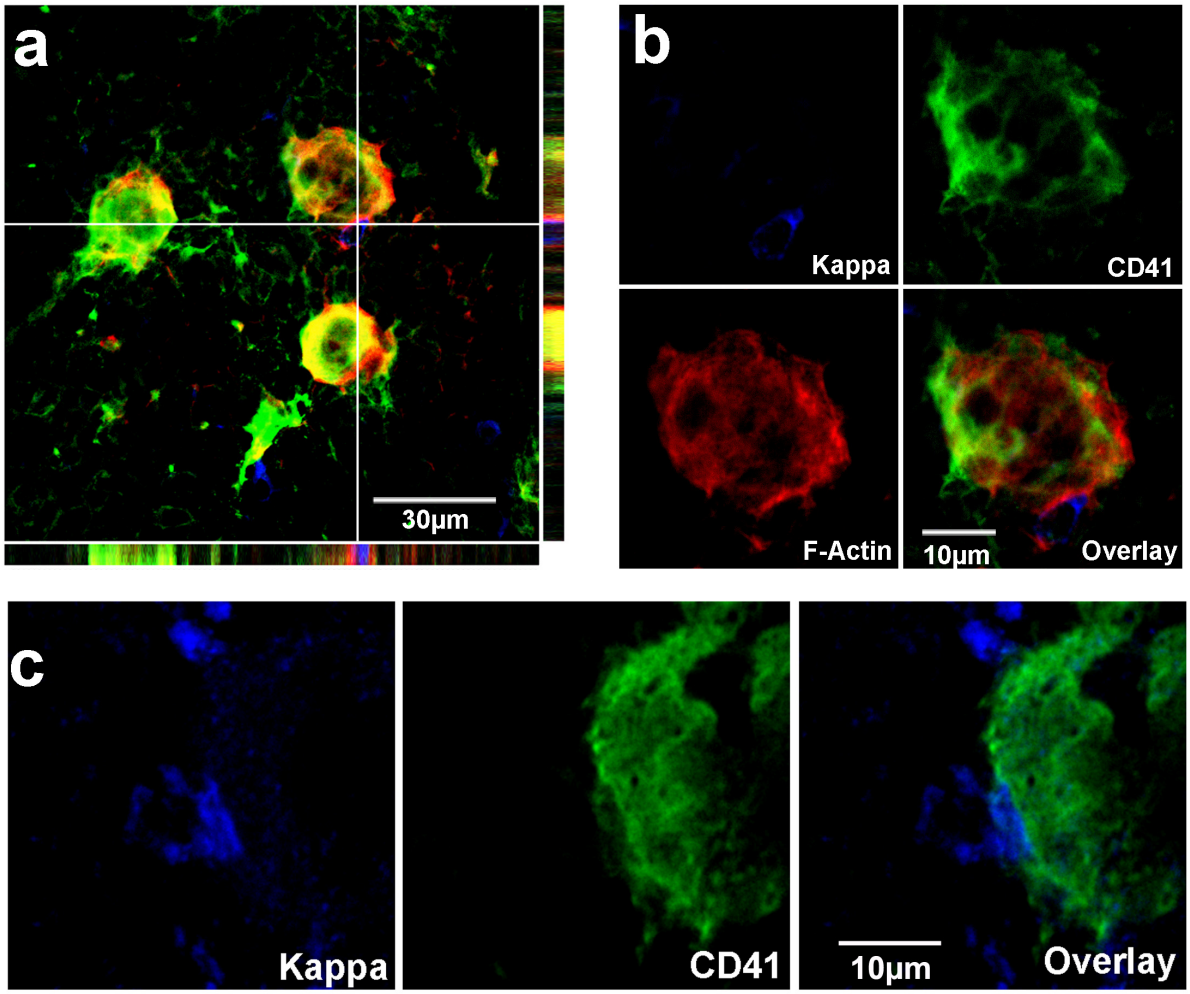



**Abb.14: Aktiver Kontakt von Plasmazelle und Megakaryozyt.** a: Ein 30µm Femurschnitt wurde mit Phallodin gefärbt, um aktives Zytoskelet (filamentöses Aktin) sichtbar zu machen, und in der Z-Ebene für die dreidimensionale Analyse aufgenommen. Die Balken rechts und unten zeigen die Färbung an der Schnittkante (weiß) in der z-Ebene. b: Die assoziierten Plasmazelle und Megakaryozyt aus a sind in den einzelnen Farbkanälen dargestellt. c: Exemplarisches Beispiel für das häufig beobachtete Verschmelzen von Plasmazelle und Megakaryozyt.

### 3.2.4. Plasmazellen und Megakaryozyten sitzen gemeinsam in der SDF-1 (CXCL12) positiven perivaskulären Nische

Plasmazellen und Megakaryozyten migrieren beide gegen SDF-1 [48, 57]. Einer der Produzenten im Knochenmark wurde von Tokyoda et al. als Fibronektin+ retikuläre Zelle beschrieben [55]. Diese Zellen umspannen zum Teil die kapillaren Gefäße und ermöglichen so Zellen, die gegen SDF-1 Gradienten migrieren, wie Plasmazelle und Megakaryozyt, die Lokalisation in der vaskulären/ perivaskulären Nische (Abb. 15). Interessanterweise deuten die histologischen Untersuchungen darauf hin, dass Megakaryozyten ebenfalls SDF-1 produzieren (Abb. 15).

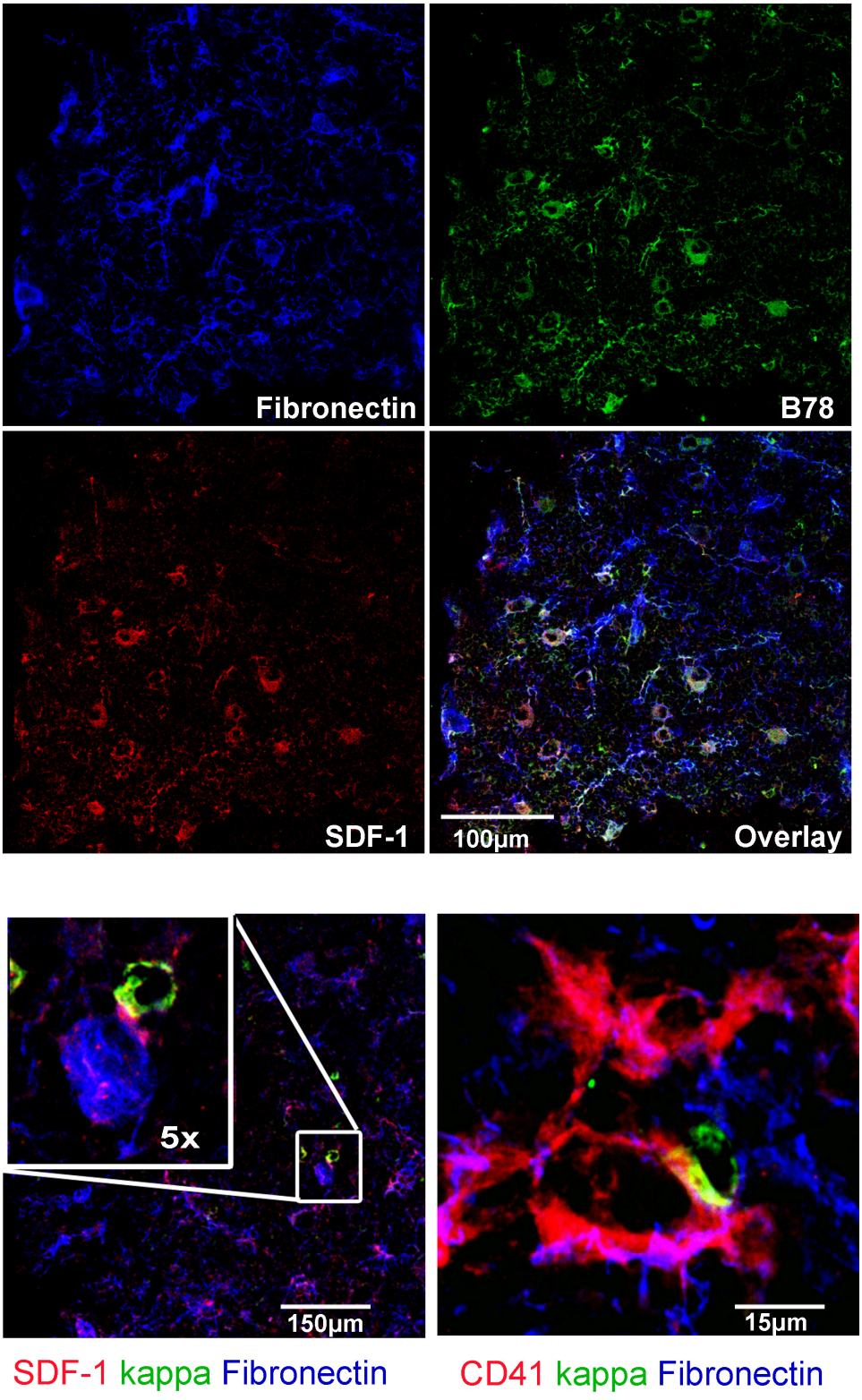
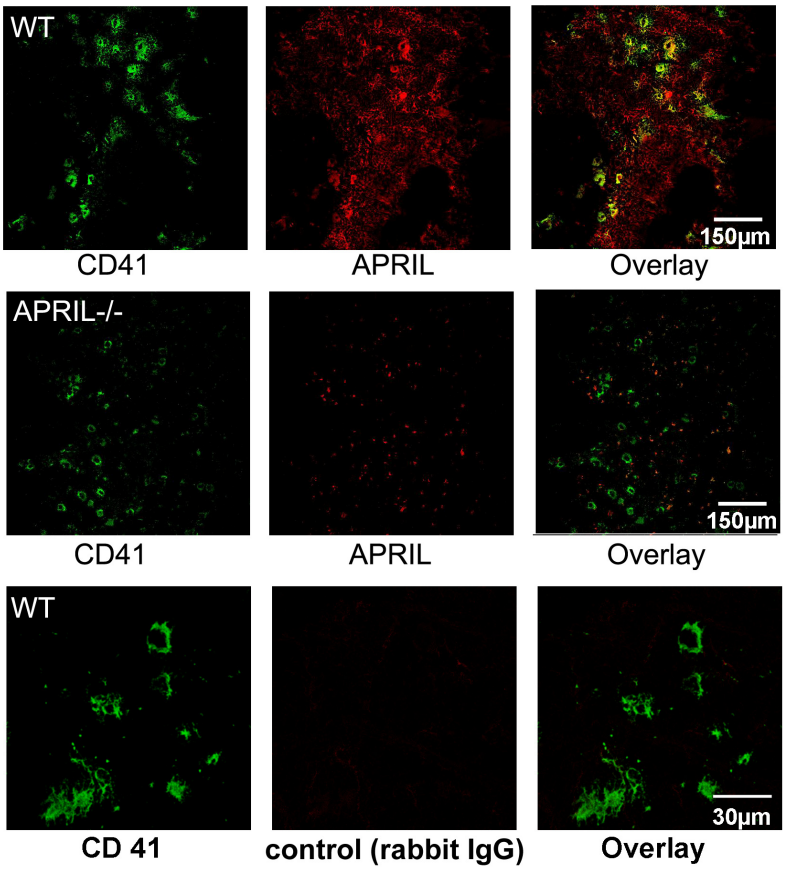



**Abb.15: Megakaryozyten und Plasmazellen kolokalisieren mit SDF-1.** Femurschnitte, oben: im Femur gibt es ein enges Netzwerk aus retikulären Zellen, Fibroblasten (Fibronektin+) und Endothelzellen (B78+). Die großen runden Megakaryozyten (Fibronektin+/ B78+) produzieren SDF-1. Unten links: Die SDF-1 Konzentration an der Kontaktstelle von Plasmazelle und Megakaryozyt ist besonders hoch. Unten rechts: Plasmazelle und Megakaryozyt sitzen zusammen am retikulären Fibronektin Gerüst

Die obigen Daten zeigen, dass retikuläre Zellen und Megakaryozyten SDF-1 produzieren. Ob jedoch alle Megakaryozyten SDF-1 produzieren oder ob es eine aktive Migration der Plasmablasten gegen dieses megakaryozytäre SDF-1 gibt, ist unklar. Aufgrund des engen Kontakts zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt hat megakaryozytäres SDF-1 jedoch das Potential, als Überlebensstimulanz auf Plasmazellen zu wirken.

### 3.2.5. Megakaryozyten produzieren Plasmazellüberlebensfaktoren

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Megakaryozyten neben SDF-1 weitere Plasmazell relevante Faktoren produzieren. In der Literatur wurden Megakaryozyten bereits als Produzenten für Plasmazellüberlebensfaktoren wie APRIL oder IL-6 beschrieben (siehe 1.3.). Da diese Daten jedoch oftmals aus humanen Megakaryozytenkulturen stammten, war es notwendig, diese Zytokinproduktion in dem von mir verwendeten Mausstamm *ex vivo* zu überprüfen. Die dazu durchgeführten histologischen (Abb. 16) und durchflusszytometrischen Analysen (Abb. 17) bestätigten, dass die über CD41 identifizierten Megakaryozyten sowohl APRIL als auch IL-6 produzieren. Diese Zytokinproduktion konnte ebenfalls für durchflusszytometrisch aufgereinigte Megakaryozyten von unserer Kooperationspartnerin Dr. Elodie Mohr (MDC, University of Birmingham, Birmingham UK) mittels qPCR belegt werden (Abb. 17). Des Weiteren ergaben die durchflusszytometrischen und qPCR Analysen, dass Megakaryozyten eine Hauptquelle für IL-6 im Knochenmark sind.


WT
150µm
CD41
APRIL
Overlay
APRIL-/-
150µm
CD41
APRIL
Overlay
WT
30µm
CD 41
control (rabbit IgG)
Overlay

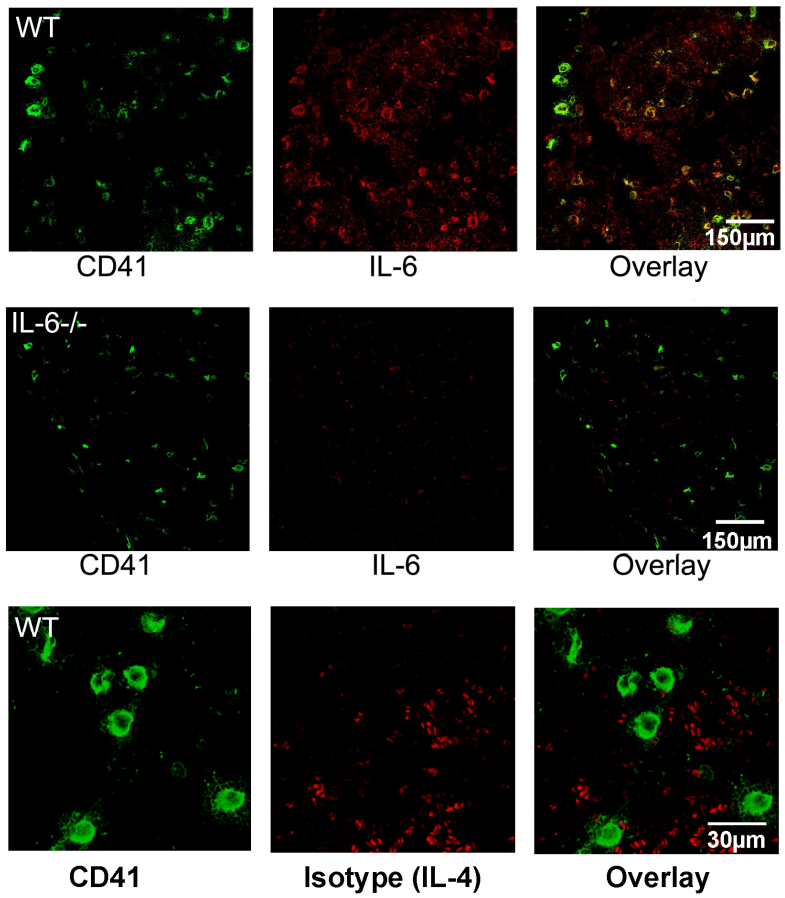

WT
150µm
CD41
IL-6
Overlay
IL-6-/-
150µm
CD41
IL-6
Overlay
WT
30µm
CD41
Isotype (IL-4)
Overlay

**Abb.16: Histologische Analyse der Zytokinproduktion von Megakaryozyten.** Femurschnitte wurden mit anti-CD41 (Megakaryozyten), April, IL-6 oder den entsprechenden Kontrollen, IL-4 (Isotypkontrolle für anti-IL6), Kaninchen IgG (rab-IgG, Kontrolle für anti-APRIL) gefärbt.

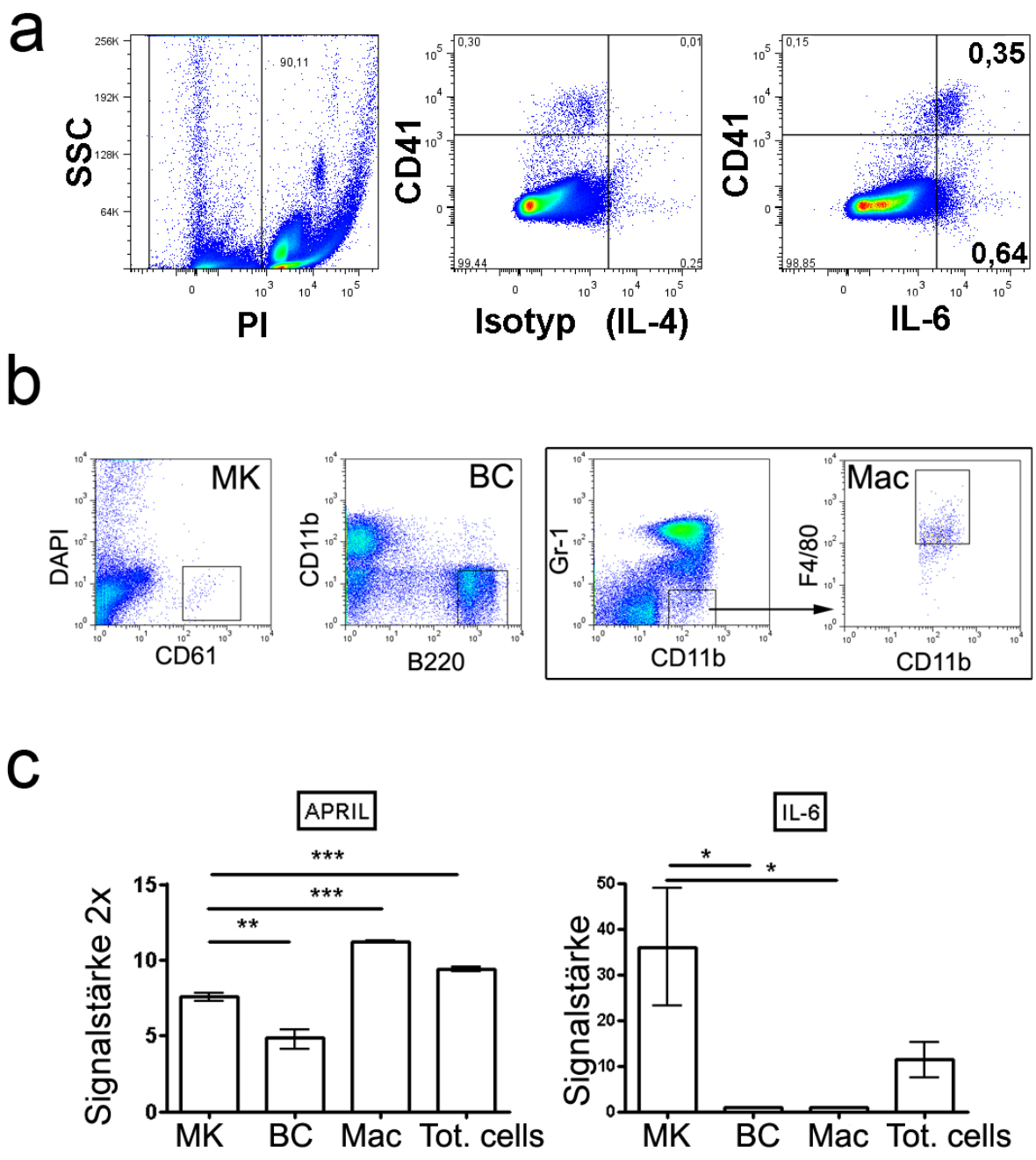



**Abb.17: Durchflusszytometrische und quantitative Genexpressionsanalyse der Zytokinproduktion von Megakaryozyten.** a: Die kernlosen Plättchen wurden über PI ausgeschlossen. und Megakaryozyten über CD41 identifiziert und für IL-4 bzw. IL-6 gegengefärbt. b: Megakaryozyten (CD61+), Makrophagen (CD11b+,F4/80+, Gr1-) und B-Lymphozyten (B220+) wurden durchflusszytometrisch isoliert. c: Die sortierten Zellpopulationen wurden mittels qPCR auf Expression der Plasmazellüberlebensfaktoren April und IL-6 hin untersucht.

Der histologische Nachweis für die IL-6 und APRIL Produktion durch Megakaryozyten konnte somit durch die qPCR bestätigt werden, wodurch die Megakaryozyten in der Lage wären, einen funktionellen Beitrag für die Plasmazellnische zu leisten. Interessant ist hierbei weiterhin die Exklusivität für die Zytokinproduktion. Während Megakaryozyten zwar mehr APRIL produzieren als B-Zellen, liegt ihre Syntheserate unter der des Knochenmarksdurchschnitts und der der Makrophagen. Allerdings belegen die qPCR und durchflusszytometrischen Daten, dass Megakaryozyten eine der Hauptquellen für IL-6 im Knochenmark sind, wobei die Transkription von IL-6 im Vergleich zu APRIL stark restringiert ist.

Um die Relevanz der Megakaryozyten für die Plasmazellnische festzustellen, sollte daher im Folgenden das Megakaryozytenkompartiment manipuliert und die daraus resultierende Auswirkung auf die Plasmazellen untersucht werden.

## *3.3. Die TPO Rezeptor defiziente Maus (c-Mpl -/-)*

Die TPO-Rezeptor defiziente Maus (c-Mpl -/-) hat eine Störung in der Megakaryozytenentwicklung, so dass die Zahl reifer Megakaryozyten nur 20% von denen des Wildtyps erreicht (siehe 1.3.1.; [66, 69]). Neben der Beeinflussung der Megakaryozytenlinie durch den Gen Knock-out wurde eine leichte Reduktion des hämatopoetischen Stammzellkompartiments beschrieben, wobei jedoch die Zahlen der reifen Leukozytenpopulationen vergleichbar mit denen der Wildtyptiere waren [66]. Somit eignen sich c-Mpl-/- Tiere, um die Auswirkung einer chronischen Störung des Megakaryozytenkompartiments auf die Plasmazellen zu untersuchen.

### 3.3.1. Das Plasmazellkompartiment der c-Mpl-/- Maus in Milz und Knochenmark

C-Mpl defiziente Tiere wurden drei Wochen mit dem Basenanalogon BrdU gefüttert, um die Auswirkungen einer gestörten Megakaryopoese und der daraus resultierenden geringeren Megakaryozytenzahl auf das Kurz- und Langlebige Plasmazellkompartiment zu untersuchen.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass im Knochenmark sowohl BrdU+, als auch BrDU- reduziert waren (Abb. 18), wobei das reife, langlebige BrdU- Kompartiment stärker minimiert war (BrdU+ 67% / BrdU- 48%) (Abb. 18). In der Milz waren jedoch weder die BrdU+ noch die reife Plasmazellpopulation verändert (Abb. 18).

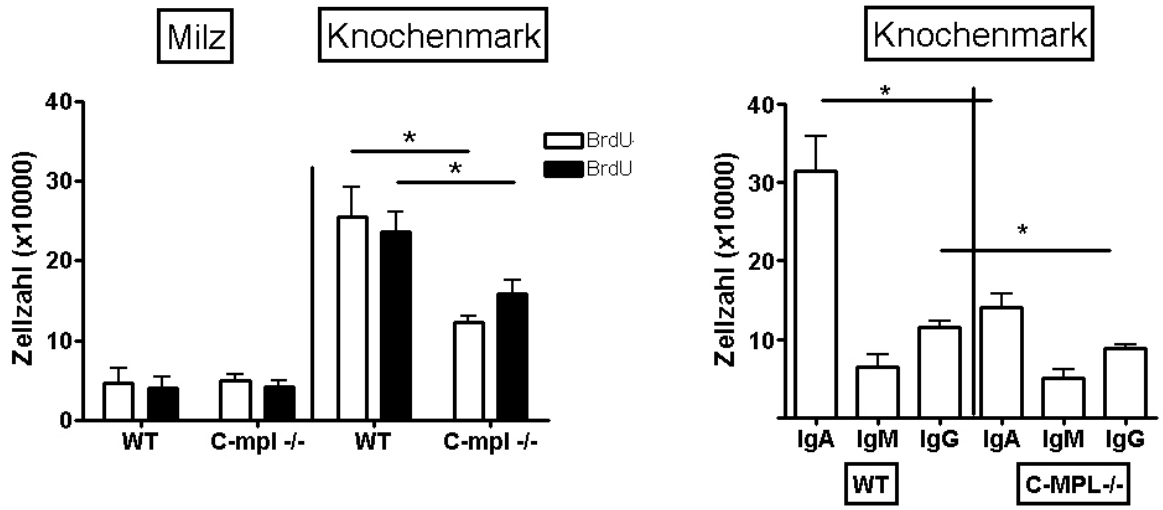



**Abb.18: Das Plasmazellkompartiment der c-Mpl defizienten Maus in Milz und Knochenmark.** C-Mpl-/- und Wildtypmäusen wurde 3 Wochen BrdU verfüttert. Anschließend wurden die Plasmazellen aus Milz und Knochenmark auf BrdU Einbau untersucht. Innerhalb von drei Wochen neu gebildete Plasmazellen sind BrdU+, zuvor gebildete langlebige Plasmazellen sind BrdU-.

Das Plasmazellkompartiment wurde somit ausschließlich im Knochenmark betroffen, welches ca. 90% aller Megakaryozyten beherbergt (siehe Abb. 11).

## 3.3.2. Analyse des antigenspezifischen Plasmazellkompartiments in der c-Mpl-/- Maus nach Primär- und Sekundärimmunisierungen

Aufgrund der Erkenntnis, dass das Plasmazellkompartiment und insbesondere das langlebige Plasmazellkompartiment in c-Mpl -/- Mäusen reduziert ist (siehe Abb.18), sollte nun eine definierte Immunreaktion induziert und die Bildung der Gedächtnisplasmazellpopulation untersucht werden. Dazu wurden c-Mpl -/- Tiere von mir mit Ova und unserem Projektpartnern Dimitra Zotos/ und David Tarlinton (WEHI, Melbourne, Australien) mit NP-KLH sekundär immunisiert und die antigenspezifischen Plasmazellen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Weiterhin wurden c-Mpl -/- Tiere im Labor von D. Tarlinton primär mit NP-KLH immunisiert und analysiert.

Wie man in der Abbildung 19 erkennen kann, ist die frühe Akkumulation sowohl bei der Primär- als auch bei der Sekundärimmunisierung gestört.

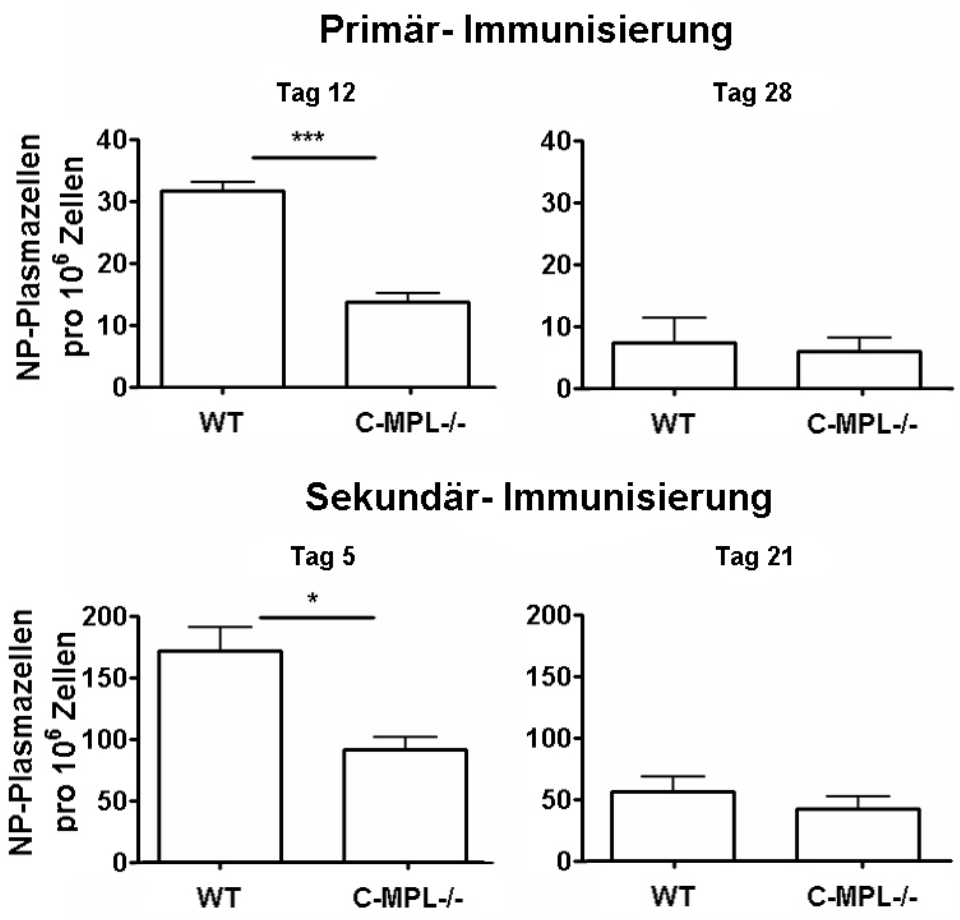



**Abb.19: Die Primär- und Sekundär Plasmazellantwort in c-Mpl-/- Mäusen.** Sowohl nach einer Primär (oben) als auch nach einer Sekundärimmunisierung (unten) mit NP-KLH ist die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark gestört. Zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 28 primär; Tag 21 sekundär) findet man jedoch die gleiche Anzahl an NP spezifischen Plasmazellen.

Später jedoch (Tag 21 primär/ Tag 28 sekundär) findet man eine vergleichbare Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen im Knochenmark von c-Mpl -/- und C57/BL6 Wildtyptieren (Abb. 19 und 20). In der Milz findet man allerdings an Tag 21 vierfach höhere Frequenz an Ova Plasmazellen in c-Mpl -/- Tieren als in den Kontrollen, was sich in der Tendenz auch in NP immunisierten Tieren zeigt (Abb. 20).

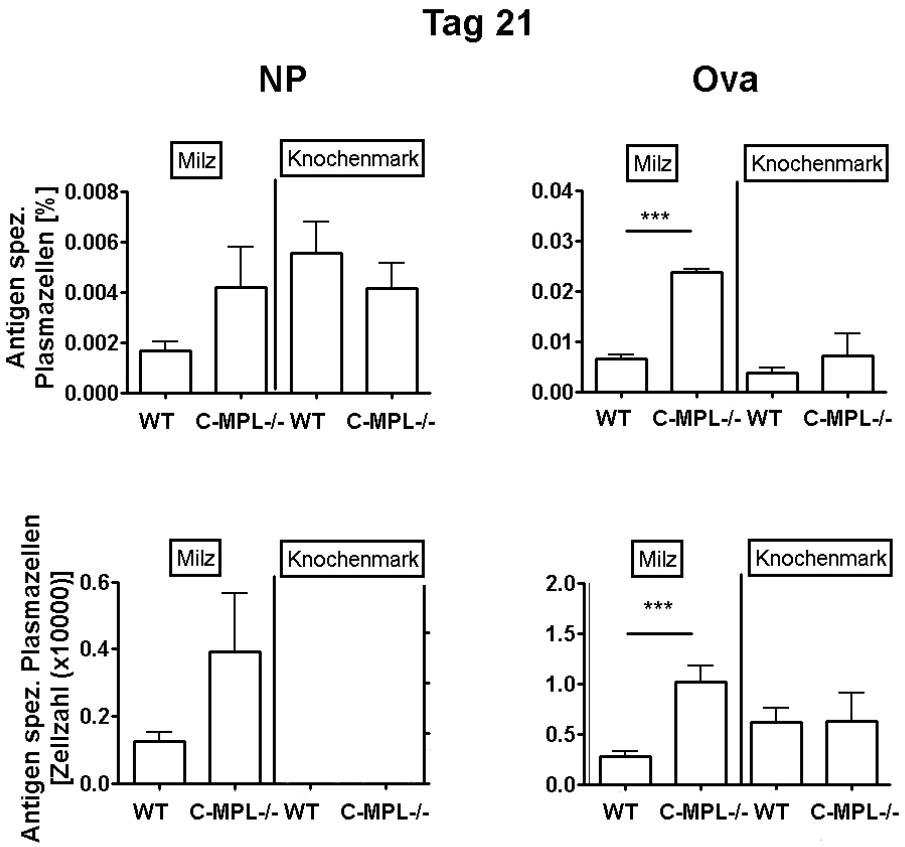



**Abb.20: Das Plasmazellkompartiment in Milz und Knochenmark zum späten Zeitpunkt nach einer Sekundärimmunisierung.** Die Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen ist im Knochenmark an Tag 21 für NP und Ova zwischen c-Mpl-/- und Wildtyp gleich. In der Milz von c-Mpl-/- Mäusen ist jedoch die NP/ Ova Plasmazellzahl in der Tendenz bzw. signifikant erhöht.

Die Anzahl an Ova spezifischen Plasmazellen in c-Mpl -/- Mäusen ist in der Milz doppelt so hoch wie im Knochenmark; bei Wildtyptieren ist sie dagegen nur halb so hoch (Abb. 20 unten rechts). Für die NP immunisierten Tiere gibt es leider keine Zellzahlen vom Knochenmark, weshalb sich dieser Vergleich hier nicht durchführen lässt.

Aufgrund der angeglichenen Ova Plasmazellzahlen im Knochenmark und der erhöhten Zahlen in der Milz im vorangegangenen Experiment stellte sich die Frage, ob an Tag 21 nach der Sekundärimmunisierung ausschließlich Gedächtnisplasmazellen vorhanden sind wie in Wildtyptieren, oder ob in c-Mpl-/- Mäusen die Immunreaktion noch nicht abgeklungen ist und somit Plasmazellformierung in der Milz und Einwanderung unreifer Plasmazellen ins Knochenmark weiterhin stattfindet. Das antigenspezifische Plasmazellkompartiment sollte in Bezug auf die Reife mittels BrdU Einbau und dem Oberflächenmolekül B220, dessen Expression im Verlauf der Reifung herrunterreguliert wird, untersucht werden.

Zusätzlich wurde in diesem Experiment (Abb. 21) eine Analyse an Tag 43 durchgeführt, um die Entwicklung im Ova Plasmazellkompartiment länger als zuvor zu verfolgen.

Weiterhin wurde das Immunisierungsprotokoll geändert und bei der Sekundärimmunisierung 30µg Ova an 100µg Alum präzipitiert und i.p. verabreicht, anstatt der 100µg Ova i.v. wie im Standardprotokoll. Dieses war notwendig, da es bei der c-Mpl-/- Gruppe im vorangegangenen Experiment zu einer hohen Mortalität (66%) in Folge der Sekundärimmunisierung kam. Die Todesursachen war vermutlich eine anaphylaktische Schockreaktion mit letalem Kreislaufkollaps, was im Wiederholungsexperiment unbedingt vermieden werden sollte.

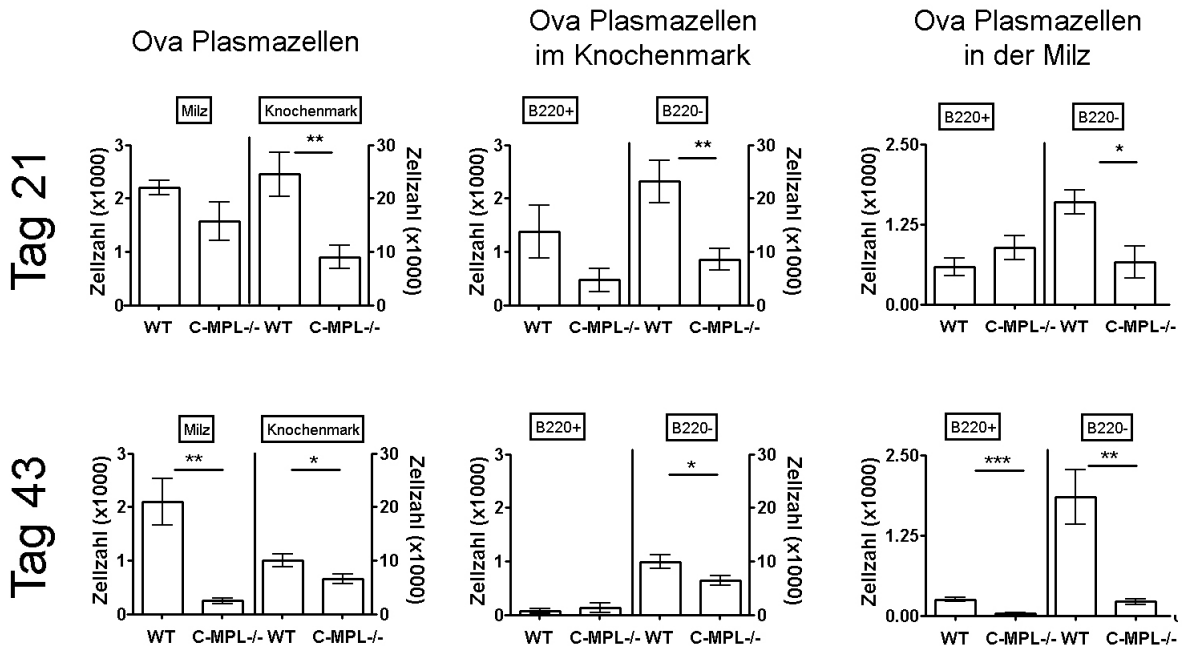



**Abb.21: Die Entwicklung des antigenspezifischen Gedächtnisplasmazellkompartiments bei c-Mpl -/- Mäusen in Folge einer Ova Sekundärimmunisierung.** Das Ova Plasmazellkompartiment wurde an Tag 21 (oben) sowie an Tag 43 (unten) nach der Sekundärimmunisierung auf den Marker B220 untersucht, welcher im Verlauf der Plasmazellreifung runterreguliert wird. In diesem Experiment wurde ein leicht verändertes Immunisierungsprotokoll verwendet, um die Mortalität in der c-Mpl Gruppe zu vermeiden.

Aus beiden Ova Immunisierungen mit unterschiedlichen Protokollen und den Immunisierungen mit NP ist klar erkennbar, dass in den c-Mpl -/- Tieren die frühe Akkumulationsphase der Plasmazellen im Knochenmark gestört ist. Beim zweiten experimentellen Ansatz blieb die Anzahl Ova spezifischer Plasmazellen auch spät nach der Immunisierung reduziert. Beides belegt, dass c-Mpl vermittelte Signale beim Aufbau des Gedächtnisplasmazellkompartiments eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin liegt ein

Zusammenhang mit Megakaryozyten nahe, da durch den c-Mpl Knock-out auf zellulärer Ebene nur Megakaryozyten und zum Teil hämatopoetische Stammzellen direkt betroffen sind. Um jedoch ein vollständigeres Bild zu bekommen, bedarf es einer ausführlicheren Kinetik mit durchflusszytometrischen und histologischen Analysen.

### 3.3.3. Kolokalisationsstudien in der c-Mpl-/- Maus

In der c-Mpl-/- Maus ist die Anzahl der Megakaryozyten auf ein Fünftel bzw. ein Achtel im Vergleich zum Wildtyp reduziert [66]. Andererseits ist das Plasmazellkompartiment lediglich auf die Hälfte verringert (siehe 3.3.1.). Daher stellte sich die Frage, ob und wie sich die Zusammenhänge zwischen Megakaryozyten und Plasmazellen in der c-Mpl-/- im Vergleich zum Wildtyp verändert haben.

Die histologischen Analysen ergaben, dass das Knochenmark gut vaskularisiert ist und das die Megakaryozyten, welche kleiner als im Wildtyp scheinen, mit den Gefäßen assoziiert sind (Abb. 22). Interessanterweise waren die Plasmazellen ebenfalls sehr häufig (ca. 45%) mit Endothelzellen kolokalisiert, während der Kontakt zu Megakaryozyten im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer war (ca. 10%) (Vergleich Abb. 8, 13 und 22).

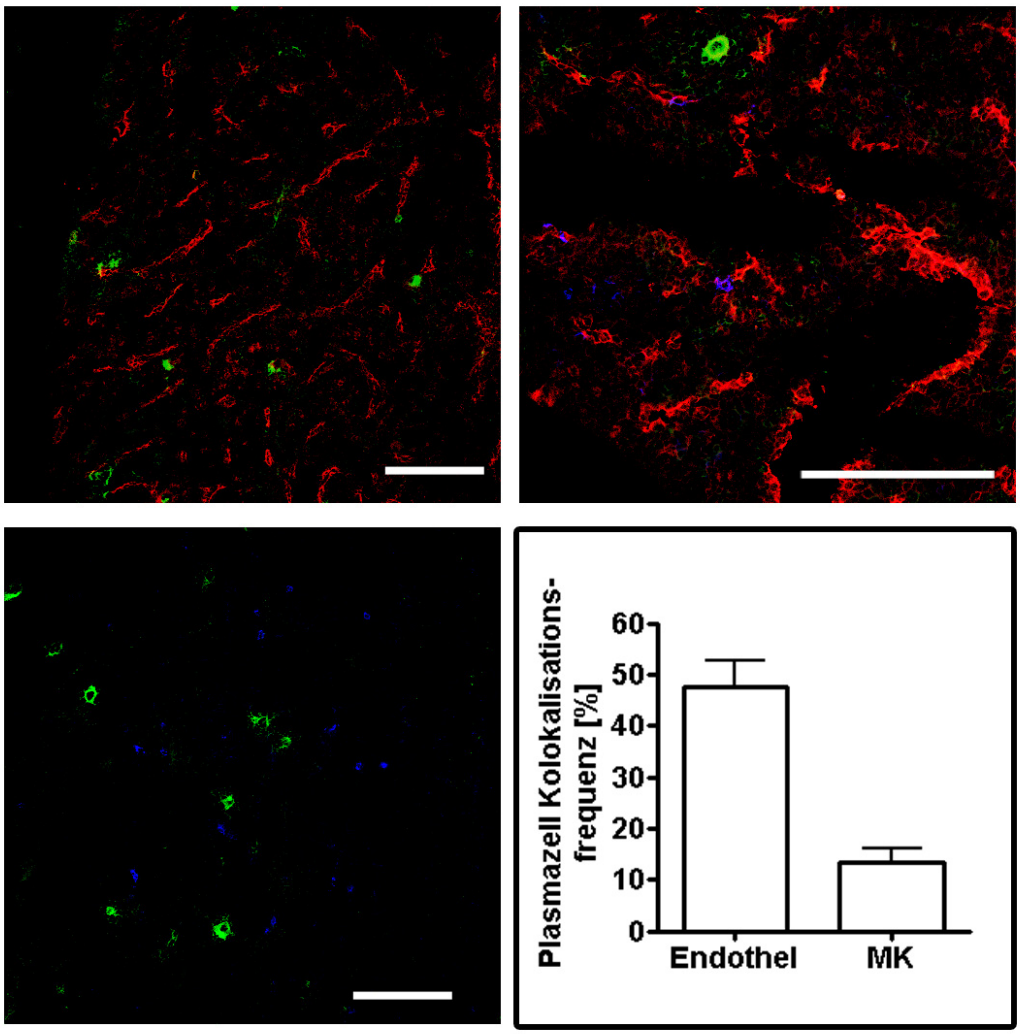



**Abb.22: In der c-Mpl-/- Maus sind Plasmazellen und Megakaryozyten in der vaskulären Nische lokalisiert, zeigen jedoch eine geringere Kolokalisation miteinander als im Wildtyp.** Das Knochenmark naiver c-Mpl-/- Mäuse wurde auf Megakaryozyten (CD41, grün), Plasmazellen (kappa, blau) und Endothelzellen (B78, rot) untersucht (der weiße Balken repräsentiert 150µm). Sowohl Plasmazellen als auch Megakaryozyten befanden sich dicht an den Gefäßen. Andererseits waren nur 10 Prozent der Plasmazellen mit Megakaryozyten assoziiert.

Megakaryozyten scheinen somit nur eine untergeordnete Rolle für Plasmazellen in der c-Mpl-/- Maus zu spielen, während Endothelzellen möglicherweise an Bedeutung gewannen. In diesem Zusammenhang war es sehr interessant, dass in c-Mpl-/- Mäusen retikuläre Zellen anstelle der Megakaryozyten die dominante IL-6 Quelle sind, und dass weiterhin die Plasmazellen mit diesen IL-6+ retikulären Zellen kolokalisiert sind (Abb. 23).

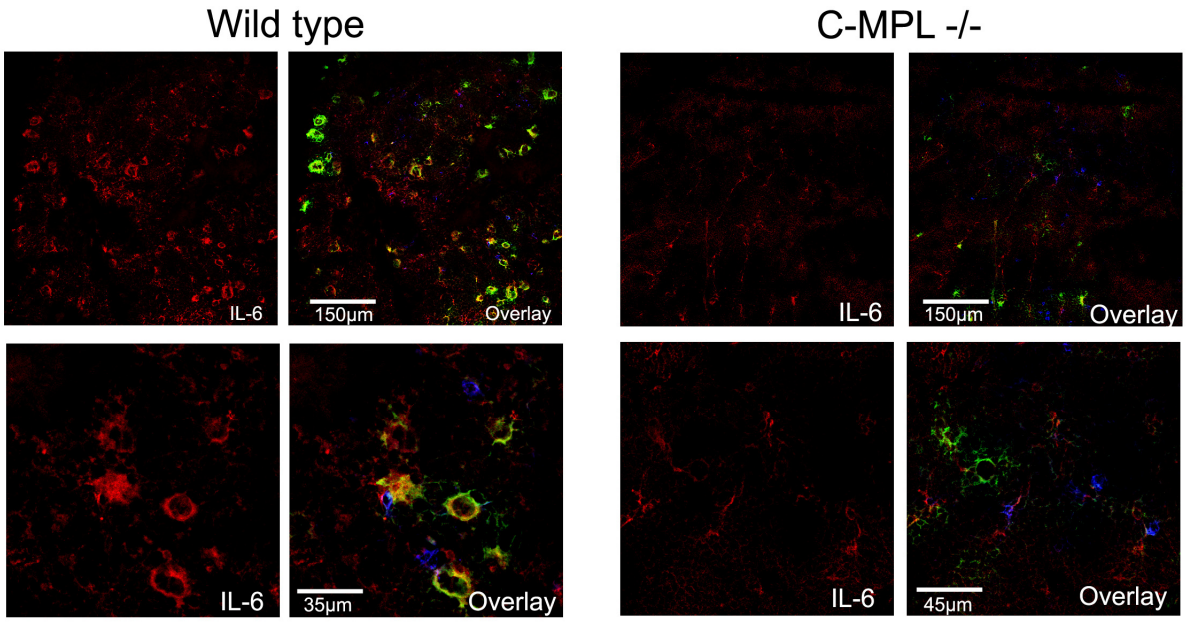



**Abb.23: In der c-Mpl-/- Maus sind Megakaryozyten nicht die dominierenden IL-6 Produzenten.** Femurschnitte von C57/BL6 Wildtyptieren und c-Mpl-/- Mäusen wurden auf IL-6 Produktion (IL-6, rot) untersucht. Megakaryozyten (CD41, grün) in c-Mpl-/- Mäusen produzieren IL-6, sind jedoch im Vergleich zum restlichen Knochenmark nicht mehr die dominanten IL-6 Produzenten wie im Wildtyp. Die Plasmazellen (kappa, blau) sind assoziiert mit IL-6 positiven Zellen.

## *3.4. Manipulation der Plasmazellnische mittels Thrombopoetin (TPO)*

Neben den bisherigen Untersuchungen des Plasmazellkompartiments bei permanenten Megakaryozytendefizit (c-Mpl-/- Maus) sollte die Auswirkung einer gezielten Stimulation des Megakaryozytenkompartiments in Wildtypmäusen untersucht werden.

### 3.4.1. Eine fünftägige TPO Behandlung induziert die Megakaryopoese und führt zu einer Erneuerung des Megakaryozytenkompartiments

Balb/c Mäusen wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen das Zytokin Thrombopoetin, welches spezifisch auf Zellen der Megakaryozytenlinie wirkt, intraperitoneal gespritzt. Wie in der Literatur beschrieben (siehe 1.3.1.) und in Abbildung 24 dargestellt, induziert TPO die Neubildung von Megakaryozyten aus hämatopoetischen Stammzellen. Zusätzlich führt es während der Applikation zu einer verlängerten Reifung der Megakaryozyten und somit zu einem transienten Anstieg der gesamten Megakaryozytenpopulation [70]. Nach Absetzen der TPO Behandlung beginnt Rückregulation der Megakaryopoese auf ein homöostatisches Niveau, vorzugsweise durch Verlust der ältesten und reifsten Zellen mit dem höchsten Ploidiegrad (Abb. 24).

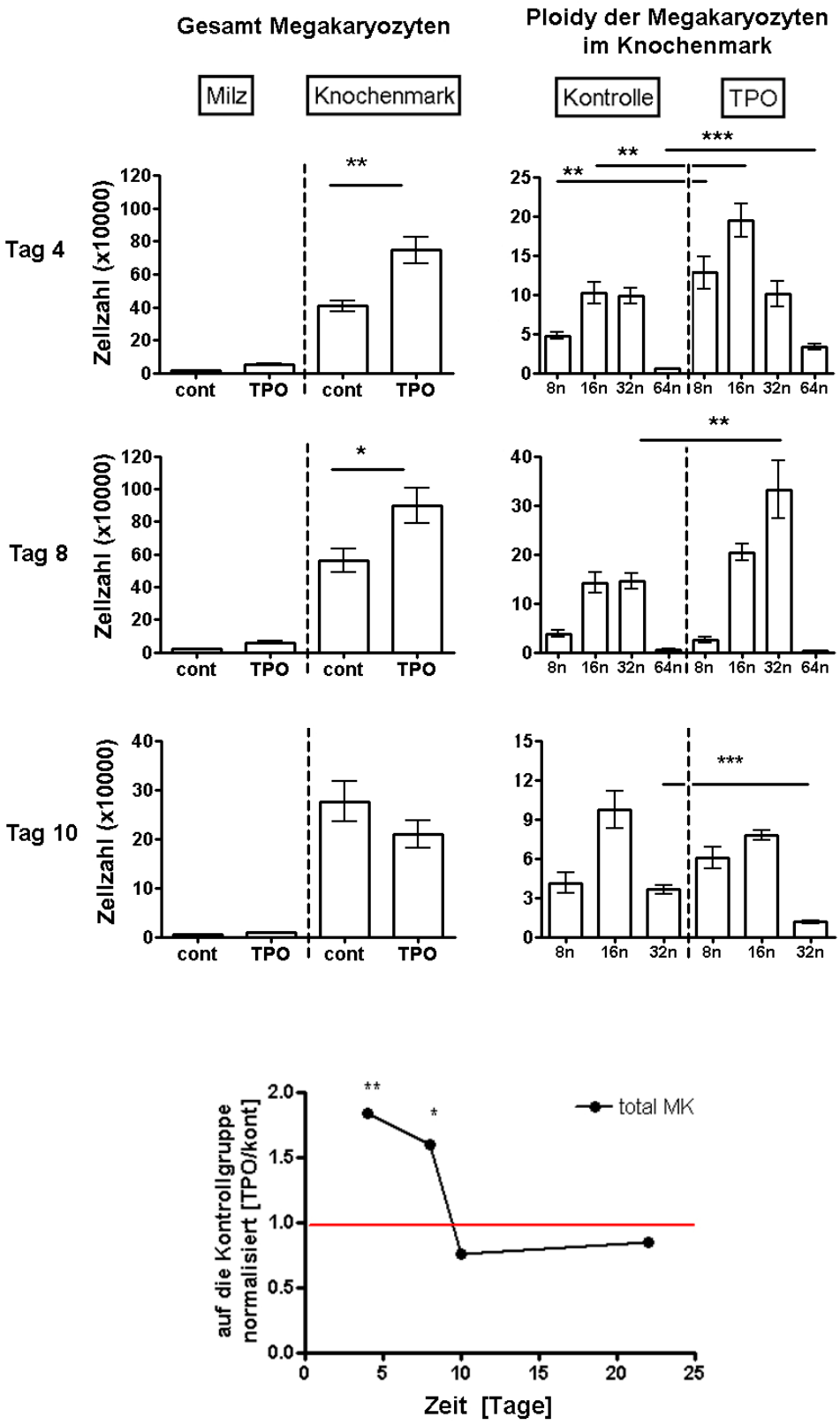



**Abb.24: Kinetik der TPO induzierten Megakaryopoese.** Oben: Mäusen wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen (0-4) TPO bzw. BSA injiziert und die Anzahl der Megakaryozyten, sowie deren Ploidiegrad wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Unten: Die Kinetik in den behandelten Tieren wurde auf die Kontrollgruppe normalisiert (TPO/kont).

Die Expansion des Megakaryozytenkompartiments infolge einer fünftägigen TPO Behandlung ist auch im Gewebeschnitt des Knochenmarks deutlich erkennbar (Abb. 25). Die Gefäße sind dicht gesäumt mit Megakaryozyten, und es scheint ebenfalls zu einer Freisetzung von Thrombozyten im Gewebe zu kommen.

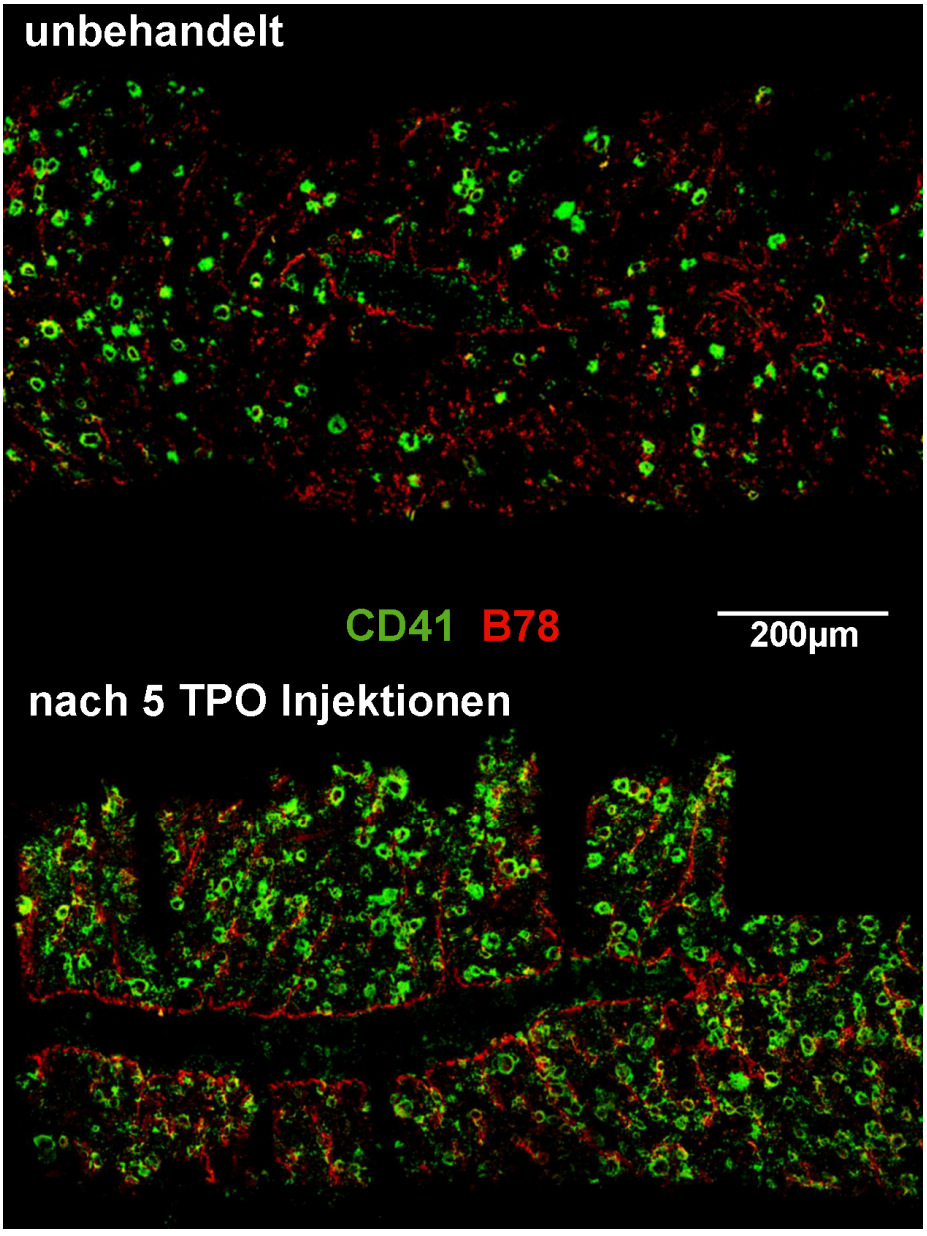



**Abb.25: Das durch TPO vergrößerte Megakaryozytenkompartiment im Gewebe.** Femurschnitte nach fünftägiger TPO bzw. BSA Behandlung wurden für Megakaryozyten (CD41) und Endothel (B78) gefärbt. In dem Schnitt der TPO behandelten Maus erkennt man neben den vermehrten Megakaryozyten auch viele kleine Thrombozyten im Gewebe.

### 3.4.2. Untersuchung der Genexpression des TPO-Rezeptors c-Mpl und der Wirkung von TPO auf Plasmazellen in Kultur

Die Genexpression von c-Mpl wurde in Plasmazellen, B-Zellen und Megakaryozyten untersucht, um auszuschließen, dass der TPO/ c-Mpl Signalweg auch in Plasmazellen aktiv ist. Dazu wurden Plasmazellen (CD138++) und reife B-Zellen (IgD+) mittels Durchflusszytometrie sortiert (Abb. 26 links) und Megakaryozyten in Kultur gewonnen. Die RT-PCR wurde freundlicherweise von unseren Kooperationspartner Harald Schulze an der Charité durchgeführt. GAPDH und die linienspezifischen Banden zeigen die Funktionalität der Sortierung und der RT-PCR. Abbildung 26 rechts zeigt, dass c-Mpl mRNA nur in der Megakaryozytenfraktion gefunden wurde.

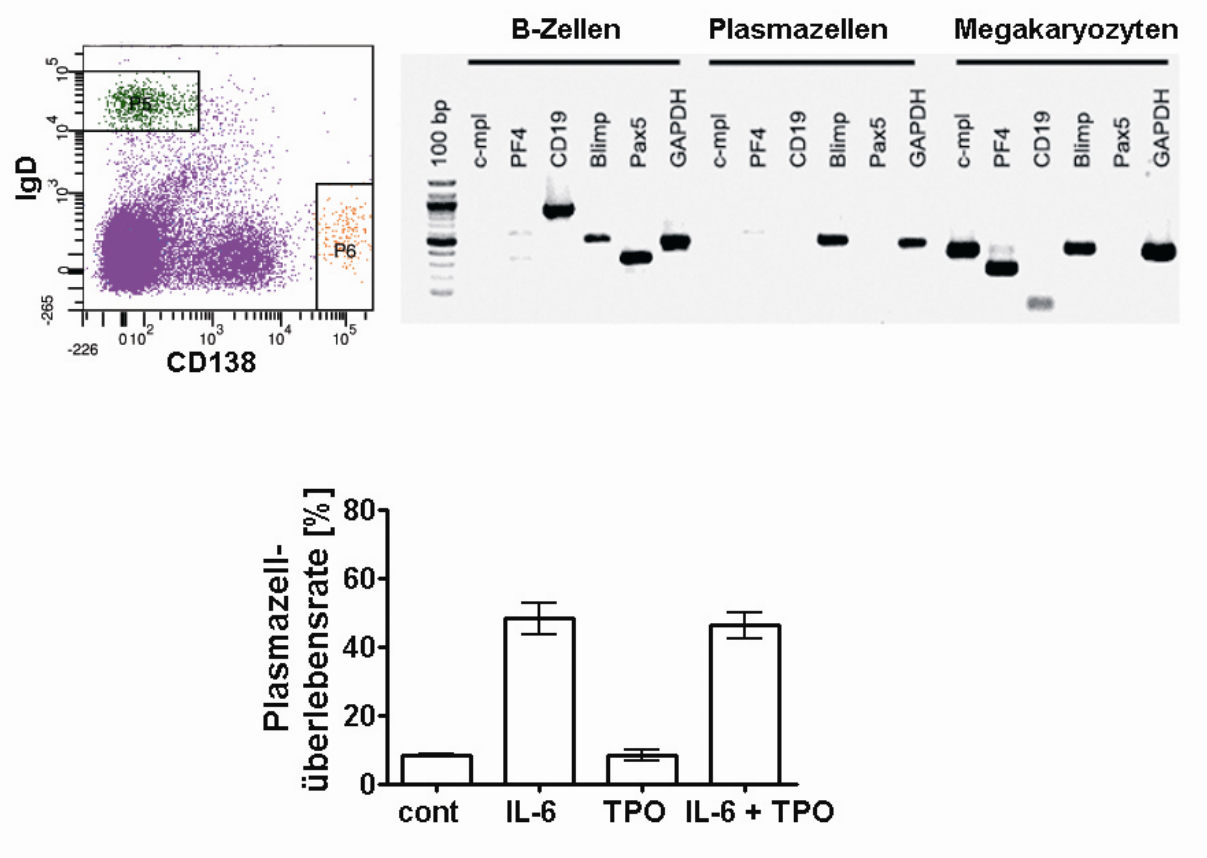



**Abb.26: Genexpressionsanalyse für c-Mpl in B-Zellen, Plasmazellen und Megakaryozyten und Überlebensraten von Plasmazellkulturen.** Plasma- und B-Zellen wurden aus dem Knochenmark durchflusszytometrisch isoliert (oben links) während Megakaryozyten aus einer fetalen Leberkultur gewonnen wurden. Anschließend wurden die Zellen mittels RT-PCR auf Genexpression des TPO-Rezeptors c-Mpl untersucht (oben rechts). Mittels Durchflusszytometrie wurden Plasmazellen in eine Kulturplatte sortiert(500/ Well) und für drei Tage mit Medium, IL-6 [10pg/ml], TPO [50pg/ml] oder mit beidem kultiviert. Die Plasmazellzahlen wurden an Tag 0 und 3 mittels ELISPOT ermittelt (unten).

Um weiterhin direkte Effekte von TPO auf Plasmazellen über einen TPO/ c-Mpl unabhängigen Weg auszuschließen, wurden Plasmazellen mit TPO, sowie mit und ohne den Überlebensfaktor IL-6 für drei Tage kultiviert. Wie man in Abbildung 26 erkennen kann, hatte TPO weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf das Überleben der Plasmazellen. Dies belegt, dass die Veränderungen des Plasmazellkompartiments in c-Mpl -/- Mäusen nicht direkt über den TPO bzw. den TPO/ c-Mpl Signalweg in der Plasmazelle zustande kommen konnten, sondern aus einem indirekten Effekt auf die Plasmazellen resultierten.

### 3.4.3. Die Wirkung der TPO Behandlung auf ausgewählte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, sowie auf reife Leukozyten

Da wie oben gezeigt B-Zellen und Plasmazellen selbst kein c-Mpl exprimieren und nicht auf direkte Stimulation mit TPO reagieren, erscheint die Injektion von TPO ein geeigneter experimenteller Ansatz, um den Effekt von Änderungen des Megakaryozytenkompartiments auf das Plasmazellkompartiment *in vivo* zu überprüfen.

Die Auswirkung der TPO Behandlung auf andere Zellpopulationen sollte jedoch zuerst getestet werden, um mögliche indirekte Effekte auf Plasmazellen über diese Zellen ausschließen zu können.

Zu den untersuchten Zellpopulationen gehörten multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen (I:LSK), hämatopoetische Stammzellen (II:Lin-,CD150+, CD41-, CD48-), welche ebenfalls den TPO-Rezeptor c-Mpl tragen, B-Lymphozytenlinien Zellen (III: B220+), monozytenlinien Zellen (IV: Mac-1+), sowie reife B-Zellen (V:IgD+) und Granulozyten (VI: Gr-1+). Die Analyse erfolgte am letzten Tag der TPO Behandlung (Tag 4), sowie drei Tage später (Tag 7), an dem die Megakaryozytenzahl immer noch signifikant erhöht war (Abb. 27).

Wie man in Abbildung 27 erkennen kann, gab es am Ende der TPO Behandlung (Tag 4) eine schwache Reduktion der B-Zellen, der Monozyten und der Granulozyten, wobei sich diese Populationen bereits an Tag 7 normalisiert hatten. Zu diesem Zeitpunkt waren die HSC und MPP Population leicht verändert. Jedoch werden diese Zellen, im Gegensatz zu den Megakaryozyten, durch TPO Gabe reduziert.

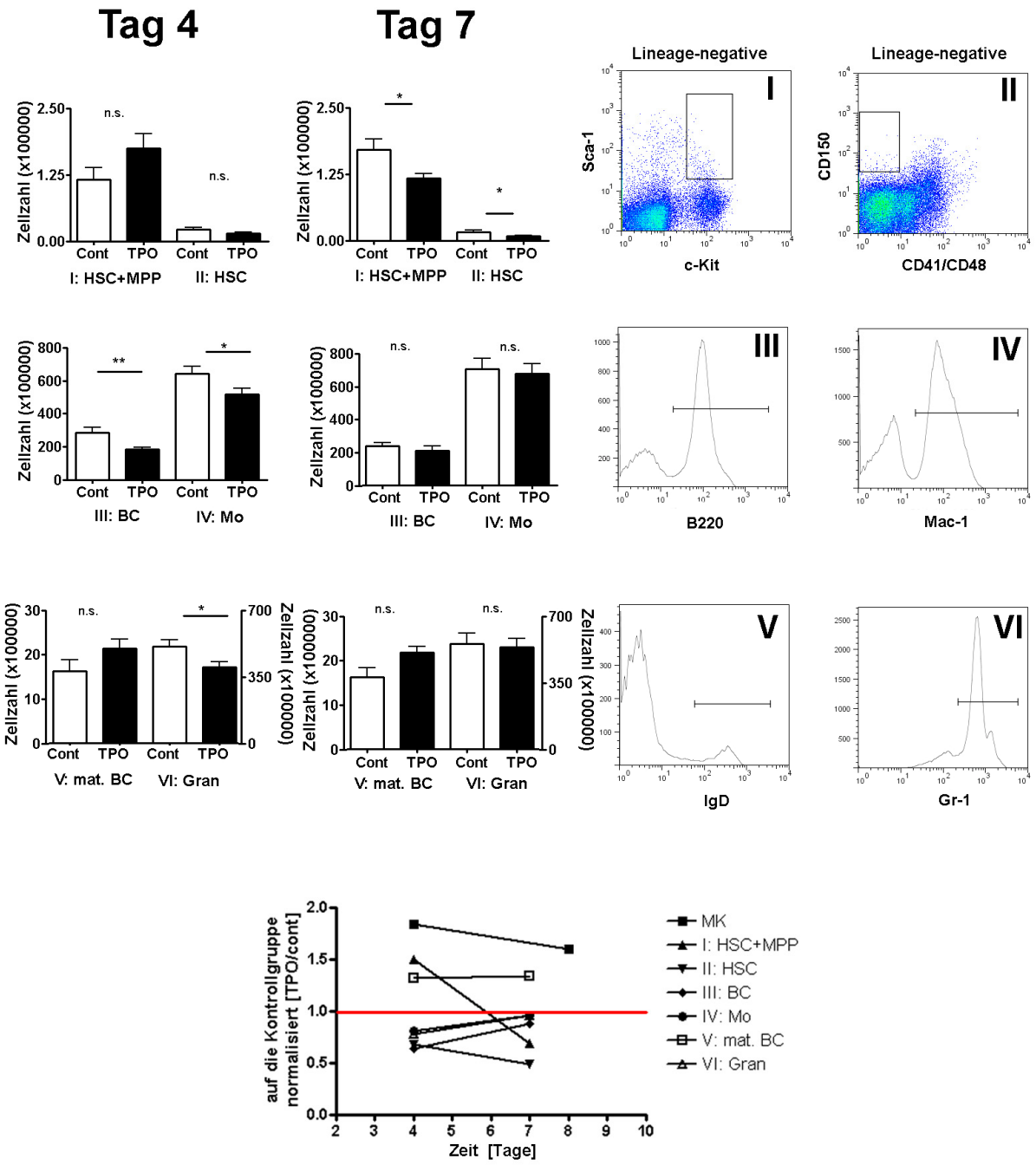



**Abb.27: Kinetik verschiedener Leukozyten in Folge einer TPO Behandlung.** Balb/c Mäusen wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen TPO injiziert (siehe auch 3.4.1.) und die Anzahl verschiedener Knochenmarkzellen bestimmt. Darunter waren multipotente Vorläufer Zellen (I: MPP) und hämatopoetische Stammzellen (II HSC), sowie die Zellen der B-Zelllinie (III: BC) und der Monozytenline (IV: Mo). Als reife Leukozytenpopulationen wurden naive B-Zellen (V: mat. BC) und Granulozyten (VI: Gran) untersucht. Rechts: Die Färbungen und Analysefenster im Durchflusszytometer. Links: Die Zellzahlen an Tag 4 (letzter Tag der Behandlung) und Tag 7 (drei Tage nach Absetzten von TPO). Unten: Die Kinetik der verschiedenen Populationen wurde auf die Kontrollgruppen normalisiert (TPO/cont). Zusätzlich wurde in dieses Schema die Megakaryozytenkinetik aus Abb. 24 eingefügt.

TPO hat somit von den untersuchten Zellen nur auf das Megakaryozytenkompartiment einen längeren und vor allem stimulierenden Einfluss. Drei Tage nach Absetzen von TPO waren neben den Megakaryozyten lediglich die Vorläufer- und Stammzellen verändert, jedoch waren diese anders als die Megakaryozyten reduziert.

### 3.4.4. Auswirkung der TPO Behandlung auf pre-existente Plasmazellen

Nachdem gezeigt wurde, dass TPO keinen direkten Einfluss auf die Plasmazellen hat (siehe 3.4.2.), sollte *in vivo* untersucht werden, wie sich die TPO Behandlung auf die Plasmazellkompartimente in Milz und Knochenmark auswirkt. Dazu wurden Balb/c Mäuse nach dem oben beschriebenen Schema (siehe 3.4.3.) behandelt. Zusätzlich wurde das Basenanalogon BrdU in das Trinkwasser gegeben, wodurch neu gebildete (BrdU+) und pre-existente (BrdU-) Plasmazellen durch Anfärben unterschieden werden können.

Am letzten Tag der TPO Behandlung (Tag 4) und vier Tage später (Tag 8) war die Megakaryozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (siehe Abb. 24). Wobei sich bereits eine negative Tendenz abzeichnete und an Tag 10 wieder das Normalniveau erreicht war. Hauptsächlich resultiert dieser Abfall durch das starke Abnehmen der reifen Megakaryozyten Populationen mit hohen Ploidiegraden (siehe Abb. 24). Die unreifen (BrdU+) Plasmazellen zeigten von Tag 4 auf Tag 8 eine ansteigende Tendenz. Die Kurve verlieft dann (Tag 8 - Tag 10) jedoch wie bei den Megakaryozyten nach unten (Abb. 28), wobei von der Reduktion nur die reifen Megakaryozyten (hoher Ploidiegrad) und die reifen Plasmazellen (BrdU-) signifikant betroffen sind (Abb. 28). Infolge des Anstieges neu gebildeter BrdU+ Plasmazellen und dem stärkeren Verlust langlebiger BrdU- Plasmazellen kommt es zu einem Austausch im Plasmazellkompartiment (Abb. 28c). Allerdings können sich diese BrdU+ Plasmazellen nicht im Knochenmark etablieren, und ihre Zahl sinkt bis Tag 23 weiter ab.

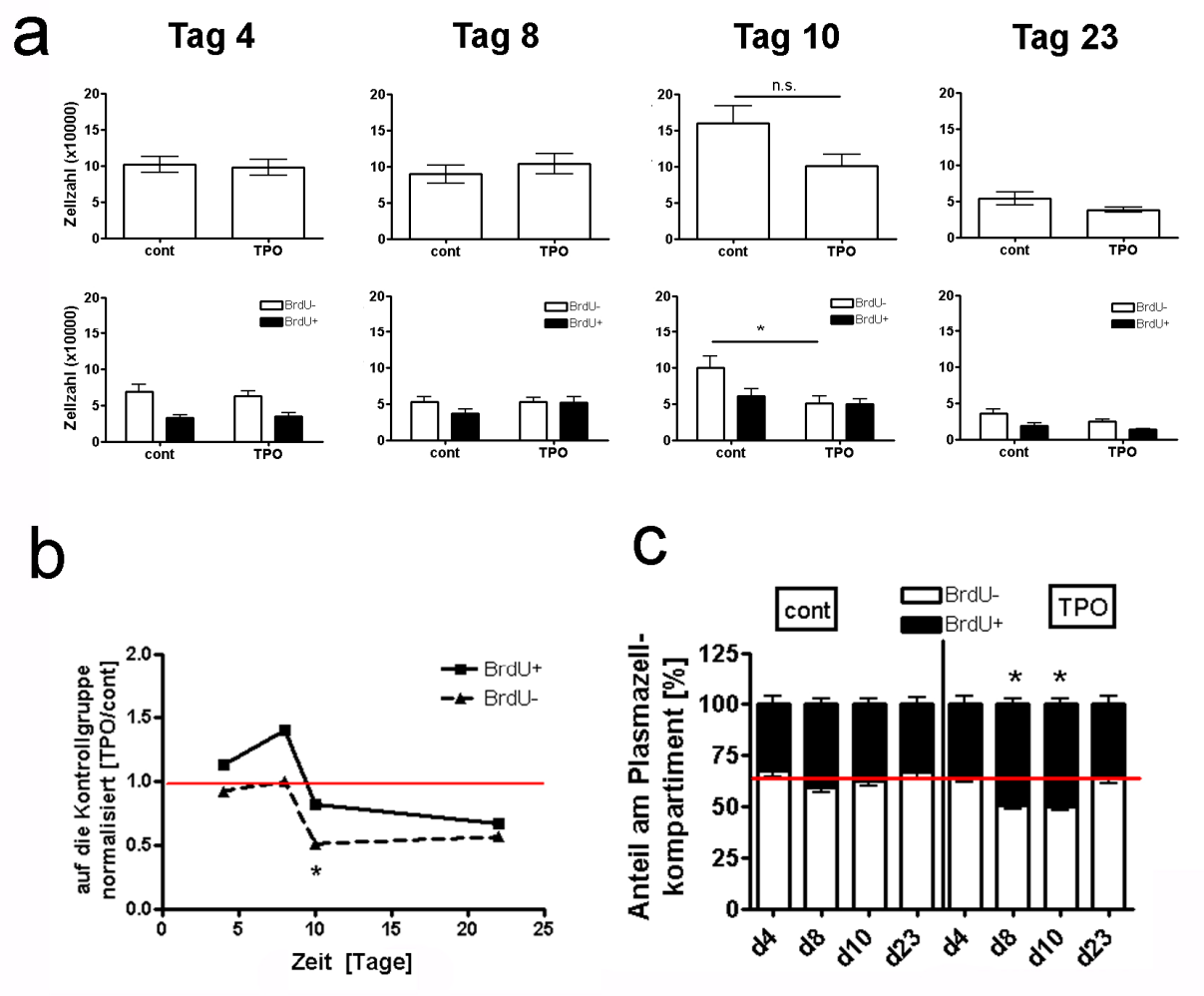



**Abb.28: Plasmazellkinetik der fünftägigen TPO Behandlung.** Balb/c Mäuse wurden zwei Wochen vor der Analyse mit BrdU gefüttert und erhielten fünf TPO Injektionen (Tag 0-4). a: Die Kinetik der TPO Behandlung ist für die Gesamtplasmazellen, sowie für langlebige (BrdU-) und neu gebildete (BrdU+) Plasmazellen aufgeschlüsselt dargestellt. b: Die behandelten Tiere wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert (TPO/cont) und der Verlauf der Kinetik dargestellt. c: Das Verhältnis zwischen neu gebildeten (BrdU+) und langlebigen (BrdU-) Plasmazellen im Verlauf der Kinetik ist hier gezeigt. Der Stern (*) markiert signifikante Unterschiede ($p<0,05$).

### 3.4.5. Auswirkung der TPO Behandlung auf die Bildung des Gedächtnisplasmazellkompartiment in Folge einer Immunisierung

Aus den Ergebnissen der Megakaryozytenkinetik (3.4.3.) und dem TPO induzierten Austausch im Plasmazellkompartiment (3.4.4.) wurde folgendes Versuchsschema für die gekoppelte TPO Behandlung und Ova Immunisierung entwickelt (Abb.29a).

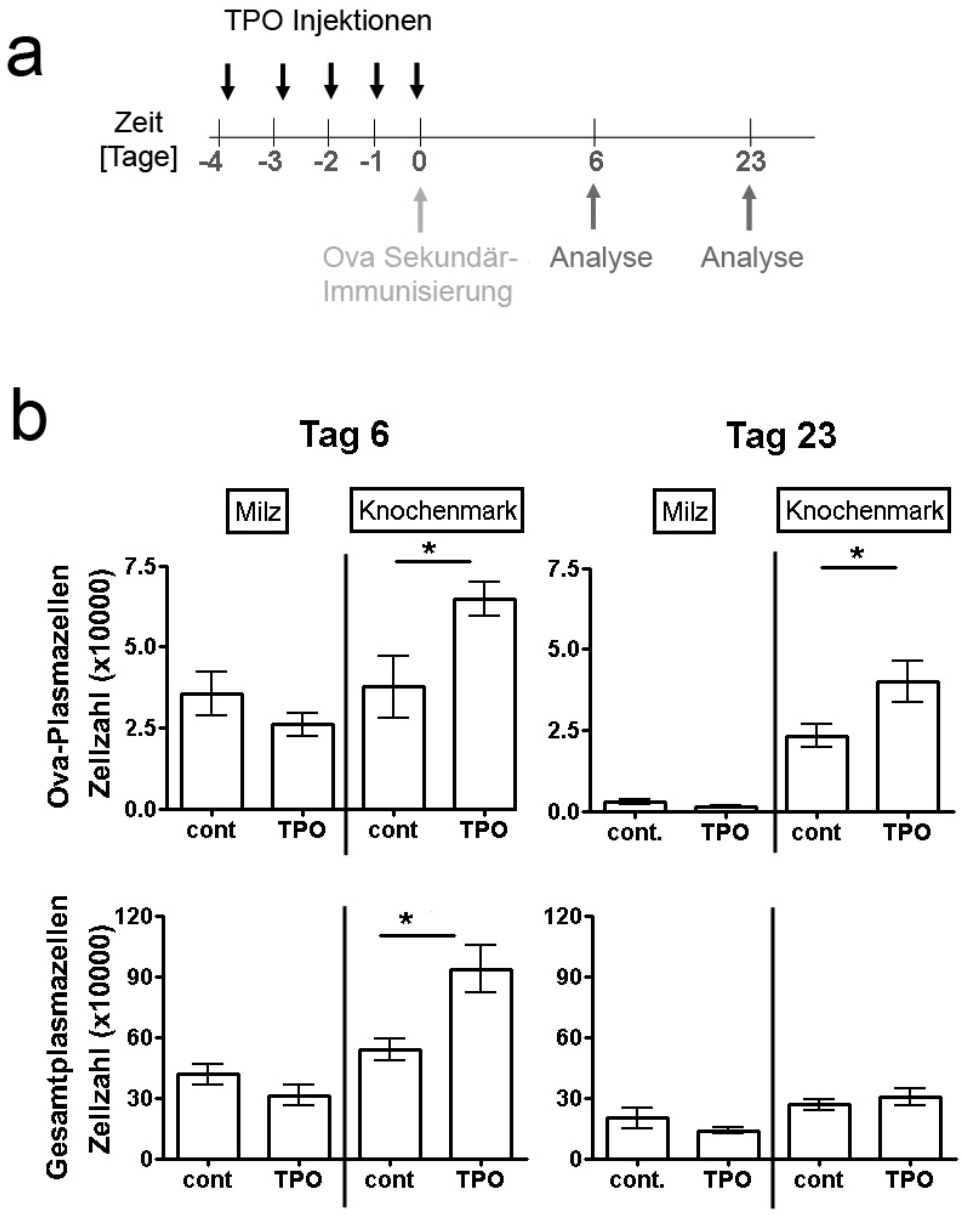



**Abb.29: Die Beeinflussung des Gedächtnisplasmazellkompartiments durch Kombination von Immunisierung und TPO Behandlung.** A: Behandlungsschema für eine Sekundärimmunisierung bei gleichzeitiger TPO Behandlung. B: Gesamtplasmazellen sowie Ova Plasmazellen wurden an Tag 10 (Tag 6 nach der Sekundärimmunisierung), welches den Zeitpunkt des Akkumulationsmaximums von Ova Plasmazellen im Knochenmark darstellt und nach Stabilisierung des Plasmazellkompartiments an Tag 27 (Tag 23 nach Sekundärimmunisierung) gemessen.

Balb/c Mäusen wurde nach einer vorausgegangenen fünftägigen TPO Behandlung Ova *i.v.* injiziert. Die unreifen Plasmazellen beginnen ab Tag 3 im Knochenmark zu akkumulieren und erreichen an Tag 6 ihr Maximum (siehe 1.1.2.5.). Während dieser Zeit ist die Megakaryozytenzahl noch erhöht, sinkt aber bereits wieder auf homöostatisches Niveau, wobei nun das Kompartiment vorwiegend aus neu gebildeten Megakaryozyten besteht (siehe Abb. 24).

Dementsprechend wurde Tag 6 als erster Analysezeitpunkt gewählt, da dieser Zeitpunkt wie erwähnt das Maximum der einwandernden Plasmablasten im Knochenmark bei gleichzeitig wieder normalisierten Megakaryozytenzahlen (siehe Abb.24) darstellt. Wie man in Abbildung 29b erkennen kann, ist die Bildung der Ova Plasmablasten in der Milz nicht gestört und auch die Gesamtplasmazellzahl bleibt unverändert. Im Knochenmark ist jedoch sowohl die Ova spezifische als auch die Gesamtplasmazellzahl um 70% erhöht.

Als später Analysezeitpunkt wurde Tag 23 gewählt, da sich das durch die Immunisierung generierte Ova spezifische Plasmazellkompartiment zu diesem Zeitpunkt stabilisiert hat und ausschließlich langlebige Gedächtnisplasmazellen präsent sind (siehe 1.1.2.5.). In der Milz kann man gut die abgeklungene Immunreaktion erkennen, da sich dort kaum noch Ova Plasmazellen finden. Auch im Knochenmark hat die Ova und Gesamtplasmazellzahl abgenommen und ein Plateau erreicht (Abb. 29b). Jedoch finden wir hier, wie schon zum frühen Zeitpunkt, 70% mehr Ova spezifische Plasmazellen in den TPO behandelten Tieren (Abb. 29b).

Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die TPO Behandlung zu einer annähernden Verdopplung des Ova spezifischen Gedächtnisplasmazellkompartiments führte.

## *3.5. Plasmazellen und Megakaryozyten in Kokultur*

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass Plasmazell- und Megakaryozytenzahlen im Knochenmark korrelieren (c-Mpl-/- Maus und TPO Behandlung), beide Zelltypen kolokalisiert sind und Megakaryozyten Plasmazellüberlebensfaktoren wie IL-6 und April produzieren. Um zu überprüfen, ob Megakaryozyten fähig sind, Plasmazellen auch herausgelöst aus dem Zellverband des Knochenmarks zu stimulieren, sollte eine Plasmazell-Megakaryozyten Kokultur etabliert werden.

Im Vorexperiment hatte sich gezeigt, dass reife Plasmazellen (B220- und MHCII-) aus dem Knochenmark nicht mehr in der Kultur von Megakaryozyten am Leben erhalten werden konnten, jedoch noch auf den lösliche Faktor IL-6 ansprachen.

Da für das Überleben der Plasmazelle vielleicht eine aktive Kolokalisation mit der Stromazelle, in diesem Fall dem Megakaryozyt, notwendig sein könnte, muss die untersuchte Plasmazelle dementsprechend migrationsfähig sein. Daher wurden für folgende Experimente neu gebildete Plasmazellen aus der Milz verwendet. Diese wurden durch eine Ova Sekundärimmunisierung generiert, da Ova Plasmazellen in vivo bereits die Fähigkeit zur Interaktion mit Megakaryozyten zeigten (siehe 3.2.1.; 3.3.2. und 3.4.5.).

Die Plasmazellen wurden an Tag 4 nach der Sekundärimmunisierung aus der Milz durchflusszytometrisch isoliert (Abb. 30) und in eine Kulturplatte sortiert. Anschließend wurden die Plasmazellen für vier bzw. fünf Tage mit verschiedenen Medium, CD61+ Megakaryozyten, CD61- Kontrollzellen, IL-6 sowie Megakaryozyten+ IL-6 kultiviert. Es zeigte sich, dass in den Megakaryozytenansätzen mehr Plasmazellen vorhanden waren als in den Kulturen mit Medium alleine oder mit der Kontrollpopulation (Abb. 30). Jedoch wurden die meisten Plasmazellen in den Ansätzen, die nur IL-6 enthielten, nachgewiesen.

Das gleiche Bild spiegelte der Antikörpertiter wieder, der aus dem Überstand der Kulturansätze gewonnen wurde. Auch hier war mehr anti-Ova sowie totaler IgG Antikörper in den Megakaryozytenansätzen vorhanden, als in denen mit Medium oder der Kontrollpopulation (Abb. 30). Wobei der höchste Antikörpertiter auch hier in den IL-6 Kulturen zu finden war.

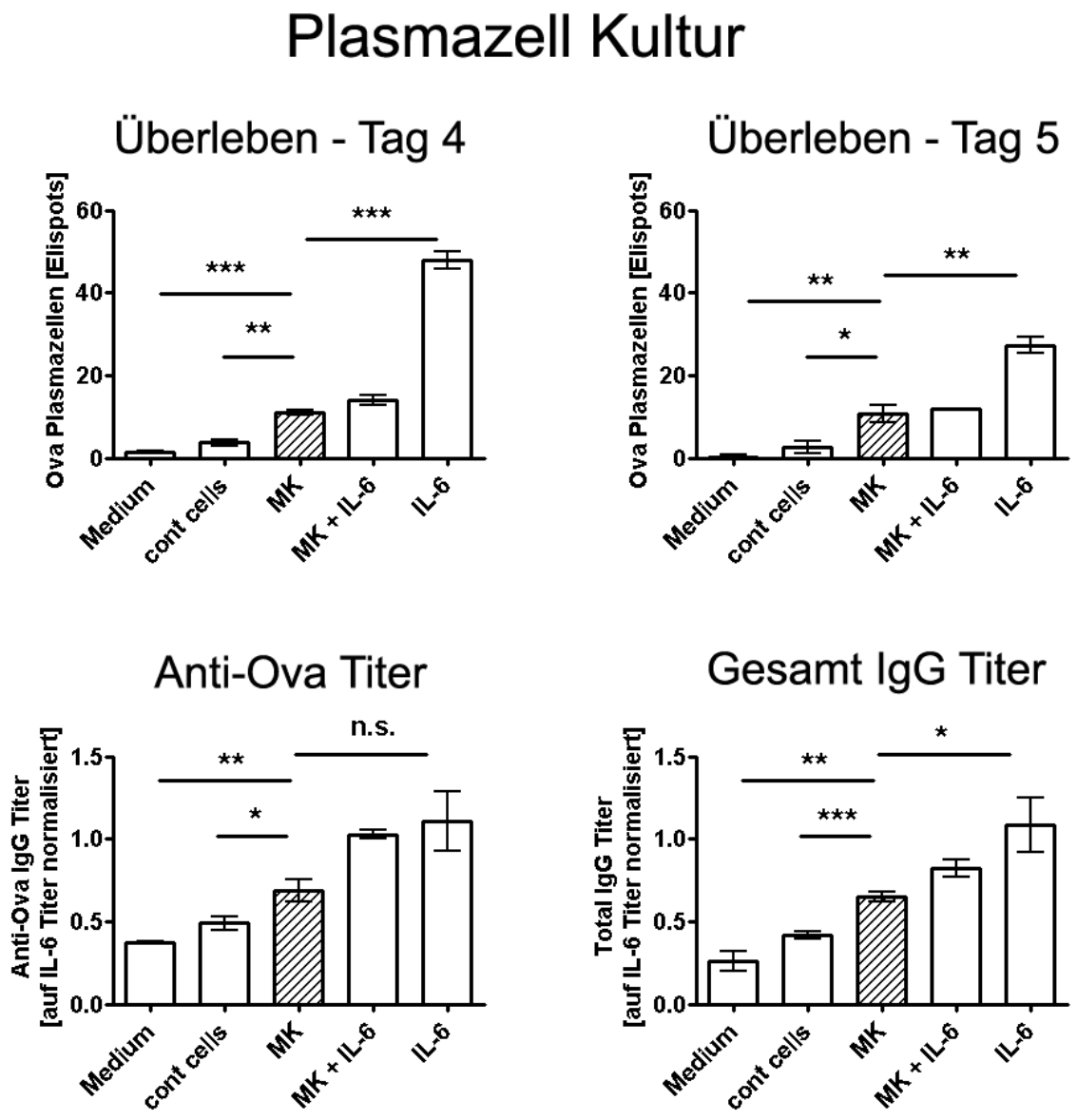



**Abb.30: Plasmazell und Megakaryozyten Kokultur.** Unreife Plasmazellen wurden vier Tage nach der Ova Sekundärimmunisierung aus der Milz gewonnen und durchflusszytometrisch in eine Kulturplatte sortiert und mit verschiedenen Zusätzen (Medium, IL-6 [10ng/ml], MK [CD61+ aus fetaler Leberkultur], Kontrollpopulation [CD61- aus fetaler Leberkultur] und MK + IL-6) kultiviert. Nach jeweils vier und fünf Tagen wurde die Anzahl überlebender Ova Plasmazellen und der Antikörpertiter bestimmt. Oben: Ova sensitiver ELISPOT -Daten der verschiedenen Kulturansätze an Tag 4 und 5 Unten: der Ova und IgG Antikörpertiter aus den Überständen der Kulturansätze.

## *3.6. Die Auswirkung einer Immunisierung auf die Megakaryopoese*

Die bisherigen Versuche hatten zum Ziel, die Auswirkungen auf das Plasmazellkompartiment durch eine Veränderung im Megakaryozytenkompartiment zu untersuchen. Ob es eine gegenseitige, also bidirektionale Regulation gibt, blieb unklar.

Um dieses zu überprüfen, sollte die Auswirkung einer Immunisierung auf das Megakaryozytenkompartiment untersucht werden. Dazu wurden Balb/c Mäuse in drei Versuchsgruppen unterteilt. Die Kontrollgruppe erhielt einen Stich mit der Kanüle in die Schwanzvene, jedoch keine Injektion, die zweite Gruppe erhielt PBS und dritte Gruppe Ova intravenös.

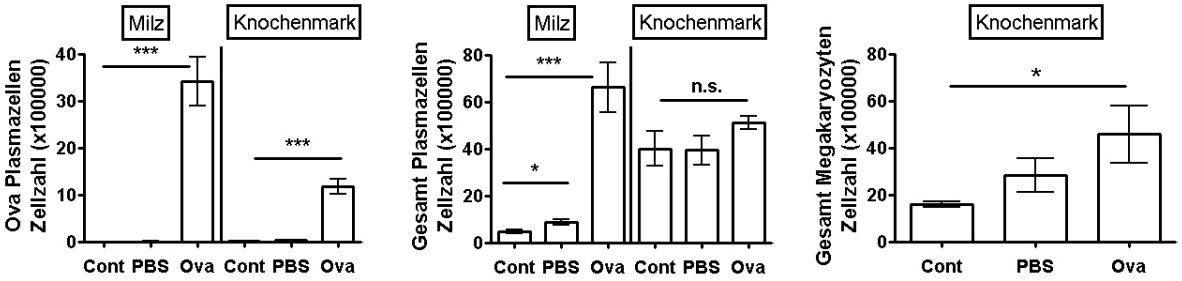



**Abb.31: Induktion der Megakaryopoese durch Immunisierung.** Primär immunisierte Balb/c Mäuse erhielten einen Stich mit der Kanüle in die Schwanzvene (cont), oder PBS (PBS) bzw. Ova (Ova) injiziert. Vier Tage später wurden die Anzahl von Gesamtplasmazellen, Ova Plasmazellen, sowie Gesamtmegakaryozyten gemessen.

# 4. Diskussion

## *4.1. Einleitung*

Das immunologische Gedächtnis ist eine Schlüsseleigenschaft der adaptiven Immunabwehr, da es dem Organismus ermöglicht, eine Invasion von Umweltpathogenen zu verhindern bzw. sie schneller und effektiver einzudämmen als beim ersten Kontakt. Der Teil des humoralen Gedächtnisses vermittelt seine Schutzfunktion, neben der schnellen Reaktivierbarkeit von Gedächtnis-B-Zellen, durch die Persistenz eines protektiven Antikörpertiters im Serum und die Sezernierung von Antikörpern in den Schleimhäuten. Daher ist der Aufbau des immunologischen Gedächtnisses und insbesondere des humoralen Gedächtnisses durch Schutzimpfungen wichtig für das Individuum und die Gesellschaft [82]. Ebenso hat die Notwendigkeit für die Entwicklung immer besserer Impfstoffe und Impfprotokolle nichts an ihrer Aktualität verloren, um auftretenden Epidemien/ Pandemien wie H1N1, SARS oder die jährliche Influenzawelle schnell und wirksam zu begegnen. Zusätzlich rücken Schutzimpfungen gegen krebsassoziierte Virusinfektionen wie die durch das Papilloma- oder Hepatititis-B-Virus immer mehr in den Fokus.

Weiterhin ist die Erforschung des humoralen Gedächtnisses neben der Optimierung von Impfstrategien auch für die Therapie humoral vermittelter Autoimmunerkrankungen wie SLE [26, 28] oder Immunthrombozytopenie (ITP) [30] von Interesse, da sich langlebige Plasmazellen einer konventionellen Therapie mit Immunsuppressiva entziehen [8, 31] und zu einem schnelleren Krankheitsrückfall führen.

Es stellt sich daher die Frage, welche Plasmazellen zu dem persistierenden Antikörpertiter im Blut beitragen.

Bereits seit den 1980er Jahren gab es Hinweise, dass es sowohl kurzlebige (HW drei Tage)- als auch langlebige (HW 3 Wochen) Plasmazellen gibt ([40]). Das Knochenmark wurde als Organ mit der größten Fraktion langlebiger Plasmazellen identifiziert, was in späteren Studien für systemisch entstandene Gedächtnisplasmazellen bestätigt werden konnte [17, 83].

Es wird spekuliert, ob intrinsische Faktoren, wie Affinitätsreifung [2] [42], Stärke der Blimp-1 Expression oder CD93 Expression über die Fähigkeit der Plasmazelle entscheiden, langlebig werden zu können [84-86]. Jedoch belegen alle bisherigen Untersuchungen, dass die Mikroumgebung im Organ von entscheidender Bedeutung für das Plasmazellüberleben ist

[4, 7, 40, 44, 87]. Das Schicksal der Plasmazelle hängt somit von den Signalen in der Mikroumgebung - der so genannten Überlebensnische - ab.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, das zelluläre Umfeld der Plasmazellen im Knochenmark zu untersuchen, was zur Identifizierung der Megakaryozyten als Teil der Plasmazellnische führte.

## *4.2. Diskussion der Methodik*

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Methoden und Techniken zum Einsatz, deren Vorzüge und Schwachstellen im Folgenden kurz besprochen werden sollen.

### 4.2.1. Verwendung der Maus als Modell für immunologische Studien

Die Maus ist ein geeignetes Modell, um spezifische immunologische Fragestellungen zu untersuchen. Insbesondere eignet sie sich, um das humorale Gedächtnis zu analysieren, da beim Menschen ebenfalls langlebige Plasmazellen nachgewiesen wurden [88, 89] und die Plasmazellantwort sich bei Mensch und Maus in Folge einer Sekundärimmunisierung (Tetanus / Ova) ähnelt [88, 90].

Die Durchführung der immunologischen Studien in der Maus hat verschiedene Vorteile. So können Gruppen genetisch identischer Tiere unter definierten Umweltbedingungen untersucht werden, welches die Feststellung signifikanter Einflüsse bestimmter Faktoren deutlich erleichtert. Die für meine Arbeit unerlässliche Unterscheidung langlebiger und neu gebildeter Plasmazellen durch den Einbau von BrdU in die DNA sich teilender Zellen, ist beim Menschen nicht durchführbar. Dies gilt ebenso für die zelluläre Untersuchung der Plasmazellnische im Verlauf einer Immunreaktion, da hierfür Gewebeproben aus Milz und Knochenmark an mehreren Tagen notwendig sind. Die Auswirkungen genetischer Defekte (c-Mpl -/-) auf das humorale Gedächtnis sind aufgrund der geringen Patientenverfügbarkeit von analogen Erkrankungen beim Menschen (CAMT) nicht durchführbar. Aufgrund von Medikationen bei Patienten, wie Antibiose bei bakteriellen Infektionen oder Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen verwischen bei der Analyse des Plasmazellkompartiments ebenfalls die Ursache-Wirkung Beziehungen.

Für die Mäuse in derselben Haltung ist die Infektionsgeschichte für alle Tiere vergleichbar, aufgrund der autoklavierten Nahrung und der gefilterten Luft in der für spezifische Pathogene freien Haltung (SPF) wahrscheinlich jedoch geringer als in der Wildbahn. Ein Vergleich der Dynamik des Plasmazellaustausches im Kompartiement zwischen Mensch und Maus ist

aufgrund des unterschiedlichen Pathogendrucks der Umwelt somit vermutlich limitiert. Unter Quarantänebedingungen ließen sich jedoch auch hier multiple Infektionen mit unterschiedlichen Bakterien- und Virenstämmen untersuchen.

### 4.2.2. BrdU Einbau zur Unterscheidung langlebiger und kurzlebiger Plasmazellen

Die BrdU Fütterung ist eine Methode zur Markierung proliferierender Zellen *in vivo*. Zellen, die BrdU während der Teilung in ihre DNA eingebaut haben und danach im Zellarrest verbleiben, sind positiv. Die in den Experimenten durchgeführte Fütterung von zwei bis drei Wochen vor der Analyse markiert demnach Plasmazellen, welche sich in diesem Zeitraum geteilt haben. BrdU- Plasmazellen haben in dieser Zeit nicht proliferiert und liegen deutlich über dem Durchschnittsalter kurzlebiger Plasmazellen von ca. drei Tagen und können somit als langlebig bezeichnet werden [40]. BrdU+ Plasmazellen sind eine Mischpopulation aus Zellen verschiedenen Alters (1-14d). Plasmazellen, die sich vielleicht am Anfang der BrdU Fütterung noch geteilt haben, aber dann in eine Überlebensnische einwandern konnten, zählen eigentlich zum Pool der langlebigen Plasmazellen. Da jedoch die Zahl BrdU+ Plasmazellen nach zwei Wochen BrdU Fütterung in naiven Mäusen nicht weiter ansteigt, es also zu keinem nennenswerten Austausch im langlebigen Plasmazellkompartiment kommt, [31] kann der Beitrag BrdU+ Plasmazellen zum langlebigen Kompartiment vernachlässigt werden.

### 4.2.3. Die Ova bzw. NP Immunisierung als Modell einer Immunreaktion

Ova und NP sind beides etablierte Antigene für die Immunisierung von Mäusen [90, 91]. Ova wird vorwiegend in Balb/c und NP in C57/BL6 Mäusen angewandt, da beide Stämme unterschiedlich gut auf diese Antigene ansprechen. So erreichen C57/BL6 Mäuse nur ein Fünftel bis ein Zehntel der Ova Gedächtnisplasmazellen von Balb/c Mäusen im Knochenmark (Vergleich Abb.20, 21 und 29). Dieses zeigt bereits, dass die Immunreaktion gegen gleiche Antigene in verschiedenen Individuen bzw. Mausstämmen zu unterschiedlichen Resultaten führen kann.

Ein weiterer Beleg für die unterschiedliche Reaktion zweier Individuen auf das identische Antigen wird durch die unterschiedliche Polarisierung zwischen einer Th1 und einer Th2 Antwort während der B-Zellaktivierung geliefert. So produzieren C57/BL6 Mäuse mehr Th1 Zytokine wie IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha als Balb/c Tiere [13]. Dieses führt zur Präferenz einer zellulären (Th1) bzw. humoralen (Th2) Immunantwort [12] und der

Generierung von Plasmazellen unterschiedlichen Ig Isotyps, IgG1 (Th2), sowie IgG2a und IgG2b (Th1) [92].

Entscheidend für die TH1/Th2 Polarisierung und die Stärke der Immunantwort ist die Wahl des Adjuvanz [16]. Das in den Experimenten eingesetzte Aluminiumhydroxid (Alum) induziert eine starke Th2 Antwort und ist das meistverwendete Adjuvanz bei der Impfung von Menschen [92-94]. Für die Primärimmunisierung ist die Gabe eines Adjuvanz oftmals essentiell, da es sonst zu keiner ausreichenden Aktivierung/ Stimulation des Immunsystems kommt [95]. Wenn bei der Sekundärimmunisierung ebenfalls Adjuvanz gegeben wird, kann das die Immunantwort ändern oder zumindest verlängern [96].

Dieses zeigt, wie entscheidend die Wahl des Antigens, des Adjuvanz und des Mausmodells für die Resultate ist. Es verdeutlicht aber auch, dass die gewählte Immunisierung immer nur einen Teil möglicher Immunantworten darstellen kann. Die von mir gewählten Parameter, wie Proteinantigen (Ova) bzw. Proteingekoppeltes Antigen (NP-KLH), Alum als Adjuvanz wie bei einer Tetanusimpfung sollen eine gute Übertragbarkeit der Daten aus dem Mausmodell auf den Menschen ermöglichen.

Weitere Faktoren wie die Applikationsroute und die Antigenkonzentration beeinflussen ebenfalls die Immunantwort [10, 12, 15, 16, 82, 97]. Hier gibt es einen Unterschied zwischen Mausmodell und der Impfung beim Menschen, da beim Menschen die Applikation meist intramuskulär (i.m.) erfolgt, wohingegen sich in der Maus die intraperitoneale (i.p.) und intravenöse (i.v.) Injektion als adäquate Alternative etabliert hat [95]. Die i.m. Injektion ist mit einer langsameren Resorption verbunden und lässt sich bei der Maus nur nach ausreichender Fixierung durchführen, andererseits ist die i.p. oder i.v. Impfung beim Menschen mit größeren Komplikationsrisiken wie z.B. Anaphylaxie, unbeabsichtigter Organpunktion oder Infektion der Bauchhöhle verbunden.

Entscheidend ist, dass eine Ova bzw. NP Immunisierung der Maus ähnlich wie die Tetanusimpfung beim Menschen zur Bildung langlebiger Plasmazellen führt.

### 4.2.4. Die c-Mpl defiziente Maus als Modell für beeinträchtigte Megakaryopoese

Das c-Mpl -/- Mausmodell mit dem defekten TPO-Rezeptor c-Mpl entspricht genetisch der Ursache für die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT) beim Menschen [98-100] . Da in einigen Fallstudien diese Erkrankung mit Hypogammaglobulinämie assoziiert ist [101, 102], eignet sich die c-Mpl -/- Maus, um mögliche Auswirkungen von CAMT auf das humorale Immunsystem und insbesondere die Persistenz des Antikörpertiters zu untersuchen.

Ebenso können die allgemeinen Zusammenhänge zwischen Megakaryozyten- und Plasmazellkompartiment in der c-Mpl-/- Maus untersucht werden. Hier ist jedoch zu beachten, dass im Vergleich zum gesunden Individuum durch die angeborene/ chronische Störung des Megakaryozytenkompartiments die potentielle Funktion der Megakaryozyten in der Plasmazellnische durch andere Zellen kompensiert worden sein könnte.

Bedingt durch die fehlenden c-Mpl Stimulation erreichen die Megakaryozyten in der c-Mpl-/- Maus auch keine Reifestadien mit hohem Ploidiegrad und bilden frühzeitig Thrombozyten [103]. Ebenfalls ist es möglich, dass aufgrund der Auswirkung von TPO auf die Reifung der Megakaryozyten, die fehlende c-Mpl Stimulation zu einer Veränderung der Zytokinproduktion in den Megakaryozyten führt. Somit ergibt sich die Möglichkeit, in der c-Mpl-/- Maus neben der Auswirkung der reduzierten Megakaryozytenzahl auch potentielle molekularbiologische Wirkmechanismen zu untersuchen.

Für die Übertragbarkeit der Mausdaten auf den Menschen sollte bedacht werden, dass die Störung des TPO - c-Mpl Signalweges bei Patienten mit CAMT unterschiedlich stark ausgeprägt ist [98], während bei der c-Mpl-/- Maus die Reduktion der Megakaryozyten 70-85% beträgt [66].

### 4.2.5. Die wiederholte TPO Applikation zur Stimulation der Megakaryopoese

Die TPO Applikation ermöglicht eine Manipulation des Megakaryozytenkompartiments [68, 70] und so der mutmaßlichen Plasmazellnische in der Wildtypmaus. Dadurch sollten Erkenntnisse über die Verknüpfung von Megakaryozyten- und Plasmazellkompartiment gewonnen werden.

Die fünftägige Injektion mit niedriger Dosis (0,01µg/kg) induziert eine schwache, aber mehrtägige Stimulation der Megakaryopoese, welche im Peak maximal eine Verdopplung der Megakaryozytenzahl zur Folge hat (siehe 3.4.1.). Diese Art der Stimulation ermöglicht es, die Beziehungen zwischen Megakaryopoese und Plasmazellüberleben unter annähernd physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Zukünftig könnten aber auch Studien mit Einzeldosisinjektionen und hoher TPO Konzentration (25-250µg/kg) [70]) interessant werden. Die Injektion von PBS in die Kontrollmäuse führt möglicherweise durch eine Gewebeverletzung und Aktivierung des Immunsystems ebenfalls zu einer Induktion der Megakaryopoese (siehe 3.4.1.), wobei letzteres aufgrund der geringen Stärke vernachlässigbar ist.

## *4.3. Diskussion der Ergebnisse*

### 4.3.1. Das Plasmazellkompartiment muss sich entwickeln

Meine Untersuchungen des Plasmazellkompartiments im Knochenmark haben ergeben, dass der Anteil langlebiger Plasmazellen bis zum vierten Monat deutlich zunimmt und ein stabiles Plateau zwischen 60-70% erreicht. Die Gesamtplasmazellzahl steigt noch bis zum fünften Monat weiter an, wo auch sie einen stabilen Wert erreicht.

Das Gedächtnisplasmazellkompartiment im Knochenmark muss sich somit erst entwickeln.

Haaijman et al. beschreiben im Serum der Maus einen Anstieg des Antikörpertiters bis zum sechsten Monat mit späterer Plateaubildung [104] und auch beim Menschen wurde eine Entwicklungsphase des humoralen Gedächtnisses über den Antikörpertiter im Serum gezeigt. So findet nach der Abnahme maternaler Antikörper im Blut des Neugeborenen, die für seinen ersten Schutz sorgen, ein Anstieg kindlicher Antikörper statt, mit Immunglobulin G als dominante Antikörperklasse [83]. Dieser Anstieg ist besonders stark in den ersten beiden Lebensjahren, setzt sich aber während der gesamten Kindheit fort [83].

Da die von Haaijman et al. beschriebene proportionale Verteilung zwischen IgG, IgA und IgM im Mausserum der des Menschen entspricht [83, 104] und in beiden Spezies der Titer gegen eine Obergrenze konvergiert, eignet sich die Maus als Modell, um die Entwicklung des Kurz- und Langlebigen Plasmazellkompartiments im Knochenmark zu untersuchen. Der Serumantikörpertiter ist somit vergleichbar zwischen Mensch und Maus, jedoch unterscheidet sich die Kinetik. So erreicht der Titer in der Maus das Plateau ab dem fünften Monat und beim Menschen mit acht Jahren. Nach absoluter Zeitrechnung betrachtet, wird

das Plateau in der Maus schneller erreicht, relativ gesehen jedoch beim Mensch. Dieses ergibt sich aus dem schnelleren Lebenszyklus von Mäusen mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ca. 2 Jahren. Die fünf Mausmonate entsprechen somit einem Menschenalter von 20 bis 25 Jahren. Die scheinbare schnellere relative Entwicklung des Plasmazellkompartiment beim Menschen (bereits mit ca. 8 Jahren), erklärt sich möglicherweise durch Schutzimpfungen sowie durch eine Vielzahl in der frühen Kindheit durchgemachter Infektionen. Hingegen ist die Infektionsrate bei Labormäusen unter SPF Bedingungen unklar. Ebenso ist die jährliche Infektionsrate nicht antiproportional mit der Lebenserwartung verknüpft. Daraus resultiert, dass eine fünf Monate alte Maus weniger Infektionen hatte als ein 20-jähriger Mensch.

Der Antikörpertiter im Serum ist sicher eine geeignete Methode, um die Persistenz des humoralen Immunsystems zu untersuchen. Andererseits spiegelt der Serumantikörpertiter nicht direkt das Plasmazellkompartiment im Knochenmark wider, da IgG eine längere Halbwertszeit als IgM und IgA hat [105] und Plasmazellen aus verschiedenen Organen zum Serumtiter beitragen [106]. Ebenso wird der Titer als Volumenkonzentration dargestellt, wodurch die Zunahme des Blutvolumens und somit die Zunahme der Gesamtmenge an Antikörpern während der kindlichen Wachstumsphase unberücksichtigt bleibt. Bei meinen Analysen des Knochenmarks entspräche dieses daher eher der Plasmazellfrequenz als der Plasmazellzahl.

Eine weitere Komponente, die den Serumtiter beeinflusst, ist der Fcn-Rezeptor, der an der Oberfläche von Blutgefäßen sitzt, Antikörper bindet und so wie eine Art Puffer auf die Antikörperkonzentration wirkt [107].

Interessanterweise korreliert die Kinetik der Serum Antikörper [104] dennoch sehr gut mit der Plasmazellkinetik im Knochenmark (3.1.2.). Beide zeigen eine Plateaubildung ab dem fünften bzw. sechsten Monat. Ab dem vierten Monat hatte das langlebige Kompartiment mit 60-70% bereits einen stabilen relativen Anteil erreicht, das Gesamtkompartiment stieg jedoch noch bis zum fünften Monat an (3.1.2.). Ebenso findet Haaijman einen fortgesetzten Anstieg für IgG1 und IgG3 Antikörper im Serum, ähnlich wie ich eine anhaltende Zuname von IgG Plasmazellen im Knochenmark feststelle konnte (3.1.2.).

Es scheint jedoch eine Diskrepanz zwischen Plasmazellzahlen und Serumkonzentrationen zu geben. Im Menschen [83] aber auch in der Maus [104, 108] ist IgG von Beginn die dominante Immunglobulinklasse im Serum, während es im Plasmazellkompartiment der Maus zu einer Verschiebung der dominanten Immunglobulinklasse kommt (3.1.2.). Diese Diskrepanz resultiert vermutlich aus den oben besprochenen Unterschieden zwischen Antikörpertiter und Plasmazellzahlen im Knochenmark.

In den von mir untersuchten Mäusen wurde das Knochenmark zuerst von IgA Plasmazellen besiedelt. Und da IgA die dominante Ig Klasse bei mukosalen Immunreaktionen ist, sind diese frühen Plasmazellen im Knochenmark möglicherweise durch mukosalen Antigenkontakt entstanden und aus der Mukosa rezirkuliert [33, 109]. Später fanden sich immer mehr IgM und vor allem IgM-/IgA- Plasmazellen im Knochenmark. Die letzteren sind vermutlich IgG Plasmazellen, da IgE und IgD Plasmazellen nur einen verschwindenden Anteil des Plasmazellkompartiments im Knochenmark ausmachen [83, 110].

Entscheidend für die Entwicklung des Plasmazellkompartiments bei Mensch und Maus ist jedoch, dass es bei Beiden früher oder später zu einer Wachstumslimitierung kommt. Das heißt, in beiden Spezies gibt es eine Obergrenze für das humorale Gedächtnis. Der Gesamtantikörpertiter steigt bei beiden Spezies nicht mehr [83, 104], und auch die Anzahl der Knochenmarkplasmazellen in der Maus nimmt nicht mehr zu (3.1.2.).

Dieses spricht entweder für das Vorhandensein von inhibierenden Feedbackmechanismen, wie z.B. über FcγIIB-Rezeptor induzierte Apoptose auf Plasmazellen [23] oder eine beschränkte Kapazität der Überlebensnischen. Als möglichen limitierenden Faktor beschreiben Belnoue und Kollegen die APRIL Konzentration im Knochenmark [111], da die Stimulation des APRIL-Liganden BCMA essentiell für das Plasmazellüberleben ist [51]. So zeigen sie eine ansteigende APRIL Konzentration im Knochenmark während der ersten vier Lebenswochen, was mit dem Anstieg des Plasmazellkompartiments korreliert. Ebenso ermöglichen APRIL produzierende Neutrophile die Etablierung einer Plasmazellnische in der Mukosa [79].

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die von mir untersuchte Entwicklung des Plasmazellkompartiments mit der für die Maus beschriebenen Kinetik des Antikörpertiters korreliert, es jedoch Unterschiede in der Beteiligung der verschiedenen Immunglobulinklassen am Titer und am Plasmazellkompartiment geben könnte, welche aus den Inproportionalitäten beider Werte resultieren. Die Untersuchungen mittels BrdU Einbau ergaben, dass sich das Verhältnis zwischen langlebigen und neu gebildeten Plasmazellen von 1,5 zu 1 einstellt, bevor die maximale Ausdehnung des Plasmazellkompartiments erreicht ist.

### 4.3.2. Die Plasmazellen im Knochenmark sitzen in der vaskulären Nische assoziiert mit SDF-1 positiven Zellen und ein Teil kolokalisiert mit Megakaryozyten

Die Plasmazellen unterschiedlichen Isotyps sind ungleich mit dem Endothelium assoziiert, aufgrund der starken Vaskularisierung des Knochenmarks sind sie jedoch nie weiter als 30µm von einem Gefäß entfernt (siehe Abb. 7). Daher befinden sie sich makroskopisch betrachtet in der vaskulären Nische [112].

Wie von Tokoyoda et al. beschrieben [55] und auch von mir beobachtet, sind nahezu alle Plasmazellen mit SDF-1 Signalen assoziiert. Da jedoch nur ca. 60% der Plasmazellen langlebig sind (siehe Abb. 4, 28c), kann dieser Kontakt nicht hinreichend sein, um das Überleben zu sichern. Daraus ergeben sich die Möglichkeiten, dass die SDF-1+ Zellen eine heterogene Population darstellen und nur einer oder manche Zellen das Plasmazellüberleben sichern können oder das ein dritter Zelltyp an der Plasmazellnische beteiligt ist. Für die erste Möglichkeit gibt es bisher keine Bestätigung, da einer der Hauptproduzenten von SDF-1 im Knochenmark retikuläre Fibroblasten sind, die sich nicht für weitere Analysen mit dem Durchflusszytometer sortieren ließen. Andererseits konnten SDF-1+ Fibroblasten Plasmazellen in Kokultur für maximal vier Wochen am Leben erhalten [49]. Auch hier bleiben wieder die Möglichkeiten offen, dass die falsche SDF-1+ Zelle verwendet wurde, dass kostimulatorische Signale fehlen oder das ein dritter Zelltyp an der Nische beteiligt ist. Auf die Möglichkeit, dass eine dritte Zelle an der Nische beteiligt ist, könnte hindeuten, dass ca. 30% der Plasmazellen nach dem Austritt aus dem Gefäß mit Megakaryozyten kolokalisierten (siehe 3.2.1.). Allerdings deckt sich diese Frequenz nicht mit den 60% langlebigen Plasmazellen im Knochenmark und auch nicht mit den Ova Gedächtnisplasmazellen, bei denen nahezu alle Zellen langlebig sind, auch wenn man berücksichtigt, dass diese Statistik aus 2D Schnitten gewonnen wurde und die eigentliche Kolokalisationsfrequenz etwas höher liegen könnte.

Um diese Diskrepanz zu erklären, gibt es mehrere Interpretationsmöglichkeiten. Zum einem könnten Megakaryozyten keine Rolle in der Plasmazellnische spielen und nur zufällig mit Plasmazellen kolokalisiert sein. Zum anderen könnten die Megakaryozyten nur für bestimmte Plasmazellen eine Nische bilden und in alternativen Plasmazellnischen durch andere Zellen ersetzt worden sein. Letztlich bleibt noch die Möglichkeit, dass der Plasmazell-Megakaryozyten Kontakt nicht statisch sondern dynamisch ist. Die erste These, dass Megakaryozyten keine Rolle für die Plasmazellnische spielen, kann aufgrund der im folgenden besprochenen Experimente widerlegt werden. Zur Klärung, ob die Megakaryozyten eine spezifische Nische für einen bestimmten Teil der Plasmazellen bilden, reicht die Datenlage leider nicht aus. Dennoch deuten einige Resultate darauf hin, dass

Megakaryozyten einen entscheidenden Beitrag für die Plasmazellnische liefern. So war es möglich, durch eine TPO Behandlung sowohl das Megakaryozyten- als auch das Plasmazellkompartiment transient zu erhöhen (siehe Abb. 24 und 29). Da TPO nicht direkt auf Plasmazellen wirkt (siehe Abb. 26) und die Anzahl an B-Zellen, Monozyten, Stamm- und Vorläuferzellen durch die TPO Behandlung nicht steigt (siehe Abb. 27), liegt die Vermutung nahe, das ein Anstieg der Megakaryozyten die Akkumulation der Plasmazellen im Knochenmark verstärkt. Auf eine Spezifität der „megakaryozytären“ Nische deuten auch die unterschiedlichen Kolokalisationsfrequenzen der verschiedenen Isotypklassen hin (siehe Abb. 13). Ob der molekulare Beitrag, den die Megakaryozyten zur Nische beisteuern, essentiell ist, wird später diskutiert (siehe 4.3.4.), die Megakaryozyten selbst scheinen es jedoch nicht zu sein. So sind in den in den c-Mpl-/- Tieren die Megakaryozytenzahlen auf 30-40% und die der Megakaryozyten mit hohem Ploidiegrad sogar auf 15-20% reduziert [66], während die Zahl der langlebigen Plasmazellen nur auf ca. 50% reduziert ist. Gleichzeitig beträgt in diesen Tieren die Kolokalisationsfrequenz zwischen Megakaryozyten und Plasmazellen nur 10%, was zusätzlich für alternative Nischen und eine Insuffizienz der verbleibende Megakaryozyten in den c-Mpl-/- Mäusen spricht.

Die Tatsache, dass in den Experimenten mit TPO nur ein Teil der langlebigen pre-existenten Plasmazellen durch den erhöhten Austausch im Megakaryozytenkompartiment eliminiert wurde, während die sehr reifen polyploiden Megakaryozyten stark dezimiert wurden, spricht für die Theorie, dass Megakaryozyten entweder nur einen Teil der Plasmazellen unterstützen oder dass der Plasmazell-Megakaryozyt Kontakt nicht statisch, sondern dynamisch ist. Das heißt, es wurden entweder nur die Plasmazellen eliminiert, die in einer Megakaryozyten bestückten Nische saßen, oder die neu gebildeten Megakaryozyten waren nur in der Lage, bei 50% der langlebigen Plasmazellen die alten Megakaryozyten als Nischenkomponente zu ersetzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Plasmazellen in der vaskulären/ perivaskulären Nische sitzen und Kontakt zu retikulären SDF-1+, Fibronektin+ Zellen haben. Da jedoch nur ein Teil der Plasmazellen langlebig ist, sichern die SDF-1+ Zellen alleine nicht das Überleben der Plasmazelle. Die Gesamtplasmazellen sind zu ca. 30% mit Megakaryozyten assoziiert, wobei die Kolokalisationsfrequenz zwischen Plasmazellen und Megakaryozyten bei klassengewechselten IgA und IgG Plasmazellen höher (30-40%) ist als bei IgM Plasmazellen (10%). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass IgG die dominante Ig Klasse des humoralen Gedächtnisses darstellt [83] und mehr als die Hälfte der IgG und IgA Plasmazellen im Knochenmark langlebig sind, während IgM Plasmazellen generell eher eine kurze Lebensspanne haben [40].

### 4.3.3. Retikuläre SDF-1 positive Zellen bilden das Gerüst der Plasmazellnische

Die histologischen Untersuchungen ergaben, dass die Plasmazellen mit retikulären Fibronektin+ Zellen assoziiert sind. Diese retikulären Fibroblasten durchspannen das Knochenmark wie ein Gerüst, an dem sich hämatopoetische Zellen und auch reife Leukozyten halten und bewegen können [47]. Die Orientierung in diesem Gerüst findet mittels Chemokinen statt. So sind hämatopoetische Stammzellen hauptsächlich nahe dem Endost lokalisiert, während die Zellen im Verlaufe ihrer Differenzierung und Reifung immer näher an die Gefäße migrieren [113]. Während ihrer Entwicklung hat die B-Zelle Kontakt mit verschiedenen Fibroblasten (z.B. SDF-1+ oder IL-7+), die ihr die benötigten Entwicklungssignale im jeweiligen Entwicklungsstadium geben [47]. Tritt hierbei eine Störung auf, ist die Zelle unzureichend ausgereift oder wird apoptotisch [47].

Die Fibroblasten, die mesenchymalen Ursprungs sind, werden daher häufig mit dem Begriff Stromazelle gleichgesetzt. Dieses vernachlässigt jedoch alle weiteren Zellen, die zum Überleben anderer Zellen beitragen. Insbesondere, da neuere Untersuchungen zeigen, dass auch Leukozyten [47, 114] und auch mehrere Zellen an der Nischenbildung beteiligt sein können [45].

Chemokine spielen nicht nur eine Rolle während der Hämatopoese und dem Verlassen des Knochenmarks, sondern auch bei der Rezirkulation reifer Leukozyten wie Plasmazellen [47]. SDF-1+ Fibroblasten umspannen die Knochenmarkkapillare und ermöglichen so wahrscheinlich den einwandernden Plasmazellen die Lokalisation in der vaskulären Nische. Für Plasmazellen ist SDF-1+ jedoch nicht essentiell, da sowohl SDF-1-/- als auch CXCR4-/- Mäuse lediglich eine verlangsamte Plasmazellakkumulation im Knochenmark zeigen [33, 37, 48].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Fibroblasten ein Gerüst im Knochenmark bilden, ein Teil SDF-1 produziert und über dessen Gradienten die Migration und Lokalisation der Plasmazellen in die vaskuläre Nische gesteuert wird. Der SDF-1+ Fibroblast alleine vermag jedoch nicht das Überleben der Plasmazelle zu sichern, aber möglicherweise fungiert er als Treffpunkt von CXCR4+ Zellen. Wenn diese Zellen, wie z.B. die Megakaryozyten, Plasmazellüberlebensfaktoren produzieren, könnten sie eine weitere Komponente der Plasmazellnische darstellen.

### 4.3.4. Megakaryozyten produzieren Plasmazellüberlebensfaktoren im Knochenmark und sind eine Hauptquelle für IL-6

Wenn Plasmazellen aus ihrer Nische entfernt und in Kultur genommen werden, sterben sie innerhalb von zwei bis drei Tagen. Auch durch das Zufügen von Überlebensfaktoren wie APRIL oder IL-6 lässt sich das Überleben nur auf ca. eine Woche verlängern, wobei man hier teilweise synergistische Effekte beobachten konnte [50, 51]. Die Plasmazellüberlebensnische im Knochenmark ist daher vermutlich von komplexer Natur und stellt mehre Faktoren bereit. Die Resultate aus den histologischen, molekularbiologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen belegen, dass Megakaryozyten APRIL und SDF-1 produzieren und für IL-6 eine Hauptquelle im Knochenmark sind (siehe Abb. 16, 17). Die Megakaryozyten stellen in Wildtypmäusen ein Drittel aller IL-6 Produzenten im Knochenmark dar und bei einer Populationsgröße von 0,3% scheint die IL-6 Produktion sehr distinkt zu sein. In der c-Mpl-/- Maus deuten allerdings die histologischen Analysen darauf hin, dass die MKs diese prominente Rolle für die IL-6 Produktion verloren haben (siehe Abb. 23). Interessanterweise sind die Plasmazellen in diesen Knock-out Tieren mit anderen IL-6+ Zellen, möglicherweise Endothelzellen, assoziiert (siehe Abb. 22, 23), und in diesem Zusammenhang ist es aufschlussreich, dass sich auch eine Verschiebung der Kolokalisation von Megakaryozyten zu den Endothelzellen zeigt (siehe 3.2.5. und 3.3.3.). IL-6 wirkt synergistisch mit BAFF und CD44 Stimulation [50, 51] und scheint *in vivo* vor allem mit klassengewechselten Plasmazellen assoziiert zu sein [89]. Unter anderem induziert IL-6 die Expression von prdm1/ Blimp-1 und xbp1 in Plasmazellen [4], welches beides entscheidende Plasmazelltranskriptionsfaktoren und maßgeblich für das intrinsische Potential für Langlebigkeit verantwortlich sind [86].

Interleukin-6 bzw. gp130 vermittelte Signale könnten somit den Schlüsselmechanismus der Plasmazellnische darstellen. Die Notwendigkeit und somit die Wichtigkeit der gp130 vermittelten Signale für das Plasmazellüberleben ließen sich bisher nicht überprüfen, da ein gp130 Knock-out bereits kurz nach der Geburt letal ist [53]. IL-6 selbst ist redundant, und somit ist es nicht überraschend, dass IL-6-/- Mäuse zwar eine gestörte Plasmazellakkumulation, jedoch keinen Langzeiteffekt auf das Plasmazellkompartiment zeigen [50]. Anders ist es für die BCMA Stimulation, welche als essentiell nachgewiesen werden konnte [51]. Jedoch wird der für die Langlebigkeit entscheidende BCMA Ligand APRIL [111] von der Plasmazelle selbst gebildet [115]. Deshalb bleibt es unklar, ob von der Umgebung produziertes APRIL tatsächlich essentiell ist, auch wenn es ähnlich wie IL-6 *in vitro* einen positiven Effekt auf das Plasmazellüberleben hat [51].

Somit leisten Megakaryozyten durch die Produktion von APRIL, SDF-1 und besonders IL-6 einen entscheidenden Beitrag zur Plasmazellnische. Wie sich die Manipulation des Megakaryozytenkompartiments auf die Plasmazellen auswirkt, wird im Folgenden diskutiert.

### 4.3.5. Die c-Mpl -/- Maus hat ein kleineres Plasmazellkompartiment und die schnelle Akkumulation von Plasmazellen in Folge eines wiederholten Antigenkontaktes ist gestört.

Der TPO-Rezeptor c-Mpl wird auf hämatopoetischen Stammzellen und Zellen der Megakaryozytenlinie exprimiert [66, 69]. Daraus resultiert, dass c-Mpl-/- Mäuse ein deutlich reduziertes Megakaryozytenkompartiment und weniger Stamm- und Vorläuferzellen, jedoch eine normale Anzahl reifer Leukozyten haben [66, 69].

Die Untersuchung des Plasmazellkompartiments mit dreiwöchiger BrdU Fütterung, ergab eine geringere Anzahl an Plasmazellen und insbesondere langlebiger Plasmazellen (BrdU-) im Knochenmark von c-Mpl-/- Mäusen im Vergleich zu den Wildtyptieren (3.3.1.). Die Anzahl der Plasmazellvorläufer - der B-Lymphozyten - ist weder im Knochenmark noch in der Milz von c-Mpl-/- Mäusen verändert [66], und auch die B-Zell Aktivierung und Plasmazellbildung in der Milz ist nicht gestört (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für das dauerhaft reduzierte Plasmazellkompartiment ist daher eine Verringerung der Plasmazellnischen im Knochenmark.

Um dieses zu überprüfen, wurden Mäuse sowohl mit NP als auch mit Ova immunisiert, da deren Plasmazellkinetik in Wildtyptieren beschrieben [36] und von mir im Zusammenhang mit Megakaryozyten bereits untersucht wurde (3.2.1. und 3.2.3.).

Die Primär- und Sekundärimmunisierungen mit NP zeigen, dass die frühe Akkumulation der antigenspezifischen Plasmazellen im Knochenmark, jedoch nicht die Plasmazellformierung in der Milz, gestört sind (Daten nicht gezeigt). Zum späteren Analysezeitpunkt (primär d28 und sekundär d21 nach Immunisierung) waren jedoch keine Unterschiede mehr für NP spezifische Plasmazellen im Knochenmark von c-Mpl-/- und Wildtyptieren feststellbar. Hier war ein stärkeres Abfallen der NP-Plasmazellpopulation im Knochenmark der Wildtyptiere zu beobachten (WT -66%, c-Mpl-/- -50%). Dieser Effekt trat ebenfalls bei Immunisierungen mit Ova-Alum und reduzierter Ova Dosis (30 statt 100µg Ova) auf.

Die Ova Dosis wurde reduziert und Alum als Adjuvanz verwendet, da beim ersten Experiment mit Ova Sekundärimmunisierung sechs von neun c-Mpl-/- Mäusen starben, was eine Wiederholung des Versuchs mit gleichem Immunisierungsprotokoll aus ethischen und

experimentellen Gründen nicht zuließ. Alum bewirkt, dass das Antigen nicht direkt in die Peripherie gelangt, wo es möglicherweise eine Anaphylaxisreaktion über die durch die Primärimmunisierung sensibilisierten Granulozyten induziert. Es ermöglicht stattdessen, dass das Antigen von peritonealen Monozyten aufgenommen wird und eine starke Th2 Immunantwort induziert [95]. Dieses führt wiederum zu einer verlängerten Immunantwort und keiner reinen Gedächtnis-B-Zell Aktivierung, wie durch das Antigen alleine. Somit findet an Tag 21 weiterhin eine Generierung von jungen unreifen Plasmazellen (B220+) in der Milz statt. Dafür belegt die fast vollständige Abnahme der B220+ Ova Plasmazellen an Tag 43 in Milz und Knochenmark das Ende der Immunreaktion.

Bei der Sekundärimmunisierung mit Adjuvanz (siehe 3.3.2.) war die Ova Plasmazellzahl im Knochenmark der c-Mpl-/- Mäuse anders als ohne Adjuvanz auch zum späten Zeitpunkt signifikant reduziert. Dieser Unterschied war jedoch nur schwach ausgeprägt, und es ist zu vermuten, dass das Ova/ NP Gedächtnisplasmazellkompartiment in den c-Mpl-/- Mäusen nicht maßgeblich gestört ist. Allerdings zeigte sich auch hier wieder eine stärkere Abnahme der Ova Plasmazellen in den Wildtyptieren im Vergleich zu den Knock-outs. Somit scheint besonders die Akkumulation zu einem frühen Zeitpunkt betroffen zu sein.

Wie erklärt sich also, dass vor allem die frühe Akkumulation der Plasmazellen im Knochenmark gestört ist? Das antigenspezifische Plasmazellkompartiment ist in den Wildtyptieren anfangs sehr viel größer als in den c-Mpl-/- Tieren, fällt dann aber auch wesentlich stärker ab, während es in den Knock-out Tieren lediglich auf die Hälfte reduziert wird. Megakaryozyten könnten also den Eintritt und die Etablierung der Plasmazelle im Knochenmark beeinflussen. Bei der Untersuchung der Migration von Ova Plasmazellen ins Knochenmark waren sie von Anfang an mit Megakaryozyten kolokalisiert, wobei das von den Megakaryozyten produzierte Zytokin IL-6 dabei eine Rolle spielen könnte. Da IL-6 auch ein Proliferationsfaktor ist, könnte die im Vergleich zum Wildtyp anfänglich deutlich geringere Plasmazellzahl im Knochenmark auf einen Wirkmechanismus der Megakaryozyten über IL-6 hindeuten. So findet man eine vergleichbare Verlangsamung der Plasmazellakkumulation in IL-6-/- Mäusen [50].

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit liefert die später einsetzende Feedbackhemmung des Immunsystems. Da zu Beginn weniger Plasmazellen in c-Mpl-/- Tieren vorhanden sind, ist auch der Antikörpertiter im Serum zunächst geringer. Dies bewirkt, dass die durch den Fcγ-Rezeptor IIb vermittelte Inhibierung der B-Zell Antwort [116] später einsetzt. Ebenso wird durch den geringeren Antikörpertiter weniger Antigen durch Antikörper maskiert und kann somit mehr B-Zellen aktivieren [25, 117].

Weiterhin könnte megakaryozytäres SDF-1 eine Rolle bei der Einwanderung und der Direktion in die Überlebensnische spielen, denn ähnlich wie die c-Mpl-/- Maus zeigt auch die CXCR4-/- Maus eine verlängerte Plasmazellformierung nach der Immunisierung [54] Ebenso könnte die geringe Kolokalisation von Plasmazellen und Megakaryozyten in der c-Mpl-/- Maus (10% statt 30%) auf den Einfluss megakaryozytäres SDF-1 bei der Einwanderung von Plasmazellen ins Knochenmark hindeuten.

Megakaryozyten zeigen in der c-Mpl -/- Maus neben einer geringeren Zellzahl möglicherweise auch funktionelle Defekte und sind somit in diesem Mausmodell eventuell kein Bestandteil der Plasmazellnische. Die vergleichbaren Ova Gedächtnisplasmazellzahlen in Wildtyp und c-Mpl-/- Maus könnten diese Vermutung unterstützen.

Andererseits ist in der c-Mpl-/- Maus das Plasmazellkompartiment und insbesondere das langlebige Plasmazellkompartiment reduziert, was bedeuten könnte, dass die Plasmazellen aus der megakaryozytären Nische fehlen, oder dass der Verlust dieser Nische nur teilweise durch andere Zellen kompensiert werden kann. Da die Insuffizienz in der Megakaryozytenlinie durch einen genetischen Defekt bedingt ist, wäre es möglich, dass andere Zellen während der Entwicklung des Plasmazellkompartiments die Funktion von Megakaryozyten übernommen haben. So konnte in Kulturversuchen gezeigt werden, dass Osteoclasten das Überleben von Plasmazellen bis zu 12 Tagen stimulieren konnten [118]. Dabei stellte sich heraus, dass der Zell-Zell Kontakt absolut notwendig war. Ob diese Zellen jedoch *in vivo* mit Plasmazellen kolokalisiert sind, muss noch geklärt werden. Ebenso, ob es einen weiteren essentiellen Faktor gibt, den die Zellen den Plasmazellen zum Überleben liefern, denn APRIL produzieren verschiedenste Zellen im Knochenmark (siehe 3.2.5.) darunter auch die Plasmazellen selbst [115]. Zudem hat sich in der oben genannten Osteclastenstudie gezeigt, dass die unterstützende Funktion der Osteoclasten nicht über eine BCMA Stimulation vermittelt wird.

Es bleibt jedoch die Frage, warum das Ova Gedächtnisplasmazellkompartiment, anders als das restliche langlebige Plasmazellkompartiment, in den c-Mpl-/- Mäusen im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert ist. Bei der Analyse des Knochenmarks von c-Mpl -/- Mäusen hatte sich gezeigt, dass IgA Plasmazellen besonders stark reduziert waren, IgG nur leicht und IgM Plasmazellen überhaupt nicht (siehe Abb. 18). Dieses Ergebnis deckt sich teilweise mit der früheren Beobachtung in Wildtyptieren, bei denen IgA und IgG Plasmazellen besonders häufig (IgA ~40%, IgG ~30%) und IgM Plasmazellen deutlich seltener (~10%) mit Megakaryozyten assoziiert waren (siehe Abb. 30.). In der c-Mpl-/- Maus kolokalisieren die Plasmazellen öfter mit dem Endothelium (50%) als mit Megakaryozyten (10%), was wieder darauf hindeutet, dass die unterschiedlichen Plasmazellen auch unterschiedliche Nischen benötigen bzw. bevorzugen. Weiterhin legen die oben genannten Daten die Vermutung

nahe, das IgG Plasmazellen, die im Wildtyp auch mit Endothelzellen stärker assoziiert waren (30%) als IgA Plasmazellen (10%), besser den Verlust der megakaryozytären Nische kompensieren können. Die Verschiebung der Plasmazellen zu einer stärkeren Kolokalisation mit Endothelzellen, welche unter anderem eine IL-6 Quelle sind, könnte eine mögliche Kompensation darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass c-Mpl-/- Mäuse ein kleineres Plasmazellkompartiment als Wildtyptiere haben, und die Reduktion stärker klassengewechselte IgA und IgG Plasmazellen betrifft als IgM Plasmazellen sowie Langlebige stärker als Kurzlebige. Ebenso ist die Akkumulation von antigenspezifischen Plasmazellen in der c-Mpl-/- Maus ähnlich wie bei IL-6-/- oder SDF-1-/- Tieren verlangsamt. Erste histologische Analysen deuten auch darauf hin, dass Megakaryozyten in c-Mpl-/- Tieren keine dominante IL-6 Quelle wie in den Wildtyptieren sind, was zusammengenommen auf eine potentielle Rolle von megakaryozytärem IL-6 für die Plasmazellnische hindeutet.

### 4.3.6. Die TPO Behandlung führt zu einer Depletion pre-existenter langlebiger Plasmazellen und ermöglicht eine verbesserte Besiedlung des Knochenmarks mit neu gebildeten Plasmazellen.

Eine TPO Behandlung induziert die Megakaryopoese und führt so zu einer Neubildung und einer verlängerten Reifung und Stabilisierung der vorhandenen Megakaryozyten [68, 70, 119]. Nach Absetzten von TPO stellt sich das homöopathische Gleichgewicht durch Abbau der ältesten Megakaryozyten wieder ein (siehe Abb. 24) [70]. Auf diese Weise kommt es nach einer zeitlich begrenzten Erhöhung letztendlich zum Austausch des Megakaryozytenkompartiments (3.4.1.). Die Untersuchungen des Plasmazellkompartiments im Zusammenhang mit der TPO Behandlung haben gezeigt, dass die Plasmazellkinetik der Megakaryozytenkinetik folgt (3.4.1. und 3.4.6.). So findet eine verstärkte Akkumulation neu gebildeter Plasmazellen (BrdU+) im Knochenmark behandelter Tiere bis Tag 8 statt. Sechs Tage nach Beendigung der TPO Behandlung sind die reifen Megakaryozyten mit hohem Ploidiegrad kaum mehr nachweisbar und ausschließlich junge Megakaryozyten mit einem geringeren Ploidiegrad vorhanden. Parallel zu den reifen Megakaryozyten ist auch ein Teil der langlebigen Plasmazellen, die bereits vor der TPO Behandlung im Knochenmark residierten, verschwunden (3.4.6.). Zusammen mit der anfänglichen Zunahme neu gebildeter (BrdU+) Plasmazellen belegt dieses, dass die TPO Applikation zu einem Austausch im Plasmazellkompartiment führt (3.4.6.).

Zum späten Analysezeitpunkt (Tag 23) ist das BrdU+ Kompartiment wieder zusammengebrochen, wobei die Ursache dafür sich nicht aus den Ergebnissen ableiten lässt. Möglicherweise spielt hier aber das intrinsische Potential der Plasmazelle für Langlebigkeit eine Rolle (siehe 1.1.2.5.) [2, 42, 84-86, 120].

Wenn die TPO Gabe mit einer Immunisierung kombiniert wird, findet eine deutlich stärkere Akkumulation sowohl von Ova als auch von Gesamtplasmazellen im Knochenmark statt, während die Plasmazellformierung in der Milz unverändert bleibt. Drei Wochen nach der Sekundärimmunisierung sinkt das Gesamtplasmazellkompartiment wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe, während die Ova Population fast doppelt so groß wie in den Kontrolltieren bleibt (siehe 3.4.5.). Da jedoch das Megakaryozytenkompartiment insgesamt nicht vergrößert wurde, spricht die Tatsache, dass auch das Gesamtplasmazellkompartiment nicht gewachsen ist, für die Idee einer begrenzten Nischenkapazität. Die Megakaryopoese beeinflusst demzufolge den Austausch im Plasmazellkompartiment.

Eine Kombination aus TPO Behandlung, Sekundärimmunisierung und BrdU Fütterung könnte hier weiteren Aufschluss geben, da die BrdU Fütterung zusätzlich ermöglicht, die durch Bystander Aktivierung generierten Plasmazellen zu erfassen. Diese Plasmazellen stammen in der Regel von Gedächtnis-B-Zellen ab und haben somit das Potential langlebig zu werden [17, 121].

Es lässt sich also zusammenfassen, dass es durch die TPO Behandlung zu einen Austausch im Megakaryozytenkompartiment und ebenfalls zu einem Austausch im Plasmazellkompartiment kommt. Um jedoch die neu gebildeten und noch unbesetzten Nischen im Knochenmark langfristig besiedeln zu können, müssen die Plasmazellen auch die intrinsische Fähigkeit besitzen, langlebig zu werden.

Die TPO Behandlung ermöglicht daher, pre-existente langlebige Plasmazellen zu eliminieren und den Pool der Gedächtnisplasmazellen bei einer Immunisierung zu vergrößern.

### 4.3.7. Es gibt ein bidirektionales Zusammenspiel zwischen Immunantwort und Megakaryopoese

In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Megakaryozytenkompartiment das Plasmazellkompartiment beeinflusst (siehe 3.3.1./ 3.3.2./ 3.4.5.und 3.4.6.). Insbesondere wurde durch eine gesteigerte Megakaryopoese der Gedächtnisplasmazellpool vergrößert (siehe 3.3.5.). Hierbei fiel auf, dass während der Experimente mit TPO Gabe ohne Immunisierung die Gesamtmegakaryozytenzahl an Tag 10 in den behandelten Tieren immer

leicht unter den Kontrolltieren lag, in den immunisierten Tieren jedoch darüber (Daten nicht gezeigt). Diese Tendenzen deuteten darauf hin, dass die Immunisierung selbst die Megakaryopoese beeinflusst. Daher stellte sich die Frage, ob eine Immunreaktion die Megakaryopoese stimuliert und somit die Immunreaktion selbst direkten Einfluss auf die Nische nimmt (siehe 3.6.). In der Ova immunisierten Maus gab es einen signifikanten Anstieg der Megakaryozytenzahlen. Ebenso deutete sich in der PBS injizierten Maus ein zunehmendes Megakaryozytenkompartiment an. Das Wachsen der Megakaryozytenpopulation scheint allerdings nicht direkt mit den einwandernden Plasmazellen zusammenzuhängen, da sich zwar im Knochenmark der Ova injizierten Mäuse, jedoch nicht in der PBS Gruppe eine Immigration von Plasmazellen andeutet.

In klinischen Fallstudien wurde die Ursache für die Thrombozytose auf eine Infektion (24%) oder eine chronische Entzündung (10%) zurückgeführt, und bei 42% der Patienten wurde eine Gewebeschädigung als Auslöser festgestellt [122]. Somit sind 34% direkt mit einer laufenden Immunreaktion assoziiert und mögliche weitere 42% mit einer Hybride aus Thrombozyten- und Immunaktivierung im geschädigten Gewebe, was insgesamt 76% aller untersuchten Fälle ergibt. Eine Schnittstelle zwischen Immunantwort und Megakaryopoese könnte das Zytokin IL-6 darstellen, da IL-6 bei der Ova induzierten Immunreaktionen ausgeschüttet wird [11] und IL-6 die Megakaryopoese direkt [74] bzw. durch IL-6 induziertes TPO beeinflusst [76]. Hinzu kommt bei einer Sekundärimmunisierung eine sofortige Stimulation des angeborenen Immunsystems über an aktivierenden Fc Rezeptoren gebundenen Immunkomplexen [22], welches einen Ausstoß inflammatorischer Zytokine wie IL-6 dieser Zellen zur Folge hat.

Die lokalen IL-6 Konzentrationen an den Megakaryozyten selbst und insbesondere an den Hepatozyten, welche durch IL-6 Stimulation TPO produzieren [76], sind hierbei maßgebend, da IL-6 und TPO unterschiedlich auf die Reifung und die Proliferation von Megakaryozyten wirken [74-76, 123, 124]. Zusätzlich beeinflussen weitere kostimulatorische Faktoren wie IL-3, FGF-4, Fibronektin oder SDF-1 die Rekrutierung von Stammzellen, die Megakaryozytenreifung [72, 74, 75], sowie die Abschnürung von Thrombozyten [57]. Daher ist es interessant, dass die SDF-1 mRNA infolge einer Immunisierung zuerst (Tag 4) auf ein Zehntel reduziert wird und später (Tag 16) das Zehnfache des Normalwertes erreicht [125].

Dass bei der Immunisierung ausgeschüttete Zytokine eine mögliche Ursache für die Induktion der Megakaryopoese sind, wäre in Übereinstimmung mit dem tendenziellen Anstieg der Megakaryozytenzahlen in den PBS injizierten Tieren, da auch in diesen Tieren eine Immunantwort einsetzte. Ob IL-6 oder TPO im Serum in Folge meines Behandlungsschemas ansteigt, ließe sich mit einem sensiblen Messsystem nachweisen. Den Weg über IL-6 und die Hepatozyten auszuschließen, bedarf jedoch vielfältiger

Kontrollen, da sowohl IL-6 als auch die Hepatozyten in komplexe systemische Prozesse involviert sind.

Es lässt sich daher zusammenfassend sagen, dass das Immunsystem und die Megakaryopoese verknüpft sind und eine gegenseitige Regulation stattfindet. Die Megakaryopoese wird vermutlich durch Zytokine, die im Zusammenhang mit der Immunreaktion gebildet werden, und nicht durch einwandernde Plasmazellen selbst induziert

### 4.3.8. Megakaryozyten können Plasmazellen in der Kultur unterstützen

Die *in vivo* durchgeführten Experimente haben bereits gezeigt, dass es eine Verknüpfung zwischen Plasmazell- und Megakaryozytenkompartiment gibt. Mit der Kokultur bietet sich nun die Möglichkeit, die molekulare Interaktion zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt gezielt zu untersuchen und zu manipulieren. Zuerst sollte jedoch überprüft werden, ob Megakaryozyten alleine hinreichend das Überleben der Plasmazellen unterstützen können.

Dazu wurde eine Kultur mit folgenden Randbedingungen etabliert. Die Plasmazellen wurden als unreife migrationsfähige Plasmablasten nach einer Ova Sekundärimmunisierung aus der Milz gewonnen, da sich im Vorexperiment gezeigt hatte, dass reife Plasmazellen aus dem Knochenmark, welche die Migrationsfähigkeit verloren haben [36] in einer Megakaryozyten Kokultur nicht überleben (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wird gerade diese Immobilität der reifen Plasmazelle als Ursache für den Zelltod nach Verdrängung aus der Überlebensnische vermutet [17], daher ist es möglicherweise essentiell, dass die Plasmazelle aktiv Kontakt mit der Stromazelle aufnehmen kann. Ein weiterer Grund für die Verwendung unreifer Plasmazellen war, dass nicht bekannt ist, für welchen Entwicklungsschritt der Kontakt zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt wichtig ist. Da jedoch die beiden Zellen sehr früh mit einander assoziiert sind (siehe 3.2.1.) und auch bei der c-Mpl-/- Maus besonders die frühe Plasmazellakkumulation beeinflusst war (siehe 3.3.2.), deutet es auf einen frühzeitige Stimulation bereits der jungen Plasmazellen hin.

Die Megakaryozyten wurden aus einer Kultur fetaler Leberzellen gewonnen, da sich Megakaryozyten aufgrund ihrer Größe zu fragil für eine durchflusszytometrische Aufreinigung gezeigt hatten und auch die Zellzahl im Knochenmark zu gering für eine ausreichende Bodenbedeckung der Kulturgefäße ist. Hieraus ergeben sich jedoch verschiedene Faktoren, welche sich auf die Funktionalität der Kultur auswirken könnten. So beeinflussen kostimulatorische Signale wie TPO, IL-3, IL-6, SDF-1, FGF-4 [57, 74] und Adhäsionsmoleküle wie Fibronektin [72] während der Megakaryopoese die Reifung und Thrombopoese. Daher sind die Kofaktoren eventuell essentiell um eine Stromafunktion für

die Plasmazellen ausüben zu können. Somit sollten die in Kultur generierten Megakaryozyten in ihrer Reifung möglichst den ex vivo isolierten Megakaryozyten ähneln. In der Literatur finden sich allerdings Belege, dass auch Megakaryozyten in Kultur fähig sind, die von mir *in vivo* nachgewiesenen Zytokine IL-6 und APRIL zu produzieren [62, 63].

Nach drei Tagen in der primären Reifekultur wurden die Megakaryozyten in die Ansätze für die Plasmazell Kokultur transferiert und für ca. drei bis vier Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Plasmazellen zugegeben und für weitere vier bzw. fünf Tage kultiviert. Daraus ergibt sich, dass die Megakaryozytenkultur an den Analysetagen bereits sieben bzw. acht Tage alt war. Somit könnte ein Großteil der Zellen bereits lysiert sein, da Megakaryozyten in reinen TPO Kulturen bereits ab Tag 4 beginnen, Plättchen abzuschnüren [71, 73]. Eine mikroskopische Überprüfung der Kokultur an Tag 5 ergab jedoch, dass der Kulturboden noch zu 40-50% mit intakten Megakaryozyten bedeckt war. Eine Aussage über die Plättchenbildungsrate und die Anzahl der lysierten Megakaryozyten ließ sich hingegen nicht machen.

Die Zelllyse führt durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen zu einer Veränderung des Mediums, was die Vitalität der Plasmazelle beeinflusst und somit ein nachteiliger Unterschied zwischen einer Kokultur und einer reinen Zytokinkultur ist. Wie oben beschrieben, bietet die Produktion von Plasmazellüberlebensfaktoren wie IL-6 oder APRIL durch Megakaryozyten einen positiven Beitrag zur Kultur, jedoch wird im Vergleich zur Zytokinkultur ein Konzentrationsgradient erst aufgebaut und ist nicht für alle Plasmazellen sofort verfügbar. Wird die Plasmazelle nun zu den Megakaryozyten gegeben, tritt eine kritische Übergangsphase ein, in der die Plasmazelle zu dem Megakaryozyten migrieren und Kontakt aufnehmen muss. Je nach Länge der Preinkubationszeit erhalten die Plasmazellen in Abhängigkeit von ihrer Entfernung zum Megakaryozyten keine, eine geringe oder eine ausreichende Stimulation. Die 3-4 Stunden Preinkubation sollten den Aufbau eines Konzentrationsgradienten aber auch eine möglichst lange Kokulturzeit mit den Plasmazellen ermöglichen. Gegen eine deutlich längere Preinkubationszeit sprach die bald beginnende Plättchenabschnürung und Megakaryozytenlyse, sowie der Nährstoffverbrauch durch die Megakaryozyten, die zu Beginn 80% des Kulturbodens bedeckten.

Es war zu beobachten, dass in den Kokulturansätzen die CD61+ Megakaryozyten die Plasmazellen stärker unterstützt haben als die CD61- Zellen, welche aus derselben fetalen Leberkultur stammten. So fanden sich eine höhere Zellzahl und mehr sezernierte Antikörper in den Megakaryozyten- als in den CD61- sowie den Mediumansätzen (siehe Abb. 30). Da Megakaryozyten, wie oben bereits angesprochen, Nährstoffe und insbesondere IL-6 verbrauchen, könnte dieses erklären, weshalb in der MK+ IL-6 Kultur nicht mehr Plasmazellen vorhanden waren als in den MK Ansätzen ohne IL-6.

In den Megakaryozyten Ansätzen kam es im Gegensatz zu den IL-6 Ansätzen kaum zu einer Reduktion der Plasmazellzahl von Tag 4 auf Tag 5. Daher ist es vorstellbar, dass die Plasmazellen, die in der kritischen Anfangsphase der Kultur schnell genug Kontakt zu einem Megakaryozyten herstellen, besser stimuliert werden als durch IL-6 alleine und somit länger überleben können. Der Großteil der Plasmazellen überlebt jedoch diese kritische Phase vermutlich nicht.

Aus diesem Grund und da in Ansätzen mit löslichem IL-6 die meisten Plasmazellen gefunden werden, sollte versucht werden, die oben besprochenen Parameter der Kokultur weiter zu optimieren. Zusätzlich sollte eine Kinetik zwischen Tag 1 und 7 durchgeführt werden, um kurzfristige Effekte wie Proliferationsstimulation durch IL-6 und langfristige Effekte wie antiapoptotische Wirkungen durch Synergien zwischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen [50] zu untersuchen bzw. zwischen den Kulturen zu unterscheiden.

Eine grundlegende, aber möglicherweise Erfolg versprechende Änderung könnte die Etablierung einer Vielzellkultur aus Plasmazelle, Megakaryozyt, SDF-1α+ Fibroblast und Knochenmarkendothelzelle sein, da Knochenmarkfibroblasten Megakaryozyten über die Produktion von TPO [73] hinaus beeinflussen bzw. stabilisieren [71, 73]. Fibronektin vermittelte Signale sind dabei möglicherweise ein entscheidender Faktor [72]. Ebenso ist die Interaktion der Megakaryozyten mit Knochenmarkendothelzellen, wie sie in der vaskulären Nische vorhanden sind, entscheidend für die Reifung und das Überleben [57].

Die Etablierung dieser vier Zellen als Kokultur könnte helfen, die im Folgenden vorgestellte Theorie der Multi-Komponenten-Plasmazellnische (siehe 4.4) zu überprüfen. Eine selektive Manipulation verschiedener Faktoren und Zellen könnte weiteren Aufschluss über Gestalt, Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Nischenkomponenten liefern.

# 5. Zusammenfassung und Modell der Multikomponenten Plasmazellnische

Das Thema dieser Arbeit war die Untersuchung der Plasmazellnische im Knochenmark. Im Verlauf dieser Studie wurden die Megakaryozyten als wichtiger Bestandteil der Nische identifiziert.

Langlebige Gedächtnisplasmazellen sind die Quelle persistierender Antikörper. Nach einer Infektion oder Impfung ist ein protektiver Antikörpertiter über Jahre bis Jahrzehnte im Serum nachweisbar. Autoreaktive Antikörper tragen andererseits zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen bei. Hier zeigen sich autoreaktive Plasmazellen besonders resistent gegenüber konventionellen immunsuppremierenden Therapien.

Plasmazellen sind nicht per se langlebig, denn ihr Überleben hängt von Signalen aus der Mikroumgebung – der so genannten Nische – ab. In genetisch modifizierten Mäusen und *in vitro* wurden APRIL, IL-6, TNF-alpha, SDF-1 sowie CD44 Liganden als stärkste Plasmazellstimulantien identifiziert. Die Kombination mehrerer Faktoren wirkte in Kultur synergistisch und führte zu Überlebensraten von mehreren Tagen.

Die Mehrheit systemisch entstandener Gedächtnisplasmazellen befindet sich im Knochenmark. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass nahezu alle IgG+ Plasmazellen mit retikulären SDF-1+/ VCAM1+ fibroblastenähnlichen Zellen assoziiert sind. Retikuläre Knochenmarkzellen konnten Plasmazellen in Kultur jedoch nur für wenige Tage bis Wochen am Leben erhalten.

Trotz ihrer enormen Bedeutung für das Plasmazellüberleben und demzufolge für protektive sowie autoreaktive Antikörpertiter, ist bislang sehr wenig über den Aufbau und die Funktion der Plasmazellnischen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie nachgewiesen, dass ein Drittel aller Igκ+ Plasmazellen im Knochenmark mit Megakaryozyten kolokalisiert. Ebenso wurde gezeigt, dass beide Zelltypen an retikulären Fibronektin+ Zellen adhärieren und sich in der vaskulären Nische (definiert als weniger als 30µm vom Endothel entfernt) befinden. Megakaryozyten und Plasmazellen migrieren gegen SDF-1 und waren in Knochenmarkschnitten mit SDF-1 Signalen assoziiert. Aufgrund der hohen F-Aktin Konzentration an der Kontaktfläche zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt ist anzunehmen, dass sie nicht nur passive Nachbarn sind, sondern über Ligand-Rezeptor Paare miteinander interagieren. Des Weiteren wurde histologisch, durchflusszytometrisch sowie mittels qPCR nachgewiesen, dass Megakaryozyten die Plasmazellüberlebensfaktoren

APRIL, IL-6 und SDF-1 produzieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Megakaryopoese Auswirkungen auf das Plasmazellkompartiment hat. Hierzu wurde der Thrombopoetin (TPO)/ c-Mpl Signalweg genutzt. TPO ist ein starkes Megakaryopoese induzierendes Zytokin, welches an den TPO-Rezeptor c-Mpl bindet. C-Mpl wird von der Stammzelle ausgehend linienspezifisch auf Megakaryozyten exprimiert. In der B-Zelllinie wird TPO nicht exprimiert. Ebenso zeigte TPO keinen direkten Einfluss auf Plasmazellen in Kultur. Die Injektion von TPO in Wildtypmäuse führte allerdings neben einer transienten Erhöhung der Megakaryozytenzahlen auch zu einem Anstieg der Plasmazellzahlen im Knochenmark. Plasmazellen aus einer Sekundärimmunisierung bei gleichzeitiger TPO Behandlung zeigten sich befähigt, langlebig zu werden und so das Gedächtnisplasmazellkompartiment zu verdoppeln. Im umgekehrten Fall, waren in der c-Mpl defizienten Maus (c-Mpl-/-) neben den Megakaryozyten auch die Plasmazellzahlen reduziert.

Dies bedeutet, dass der TPO/ c-Mpl Signalweg indirekt über die Mikroumgebung auf das Plasmazellkompartiment wirkt. Im Zusammenhang mit der direkten Kolokalisation und der Produktion von Plasmazellüberlebensfaktoren liegt es somit nahe, dass die TPO sensitiven Megakaryozyten Teil der Plasmazellnische sind. Die Verknüpfung der Megakaryozyten- und Plasmazellzahlen unterstreicht hierbei die Relevanz der Megakaryozyten für die Plasmazellnische.

Die Kolokalisation von ca. 30% der Gesamtplasmazellen mit Megakaryozyten bei präferentiellen Unterschieden für Plasmazellen mit verschiedenen Antikörperklassen, sowie die unterschiedlich starke Reduktion von Plasmazellen verschiedener Antikörperklassen in der c-Mpl-/- Maus deuten allerdings darauf hin, dass vermutlich nicht das gesamte Plasmazellkompartiment mit Megakaryozyten assoziiert ist. Es könnte demnach alternative Plasmazellnischen im Knochenmark geben.

Aufgrund des in dieser Studie gezeigten wichtigen Beitrags der Megakaryozyten für die „megakaryozytäre“ Plasmazellnische, welcher in alternativen Nischen möglicherweise durch andere Zellen ersetzt wird, möchte ich das Konzept der Multikomponenten-Plasmazellnische vorstellen (Abb. 32).

Die retikuläre Fibronektin+/ SDF-1+ Zelle bildet ein Nischengerüst und den Treffpunkt von gegen SDF-1 wandernden Zellen wie der Plasmazelle und dem Megakaryozyt. Weiterhin versorgt sie die eingebetteten Zellen mit basalen Nischenfaktoren wie Adhäsionsmolekülen (VCAM1) und CD44-Liganden (Fibronektin). Diese sind jedoch für das Überleben nicht hinreichend und werden durch eine zweite Nischenzelle ergänzt.

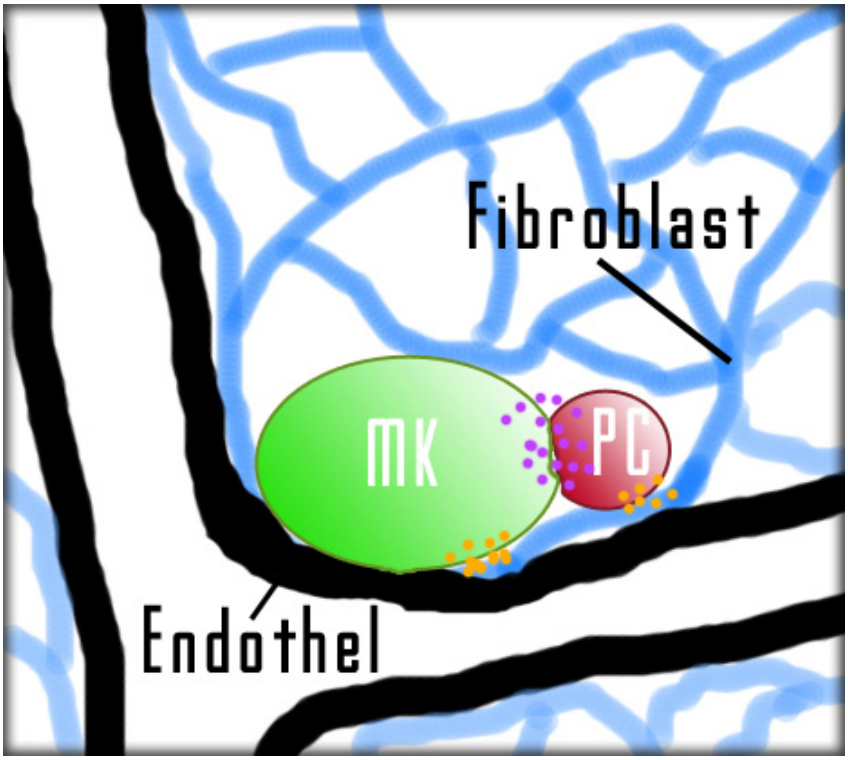



**Abb. 32: Modell der Multikomponenten Plasmazellnische.** Langlebige Plasmazellen (PC) sitzen in der vaskulären Nische (definiert als weniger als 30µm vom Endothel entfernt). Dort sind sie an retikuläre SDF-1+ (orange) Fibronektin+ Zellen adhäriert und haben Kontakt zu einer weiteren Zelle, dem Megakaryozyten (MK). Beide Nischenkomponenten versorgen die Plasmazelle mit Überlebensfaktoren (orange, lila). Dieses stellt einen qualitativen Effekt durch Bereitstellung unterschiedlicher Faktoren sowie einen quantitativen Effekt durch Konzentrationserhöhung der Überlebensfaktoren in der Nische dar.

Der funktionelle Beitrag der Megakaryozyten könnte unter anderem in der Erhöhung der IL-6 und APRIL Konzentrationen in der Nische liegen. Hierbei sind vor allem IL-6 bzw. gp130 vermittelte Signale zu nennen, da die IL-6 Produktion sehr restriktiv ist und Megakaryozyten eine der Hauptquellen für IL-6 im Knochenmark sind. Zusätzlich könnten Megakaryozyten die Einwanderung und die Direktion der Plasmazellen in die Überlebensnische durch megakaryozytär produziertes SDF-1 steuern.

Zum Abschluss soll noch einmal auf potentielle praxisrelevante Bezüge der Studie hingewiesen werden. So war es zum einem möglich, durch TPO das Gedächtnisplasmazellkompartiment zu vergrößern. Dieses könnte im Zusammenhang mit dem unterschiedlich guten Ansprechen auf Schutzimpfungen und insbesondere bei so genannten Impfversagern weiter verfolgt werden. Mit TPO konnte ein erhöhter Austausch im langlebigen Plasmazellkompartiment induziert werden. Ein Ziel zukünftiger Studien könnte es daher sein, einen Austausch autoreaktiver durch protektiver Plasmazellen in Autoimmunpatienten zu erreichen.

# 6. Ausblick

In dieser Studie wurde ein unerwarteter Zusammenhang zwischen humoralem Gedächtnis und Megakaryopoese entdeckt. Aufgrund dieser neuartigen Erkenntnis und den hier beschriebenen vielversprechenden Daten, lassen sich mehrere Ansatzpunkte für fortführende Untersuchungen entwickeln.

So ist es bisher unklar, ob Megakaryozyten die Proliferation, die Reifung oder das Überleben der Plasmazellen stimulieren. Ebenso bedarf es weiterer Untersuchungen, ob in alternativen Plasmazellnischen die molekularbiologische Funktion der Megakaryozyten durch andere Zellen ersetzt wird oder ob unterschiedliche Plasmazellen verschiedene Stimuli zum Überleben benötigen. Die Entschlüsselung der funktionellen sowie molekularen Mechanismen zwischen Plasmazelle, Megakaryozyt und weiteren Nischenkomponenten, ist eine wichtige Aufgabe bei der weiteren Erforschung der Plasmazellnische.

Mit Hilfe einer Chip Genexpressionsanalyse von unreifen und reifen Plasmazellen, sowie von Megakaryozyten ließen sich Ligand-Rezeptor Paare finden und in der Kultur gezielt stimulieren oder blockieren.

Ebenso sollte eine differenzierte Untersuchung von einzelnen Subpopulationen des Plasmazellkompartiments im Zusammenhang mit Megakaryozyten stattfinden. Aufgrund der starken Assoziation mit IgA Plasmazellen wären Experimente mit mukosalen Immunantworten interessant.

Insbesondere der Zellkultur könnte zukünftig eine tragende Rolle zukommen. Wie für das oben vorgestellte Modell diskutiert, setzt sich die Plasmazellnische aus verschiedenen Komponenten bzw. Zellen zusammen. In der Kultur lassen sich gezielt Plasmazellen, Megakaryozyten, Fibroblasten und Knochenmarkendothelzellen mit verschiedenen genetischen Modifikationen zusammensetzen oder über konditionelle Knock-outs zellspezifisch Faktoren ausschalten. Dadurch lässt sich klären, welche Zelle welchen Stimulus liefert. So findet sich in der Literatur, dass sowohl Megakaryozyten als auch Fibroblasten IL-6 und APRIL produzieren [44, 62, 63]. APRIL wird außerdem von Plasmazellen selbst produziert [115]. Aufgrund dessen wäre es interessant zu untersuchen, ob gerade die Aufkonzentrierung von stimulierenden Zytokinen in der Nische entscheidend ist.

Ob die Plasmazellüberlebensfaktoren von den Stromazellen in die Umgebung sezerniert werden oder es einen direkten Transfer von Zytokinen über Zell-Zell-Verbindungen gibt, lässt sich durch die Depletion freier Zytokine im Medium mittels anti-Zytokinantikörpern überprüfen.

Durch Genexpressionsanalysen und Messung der Zytokinkonzentrationen der verschiedenen Zellpopulationen lässt sich ermitteln, ob Plasmazellen indirekt von einer gegenseitigen Stimulation zwischen Megakaryozyten und Fibroblasten profitieren. Dass die Produktion von Plasmazellüberlebensfaktoren in Stromazellen induziert werden kann, ist beschrieben [49] und lässt sich durch den Vergleich zwischen Einzellzell- und Kokultur der verschiedenen Nischenzellen untersuchen. Integrine und Rezeptoren lassen sich in der Kultur ebenfalls gezielt und einfacher als *in vivo* blockieren oder stimulieren. Einen weiteren Vorteil bieten mikroskopische Analysen von Zellkulturen, da bei einer geringen Zelldichte die Polarisierung von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren besser sichtbar zu machen ist als bei Gewebeschnitten.

Wenn die stimulierenden Moleküle, welche die Stromazelle für die Nische liefert, entschlüsselt würden, ließen sich diese therapeutisch gezielt applizieren oder blockieren. Ebenso wäre es dann möglich, *in vivo* alternative Nischen zu finden, in denen diese Moleküle durch eine andere Zelle bereitgestellt werden. Zusätzlich könnten klinische Daten nach Kreuzvernetzungen zwischen molekularbiologischen Störungen und Immundefizienzen durchsucht werden.

Durch den Einsatz modernster Mikroskopietechniken wie der Multiphotonen Mikroskopie und fluoreszenzmarkierter Megakaryozyten [126] sowie Plasmazellen [85] lassen sich Echtzeitaufnahmen aus der Kultur, aber auch *in vivo* gewinnen. Dadurch wäre es möglich, die frühe Interaktion zwischen Plasmazelle und Megakaryozyt nach dem Austritt der Plasmazelle aus dem Blutgefäß zu beobachten. Ein weiterer offener Punkt ist, ob es zu einem Austausch von Megakaryozyten in der Plasmazellnische kommt. Da Gedächtnisplasmazellen mehrere Monate bis Jahre in ihrer Nische überleben können, während das Abschnüren der Thrombozyten die Megakaryozyten eliminiert, ist dieses von sehr großem Interesse für das Verständnis der Plasmazellnische.

# 7. Referenzen


1. Meffre, E., R. Casellas, and M.C. Nussenzweig, *Antibody regulation of B cell development.* Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 379-85.
2. Benson, M.J., et al., *Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 275-80.
3. Fagarasan, S., N. Watanabe, and T. Honjo, *Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells.* Immunol Rev, 2000. **176**: p. 205-15.
4. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
5. Stavnezer, J., J.E. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and regulation of class switch recombination.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 261-92.
6. Smith, K.G., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci.* Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-8.
7. Sze, D.M., et al., *Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival.* J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 813-21.
8. O'Connor, B.P., et al., *The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease.* Immunol Rev, 2003. **194**: p. 61-76.
9. Taillardet, M., et al., *The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells.* Blood, 2009.
10. Del Prete, G., *The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans.* Int Rev Immunol, 1998. **16**(3-4): p. 427-55.
11. Everson, M.P., et al., *Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles.* J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 494-8.
12. Golding, B., M. Zaitseva, and H. Golding, *The potential for recruiting immune responses toward type 1 or type 2 T cell help.* Am J Trop Med Hyg, 1994. **50**(4 Suppl): p. 33-40.
13. Karupiah, G., *Type 1 and type 2 cytokines in antiviral defense.* Vet Immunol Immunopathol, 1998. **63**(1-2): p. 105-9.
14. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.* Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
15. Liew, F.Y., *Induction and regulation of CD4+ T cell subsets.* Ciba Found Symp, 1994. **187**: p. 170-5; discussion 176-8.
16. Golding, B. and D.E. Scott, *Vaccine strategies: targeting helper T cell responses.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **754**: p. 126-37.
17. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
18. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow.* Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
19. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells.* Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
20. Chen-Kiang, S., *Biology of plasma cells.* Best Pract Res Clin Haematol, 2005. **18**(4): p. 493-507.
21. Bournazos, S., et al., *Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants.* Clin Exp Immunol, 2009. **157**(2): p. 244-54.

22. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcgamma receptors as regulators of immune responses.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
23. Xiang, Z., et al., *FcgammaRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis.* Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 419-29.
24. Nemazee, D., *Receptor selection in B and T lymphocytes.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 19-51.
25. Bolland, S. and J.V. Ravetch, *Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis.* Immunity, 2000. **13**(2): p. 277-85.
26. Kroemer, G., et al., *Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases.* Autoimmunity, 1996. **24**(1): p. 25-33.
27. Naparstek, Y. and P.H. Plotz, *The role of autoantibodies in autoimmune disease.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 79-104.
28. Nicholson, L.B. and V.K. Kuchroo, *Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(6): p. 837-42.
29. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Clin Pathol, 2003. **56**(7): p. 481-90.
30. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 394-403.
31. Hoyer, B.F., et al., *Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice.* J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1577-84.
32. Neubert, K., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis.* Nat Med, 2008. **14**(7): p. 748-55.
33. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
34. Manz, R.A., et al., *Humoral immunity and long-lived plasma cells.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 517-21.
35. Schittek, B. and K. Rajewsky, *Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors.* Nature, 1990. **346**(6286): p. 749-51.
36. Hauser, A.E., et al., *Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response.* J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1277-82.
37. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements.* J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 45-56.
38. Pan, J., et al., *A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues.* J Immunol, 2000. **165**(6): p. 2943-9.
39. Pelletier, N., et al., *The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway.* J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1340-7.
40. Ho, F., et al., *Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations.* Eur J Immunol, 1986. **16**(10): p. 1297-301.
41. McMillan, R., et al., *Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production.* J Immunol, 1972. **109**(6): p. 1386-94.
42. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system.* Nature, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
43. Cortes, M. and K. Georgopoulos, *Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity.* J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 209-19.
44. Minges Wols, H.A., et al., *The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival.* Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 837-46.

45. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 290-301.
46. Ohlstein, B., et al., *The stem cell niche: theme and variations.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 693-9.
47. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
48. Cyster, J.G., *Homing of antibody secreting cells.* Immunol Rev, 2003. **194**: p. 48-60.
49. Minges Wols, H.A., et al., *The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4213-21.
50. Cassese, G., et al., *Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals.* J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1684-90.
51. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells.* J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 91-8.
52. Klein, G., *The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment.* Experientia, 1995. **51**(9-10): p. 914-26.
53. Fasnacht, N. and W. Muller, *Conditional gp130 deficient mouse mutants.* Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(4): p. 379-84.
54. Nie, Y., et al., *The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity.* J Exp Med, 2004. **200**(9): p. 1145-56.
55. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
56. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
57. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis.* Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
58. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche.* Immunity, 2006. **25**(6): p. 862-4.
59. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches.* Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
60. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments.* Immunity, 2003. **19**(1): p. 9-19.
61. Klinger, M.H. and W. Jelkmann, *Role of blood platelets in infection and inflammation.* J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(9): p. 913-22.
62. Bonci, D., et al., *Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis.* Blood, 2004. **104**(10): p. 3169-72.
63. Wickenhauser, C., et al., *Secretion of cytokines (interleukins-1 alpha, -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal human bone marrow megakaryocytes.* Blood, 1995. **85**(3): p. 685-91.
64. Jiang, S., et al., *Cytokine production by primary bone marrow megakaryocytes.* Blood, 1994. **84**(12): p. 4151-6.
65. Raslova, H., et al., *Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach.* Blood, 2007. **109**(8): p. 3225-34.
66. Alexander, W.S., et al., *Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl.* Blood, 1996. **87**(6): p. 2162-70.
67. Carver-Moore, K., et al., *Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice.* Blood, 1996. **88**(3): p. 803-8.

68. de Sauvage, F.J., et al., *Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin.* J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 651-6.
69. Gurney, A.L., et al., *Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice.* Science, 1994. **265**(5177): p. 1445-7.
70. Arnold, J.T., et al., *A single injection of pegylated murine megakaryocyte growth and development factor (MGDF) into mice is sufficient to produce a profound stimulation of megakaryocyte frequency, size, and ploidization.* Blood, 1997. **89**(3): p. 823-33.
71. Nagata, Y., et al., *Regulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin and stromal cells.* Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 435-8.
72. Han, P., X.H. Guo, and C.J. Story, *Enhanced expansion and maturation of megakaryocytic progenitors by fibronectin.* Cytotherapy, 2002. **4**(3): p. 277-83.
73. Nagahisa, H., et al., *Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation.* Blood, 1996. **87**(4): p. 1309-16.
74. Koike, K., et al., *Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture.* Blood, 1990. **75**(12): p. 2286-91.
75. Williams, N., et al., *The role of interleukin 6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet production.* Ciba Found Symp, 1992. **167**: p. 160-70; discussion 170-3.
76. Kaser, A., et al., *Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis.* Blood, 2001. **98**(9): p. 2720-5.
77. Kuter, D.J., *Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia.* Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 193-206.
78. Benner, R., A. van Oudenaren, and H. de Ruiter, *Antibody formation in mouse bone marrow. IX. Peripheral lymphoid organs are involved in the initiation of bone marrow antibody formation.* Cell Immunol, 1977. **34**(1): p. 125-37.
79. Huard, B., et al., *APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa.* J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2887-95.
80. MacLennan, I. and C. Vinuesa, *Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses.* Immunity, 2002. **17**(3): p. 235-8.
81. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 660-9.
82. Castellino, F., et al., *Generating memory with vaccination.* Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2100-5.
83. Manz, R.A., et al., *Maintenance of serum antibody levels.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 367-86.
84. Chevrier, S., et al., *CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3895-900.
85. Fairfax, K.A., et al., *Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4104-11.
86. Kallies, A., et al., *Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression.* J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 967-77.
87. Moser, K., et al., *Stromal niches, plasma cell differentiation and survival.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 265-70.
88. Odendahl, M., et al., *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1614-21.

89. van Laar, J.M., et al., *Sustained secretion of immunoglobulin by long-lived human tonsil plasma cells.* Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 917-27.
90. Manz, R.A., et al., *Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen.* Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1703-11.
91. Blink, E.J., et al., *Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization.* J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 545-54.
92. Lindblad, E.B., *Aluminium compounds for use in vaccines.* Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 497-505.
93. Alving, C.R., *Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials.* Vaccine, 2002. **20 Suppl 3**: p. S56-64.
94. Edelman, R., *The development and use of vaccine adjuvants.* Mol Biotechnol, 2002. **21**(2): p. 129-48.
95. Kool, M., et al., *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells.* J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 869-82.
96. Aoki, I., A. Aoki, and D.M. Klinman, *Activation of IL-4 and IL-6 secreting cells by antigen.* Cytokine, 1995. **7**(8): p. 799-805.
97. Avery, D.T., et al., *IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4.* J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1767-79.
98. Ballmaier, M. and M. Germeshausen, *Advances in the understanding of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.* Br J Haematol, 2009. **146**(1): p. 3-16.
99. Ballmaier, M., et al., *c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.* Blood, 2001. **97**(1): p. 139-46.
100. Germeshausen, M., et al., *[Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) - a defect of the thrombopoietin receptor c-Mpl].* Klin Padiatr, 2001. **213**(4): p. 155-61.
101. Adeyokunnu, A.A., *Radial aplasia and amegakaryocytic thrombocytopenia (TAR syndrome) among Nigerian children.* Am J Dis Child, 1984. **138**(4): p. 346-8.
102. Rovira, M., et al., *Acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura associated with immunoglobulin deficiency.* Acta Haematol, 1991. **85**(1): p. 34-6.
103. Pastos, K.M., et al., *Differential effects of recombinant thrombopoietin and bone marrow stromal-conditioned media on neonatal versus adult megakaryocytes.* Blood, 2006. **108**(10): p. 3360-2.
104. Haaijman, J.J., P. Van Den Berg, and J. Brinkhof, *Immunoglobulin class and subclass levels in the serum of CBA mice throughout life.* Immunology, 1977. **32**(6): p. 923-7.
105. Vieira, P. and K. Rajewsky, *The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice.* Eur J Immunol, 1988. **18**(2): p. 313-6.
106. de Andres, B., et al., *A population of CD19highCD45R-/lowCD21low B lymphocytes poised for spontaneous secretion of IgG and IgA antibodies.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5326-34.
107. Ghetie, V. and E.S. Ward, *Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 739-66.
108. Klein-Schneegans, A.S., et al., *Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the lpr (lymphoproliferation) locus.* J Autoimmun, 1989. **2**(6): p. 869-75.
109. Luger, E.O., et al., *Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 819-26 e4.

110. Achatz-Straussberger, G., et al., *Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(9): p. 1307-13.
111. Belnoue, E., et al., *APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells.* Blood, 2008. **111**(5): p. 2755-64.
112. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization.* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 349-56.
113. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.* Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
114. Sapoznikov, A., et al., *Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches.* Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 388-95.
115. Chu, V.T., et al., *In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells.* J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5947-57.
116. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
117. Karlsson, M.C., et al., *Efficient IgG-mediated suppression of primary antibody responses in Fcgamma receptor-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2244-9.
118. Geffroy-Luseau, A., et al., *Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro.* Int Immunol, 2008. **20**(6): p. 775-82.
119. Drachman, J.G., et al., *Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes.* Blood, 1997. **89**(2): p. 483-92.
120. Gatto, D., et al., *Complement receptors regulate differentiation of bone marrow plasma cell precursors expressing transcription factors Blimp-1 and XBP-1.* J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 993-1005.
121. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.* Science, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
122. Griesshammer, M., et al., *Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count.* J Intern Med, 1999. **245**(3): p. 295-300.
123. Ishibashi, T., et al., *Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice.* Blood, 1989. **74**(4): p. 1241-4.
124. Straneva, J.E., et al., *Is interleukin 6 the physiological regulator of thrombopoiesis?* Exp Hematol, 1992. **20**(1): p. 47-50.
125. Ueda, Y., M. Kondo, and G. Kelsoe, *Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow.* J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1771-80.
126. Junt, T., et al., *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow.* Science, 2007. **317**(5845): p. 1767-70.

# 8. Anhang

## Abkürzungen

| | |
|---|---|
| (-) | negative für einen Merkmal |
| (+) | positiv für einen Merkmal |
| (++) | stark positiv für ein Merkmal |
| Abb. | Abbildung |
| Alum | Aluminiumhydroxid |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APC | Antigen präsentierende Zelle |
| APRIL | a proliferation-inducing ligand |
| BAFF | B lymphocyte activation factor |
| BCMA | B cell maturation antigen |
| bio | Biotin |
| BrdU | Bromodeoxyuridin |
| BSA | bovines Serum Albumin |
| CAMT | kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie |
| CC | C-Chemokin |
| CD | Oberflächenantigen (cluster of differentiation) |
| c-Mpl | Myeloproliferative leukemia virus oncogene, CD110 |
| CXCL | CX-Chemokin |
| Cy5 | Cychrome 5 |
| DAPI | 4`, 6-diamino-2-phenylindole, dilactate |
| DC | Dendritische Zelle |
| DNA | Desoxyribonukleinacid |
| DNAse | Desoxyribonuklease |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobuin |
| IL | Interleukin |
| i.m. | intramuskulär |
| i.p. | intraperitoneal |
| IP-10 | interferon-gamma-inducible protein-10 |
| ITP | Immunthrombozytopenie |
| i.v. | intravenös |

| | |
|---|---|
| Kappa | Immunglobulin leichte Kette kappa |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| MACS | magnetic cell sorting |
| MALT | mucosa-associated lymphoid tissue |
| MHC | major histocompatibility complex |
| MIP | macrophage inflammatory protein |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| NP | (4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl)Acetyl |
| Ova | Ovalbumin |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyllprotein |
| qPCR | Quantitative poly chain reaction |
| RNA | ribonucleic acid |
| RPMI | Rosewell Park Memorial Institute Medium |
| RT-PCR | Reverse transscriptase poly chain reaction |
| SA | Steptavidin |
| SDF-1 | stromal cell-derived factor-1 |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematodes |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| TH | T-Helferzelle |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TPO | Thrombopoietin |
| UPR | Ungefaltete-Protein Antwort |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |
| VLA | very late antigen |

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank natürlich Rudi Manz, durch dessen intensive und hervorragende Betreuung aus meinen „phantastischen“ Ideen, wissenschaftlich präzise Fragestellungen und logisch stringente Analysen heraus geschliffen wurden. Also vielen Dank Rudi und Deine Metaphern werden mir fehlen.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Katrin, Ati und Martin für die tolle Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung, wenn es wiedermal etwas mehr zu tun gab.

Allen voran möchte ich meiner Freundin Anna und meinen Töchtern Mae und Milla danken, die mein Leben erst komplett gemacht haben und die die Sonne auch an trüben Tagen aufgehen lassen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Helmut und Marina Winter, die mich immer bei meinen Plänen unterstützt haben.

Paul und Suse Janositz danke ich herzlich für das Korrekturlesen und all die sonstige Unterstützung.

## Publikationen

**Winter O.** Moser K., Mohr E., Zotos D.,Kaminski H., Roth K., Szyska M., Dame C., Tarlinton D., Schulze H., MacLennan I. and Manz R.A. , *Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow*. *Blood*, 2009 under revision

Hazen AL, Smith MJ, Desponts C, **Winter O**, Moser K, Kerr WG., *SHIP is required for a functional hematopoietic stem cell niche*. Blood. 2009 Mar 26;113(13):2924-33. Epub 2008 Dec 12.

Mumtaz I., Hoyer B.F., Panne D., Moser K., **Winter O.**, Cheng Q., Wondossen S., Yoshida T., Radbruch A., Manz R.A.., Hiepe F., *Long-lived plasma cells in inflamed tissues survive therapy with glucocorticoids and cyclophosphamide*, submitted to *Blood* , 2009

Panne D., Moser K., Mumtaz I., **Winter O.,** Voigt C., Enghard P., Hoyer B.F., Radbruch A., Riemekasten G., Fillatreau S., Manz R.A. and Hiepe F. *B cell and plasma cell homing to inflamed kidneys of NZB/W mice through distinct CXCR3- and CXCR5-mediated mechanisms*., in preparation

## *Vorträge*

**Winter O.** et al. *Megakaryocytes constitute a functional component of the plasma cell niche in the bone marrow.* 2nd European Conress of Immunology, Berlin, September 2009

**Winter O.** et al. *Plasma cell survival and development in the bone marrow*.- 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, September 2007

## *Poster*

**Winter O.** et al. *Modulation of plasma cell homeostasis by megakaryopoiesis in the bone marrow.* Joint Annual Meeting of Immunology, ÖGAI, Wien, September 2008

Szyska M., **Winter O.** et al. *Interplay between megakaryopoiesis and plasma cell homeostasis.* 2nd European Conress of Immunology, Berlin, September 2009

Moser K., **Winter O.** et al. *Plasma cell environment and survival in the spleen of NZB/W mice.* Joint Annual Meeting of Immunology, ÖGAI, Wien, September 2008

Szyska M., **Winter O.** et al. *Long-lived Plasma Cells in the Bone Marrow Niche.* Joint Annual Meeting of Immunology, ÖGAI, Wien, September 2008

Szyska M., **Winter O.** et al. *Long-lived Plasma Cells in the Bone Marrow Niche.* 3rd ENII – MUGEN Summer School in advanced immunology, Sardinia, May 2008

Moser K., **Winter O.** et al. *Plasma cell longevity in NZB/W mice.* 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, September 2007

Ich erkläre an Eides  Statt, daß die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Oliver Winter