

***In vivo*-Analyse der B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion im Keimzentrum**

Neue Einblicke in die Affinitätsreifung durch Intravitalmikroskopie

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Carolin Ulbricht,

geboren in Chemnitz

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. Juri Rappsilber

Gutachterin: Prof. Dr. Anja E. Hauser

Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. Juli 2018

Berlin, 2018

Danksagung

Nach einer letzten, sehr arbeitsreichen Mai-Woche, die für mich ohne Feiertag vorüber gehen musste und mich bis tief in die Nacht an meinen Rechner fesselte, bin ich nun tatsächlich in der glücklichen Lage, diese allerletzten Worte in meine Doktorarbeit zu schreiben und möchte allen, die direkt oder indirekt dafür gesorgt haben, dass sie entstehen konnte, meinen tiefsten Dank aussprechen!

Vor exakt vier Jahren, ebenfalls im Mai, meldete ich meine Promotionsabsicht an. Damals hätte ich mir nicht träumen lassen, dass tatsächlich einmal der Tag kommen würde, an dem ich sagen würde: Ich bin fertig. Es waren bewegte vier Jahre, teilweise voller Zweifel und Mühe, aber genauso groß, wenn nicht größer, war der Anteil, den Lebensfreude, Tatendrang und Floßfahrten (!) in ihnen einnahmen.

Als ich nach meinem Studium im Juni 2013 nicht recht wusste, wohin mein Weg in der Wissenschaft mich führen sollte, hatte ich das Glück, von Astrid Puppe, die meine Diplomarbeit betreut hatte und mit der ich bis heute in Freundschaft verbunden bin, den Kontakt zur Arbeitsgruppe von Anja Hauser hergestellt zu bekommen. Anja hieß mich unter den Ihrigen wärmstens willkommen und bereitete die Grundlage für eine Zusammenarbeit, bei der ich die Möglichkeit hatte, unglaublich viel zu lernen und meine Ideen frei einzubringen. Durch ihren Optimismus und ihre Begeisterungsfähigkeit motivierte sie mich auch in den schwierigen Zeiten für mein Thema zu brennen.

Überhaupt war das Arbeitsklima, in das ich hier hineinkam, wunderbar positiv. Allen voran ist dieses der offenen Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Anja Hauser und Raluca Niesner zu schulden, durch die ein exzellenter fachlicher Austausch wie auch ein großartiger menschlicher Zusammenhalt der Gruppen abseits des Labors entstehen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Anja Hauser für die in allen Belangen tolle Supervision, sowie Raluca Niesner für die Entwicklung vieler ausgeklügelter Auswertemethoden und Darstellungsideen. Ich danke Anja und Helena Radbruch weiterhin dafür, dass meine Weiterbeschäftigung hier nie ein Problem darstellte. Auch unseren Kooperationspartnern sei an dieser Stelle Dank gesagt. Ohne sie wüsste ich heute noch nicht, wie man Calciumkonzentrationen am Durchflusszytometer misst oder wir hätten nie die YellowCaB-Mauslinie etablieren können.

Ich möchte mich sehr bei Robert Günther und Laura Tech bedanken, die mich in die Geheimnisse der Lymphknotenmikroskopie und der Mäusechirurgie einweihten. Unvergessen wird bleiben, wie Robert auch darüber hinaus oft allwissend jedem labortechnischen Problem mit einer klugen Lösung begegnen konnte. Weiterhin möchte ich Robert und Peggy Mex für die Unterstützung bei Zellisolationen, Zelltransfers und Immunisierungen danken. Ohne ihre Unterstützung dürfte ich diese Zeilen vermutlich noch ein Jahr später schreiben.

Neben allen hier namentlich Genannten sei allen aus den Arbeitsgruppen Niesner und Hauser, sowie aus der Charité und dem gesamten DRFZ gedankt (auch allen Ehemaligen!), die die Arbeit hier so fröhlich und produktiv gestaltet haben. Einen besseren Ort für meine Promotion hätte ich mir nicht aussuchen können!

Mein abschließender Dank nun gilt allen wichtigen Menschen in meinem persönlichen Leben, besonders meinen Eltern, Freunden und Partnern, die in dieser Zeit immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben. Danke dass ihr immer da seid.

Zusammenfassung

Unser Immunsystem stellt uns eine Vielzahl von Effektormechanismen zur Verfügung, die für den lebenslangen Schutz vor Krankheitserregern sorgen. Ein Aspekt dieser Mechanismen ist die Produktion von Immunglobulin-Antikörpern durch langlebige Plasmazellen, die aus B-Zellen in Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe stammen. Innerhalb der Keimzentren bilden B-Zellen, T-Zellen und folliculäre dendritische Zellen stabile Kontakte, die für einen Prozess, der Affinitätsreifung genannt wird, unerlässlich sind. Diese Kontakte führen zum Erwerb des Antigens aus folliculären dendritischen Zellen durch B-Zellen, zu kognitiven T-Zell-B-Zell-Interaktionen, die das Überleben von affinen B-Zell-Klonen sichern, und schließlich zur Rezirkulation von B-Zellen innerhalb bestimmter Zonen des Keimzentrums. Während der Rezirkulation nimmt die Antigen-Affinität der membrangebundenen Form des Immunglobulins, des B-Zell-Rezeptors, durch akkumulierte Mutationen in den Immunglobulin-Genen stetig zu. In der Keimzentrumsreaktion kommen ihm zwei Rollen zu: Er ist verantwortlich für die Aufnahme des Antigens und überträgt Signale ins Innere der Zelle. So könnte die Affinität des B-Zell-Rezeptors neben der Erleichterung der Antigenaufnahme auch eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion spielen, eine Rolle des Keimzentrums-B-Zell-Rezeptors, die schon lange in der Diskussion steht. Wir zeigen hier, dass durch die Stimulation des B-Zellrezeptors der Calciumeinstrom in B-Zellen initiiert wird und die Calciumkonzentration mit der Zeit und mit der Affinität des Rezeptors zum Antigen ansteigt. Zur Überwachung der Signaltransduktion durch B-Zell-Rezeptoren *in vivo* haben wir einen neuartigen transgenen Reporter-Mausstamm namens YellowCaB entwickelt, der das calciumempfindliche Förster-Resonanzenergietransfer-Sensorprotein TN-XXL in CD19⁺ B-Zellen exprimiert. Mithilfe der intravitalem Zweiphotonenmikroskopie sind wir erstmals in der Lage, das Signaling von B-Zell-Rezeptoren zeitlich und räumlich im lebenden Organismus zu analysieren und gleichzeitig Zell-zu-Zell-Interaktionen und Migration zu untersuchen. Unser System erhält dabei die naturgegebenen Strukturen des Gewebes, was so in Kultur nicht machbar wäre. Darüber hinaus bietet uns die Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung die Möglichkeit, Calciumkonzentrationen mit Entscheidungen über das Zellschicksal in Beziehung zu setzen. Mit dieser Methode konnten wir zeigen, dass naive und antigenspezifische B-Zellen innerhalb und außerhalb von Keimzentren eine differentielle Faltung von TN-XXL (und damit Calciumkonzentration) aufweisen. Die Beobachtung von kolokalisierten B-Zellen, die mit dem Calciumzufluss in einem der Reaktionspartner zusammenfiel, führte zu der Hypothese, dass neben folliculären dendritischen Zellen auch B-Zellen selbst eine Quelle der Stimulation von B-Zell-Rezeptoren sind. Zusammen mit CD40L-Signalen von T-folliculären Helferzellen und Signalen, die von Toll-ähnlichen Rezeptoren stammen, wird der B-Zell-Calciumspiegel streng reguliert, um das Ergebnis der Keimzentrumsreaktion zu kontrollieren. Die terminale Differenzierung könnte eine direkte Folge der Aufsummierung dieser Signale sein. Um dies zu unterstützen, konnten wir zeigen, dass B-Zellen in der Lage sind, auf äußere Reize mehrmals durch Calciumzufuhr ohne Erschöpfung zu reagieren. Zusammengefasst stellen wir hier einen neuen Wirkmechanismus für B-Zellen vor, die an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen und ihr eigenes Schicksal rückkoppeln. Daher ist das Signaling von B-Zell-Rezeptoren ein wesentlicher Bestandteil der B-Zell-, Plasmazell- und Gedächtnis-B-Zell-Entwicklung.

Abstract

Our immune system provides us with a variety of effectors that account for life-long protection against pathogens. One aspect of this mechanism is the production of antibodies by long-lived plasma cells that derive from B cells of germinal centers within secondary lymphoid organs. Within germinal centers, B cells, T cells and follicular dendritic cells form stable contacts that are essential for a process called affinity maturation. These contacts lead to acquisition of antigen from follicular dendritic cells by B cells, cognate T cell-B cell interactions that ensure survival of B cell clones and finally to the recirculation of B cells within distinct zones of the germinal center. During recirculation, the membrane-bound form of immunoglobulin, the B cell receptor, becomes increasingly affine to the antigen thanks to accumulating mutations in the immunoglobulin genes. The B cell receptor is not only responsible for antigen uptake but is also able to transduce signals to inner parts of the cell. Thus, apart from its facilitating antigen uptake, affinity of the B cell receptor might play a pivotal role in signaling as well, a role of the germinal center B cell receptor that has long been up for discussion. We here show that B cell receptor signaling-related Calcium influx is active in a subset of germinal center B cells and that calcium concentration is increasing over time and with affinity of the receptor to the antigen. To monitor B cell receptor signaling *in vivo* we developed a novel transgenic reporter mouse strain termed YellowCaB that expresses the calcium sensitive Förster Resonance Energy Transfer sensor protein TN-XXL in CD19⁺ B cells. Employing intravital two-photon microscopy, we are the first group to be able to spatiotemporally resolve B cell receptor signaling in living organisms, while simultaneously monitoring cell-to-cell interactions and migration. This allows us to preserve the natural architecture of the tissue, what otherwise would not have been possible in culture systems. Furthermore, fluorescence lifetime imaging is offering us the possibility to relate calcium concentrations to cell fate decisions, as we could show that naive and antigenspecific B cells inside and outside germinal centers show distinct quenching of TN-XXL. The observation of colocalized B cells that coincided with calcium influx in one reaction partner led us to hypothesize that apart from follicular dendritic cells, B cells itself are a source of B cell receptor stimulation via complement receptors. Together with CD40L-signals from T follicular helper cells and signals stemming from Toll like receptor engagement, the B-cellular calcium level is tightly regulated to control the outcome of the germinal center reaction. Terminal differentiation might be a direct downstream result of these signals adding up. To support this, we could show that B cells are able to react to external stimuli several times via calcium influx without exhaustion. Taken together, we here present a new mode of action for B cells taking part in the germinal center reaction and feedbacking their own fate. Thus, B cell receptor signaling is an essential part of B-cell-, plasma cell- and memory B cell development.

Inhalt

Zusammenfassung	5
Abstract.....	6
Abbildungsverzeichnis	9
Abkürzungen.....	11
1. Einleitung.....	14
1.1. Das Immunsystem	14
1.1.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem.....	14
1.1.2. Selektion von B-Zellen in Keimzentren und Affinitätsreifung	18
1.1.3. Antigenpräsentation	20
1.1.4. Antikörper.....	22
1.2. Calcium als Second Messenger	23
1.2.1. Calcium in B-Zellen.....	24
1.3. Modelle der BCR-abhängigen B-Zell-Aktivierung	27
1.4. Förster-Resonanzenergietransfer	27
1.5. Genetisch encodierte Calciumindikatoren.....	28
1.5.1. Calciumindikatoren auf Basis einzelner Fluorophore	28
1.5.2. FRET-basierte Calciumindikatoren	29
1.6. Offene Fragen.....	31
1.6.1. Anspruch und Zielsetzung dieser Arbeit	31
2. Material und Methoden	33
2.1. Material	33
2.1.1. Mäuse	33
2.1.2. Antikörper und Antigene	34
2.1.3. Lösungen und Medien	34
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.5. Geräte	36
2.1.6. Software.....	36
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. Zellisolation	37
2.2.2. Konfokalmikroskopische Untersuchung von lebenden B-Zellen	37
2.2.3. Histologie	38
2.2.4. Durchflusszytometrie	39
2.2.5. Intravitaluntersuchung von Lymphozyten im Transfersystem	40

Inhalt

2.2.6. Ratiometrische Auswertung	44
2.2.7. Fluoreszenzlebensdauerbestimmung	48
3. Ergebnisse.....	50
3.1. Mäuse mit Expression des GECI TN-XXL in CD19 ⁺ B-Zellen (YellowCaB-Mäuse).....	50
3.1.1. Typisierung	51
3.2. Zellkultur	51
3.2.1. Der calciumsensitive FRET-Sensor TN-XXL wird funktional exprimiert.....	51
3.2.2. BCR-Stimulation führt zu Calciumeinstrom und FRET-Signalanstieg.....	54
3.2.3. Die Stimulation von Korezeptoren moduliert das FRET-Signal.....	57
3.3. Intravitalmikroskopie	60
3.3.1. Naive YellowCaB-Zellen migrieren in GCs von restringierten Wirten	60
3.3.2. Antigen-spezifische YellowCaB-Zellen migrieren in GCs von Wildtyp-Wirten.....	61
3.3.3. B-Zellen regen sich gegenseitig zum Calciumeinstrom an	64
3.3.4. Keimzentren besitzen B-Zellpopulationen mit hoher BCR-Aktivität	68
3.3.5. FRET-Signale steigen über die Zeit und mit zunehmender Antigen-spezifität an	71
3.3.6. GC-B-Zellpopulationen zeigen differenzierungsabhängige Calciumkonzentration	72
4. Diskussion	76
4.1. Das YellowCaB-Mausmodell zur Ca ²⁺ -Konzentrationsbestimmung in B-Zellen.....	76
4.1.1. <i>in vitro</i> -Validierung des GECI TN-XXL	76
4.1.2. Intravitalmikroskopie	78
4.2. Grenzen des Systems	80
4.2.1. Limitationen des GECI TN-XXL	80
4.2.2. Limitationen durch das experimentelle Set-up.....	81
4.2.3. Modellbedingungen.....	82
4.3. BCR-Signaling im Keimzentrum	83
4.3.1. Dissoziationsaktivierungsmodell unterstützt Ergebnisse.....	83
4.3.2. CD40-Ligation moduliert die BCR-abhängige Calciumantwort	84
4.3.3. TLR und BCR werden synergistisch aktiviert.....	87
4.3.4. B-Zellen präsentieren sich gegenseitig Antigen im Keimzentrum	89
4.4. Hypothese des Calcium-Schwellenwertes.....	91
4.4.1. Auflösung der Keimzentrumsreaktion und Zellschicksal	92
4.5. Erkenntnisse dieser Arbeit	93
4.6. Ausblick	94
5. Referenzen	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die B-Zell-Entwicklung	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lymphknotenarchitektur	17
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Keimzentrumsreaktion	18
Abbildung 4: Rezirkulation von B-Zellen im Keimzentrum.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der klassischen Immunsynapse.....	20
Abbildung 6: Inhibierung des Calciumeinstroms durch FcγRIIB.....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Immunglobulin-Struktur	22
Abbildung 8: Modell der verschiedenen Calciumantworten.....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des genetisch encodierten Calciumindikators	28
Abbildung 10: Aufbau des Einzelfluorophor-Calciumsensors GCaMP.....	29
Abbildung 11: Aufbau des Cameleon-2 GECI.....	29
Abbildung 12: Maximalintensitätsprojektion durch einen Gehirngewebsschnitt.....	30
Abbildung 13: Fluoreszenzintensität von Donor- und Akzeptorfluorophor des GECI TN-XXL....	30
Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Perfusionssystems.....	38
Abbildung 15: Detektion von Zelleigenschaften im Durchflusszytometer.....	39
Abbildung 16: Zelltransfersystem mit nicht-antigenspezifischen YellowCaB-Zellen	41
Abbildung 17: Zelltransfersystem mit antigenspezifischen B1-8:YellowCaB-Zellen.....	42
Abbildung 18: Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalmikroskopie.....	43
Abbildung 19: Jablonski-Diagramm	44
Abbildung 20: Prozess der Auswertung von intravitalmikroskopischen Daten.....	45
Abbildung 21: Beispiel für die Segmentierung der B-Zellen	45
Abbildung 22: Fluoreszenzspektren von eCFP und Citrine	46
Abbildung 23: Titrationskurve des GECI TN-XXL in Abhängigkeit der Calciumkonzentration ...	47
Abbildung 24: Abklingkurve der Donor-Fluoreszenz von eCFP von isoliertem TN-XXL.....	48
Abbildung 25: Phasor-Auswertung von FLIM-Messdaten	49
Abbildung 26: Cre-LoxP Rekombination.....	50
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Typisierung	51
Abbildung 28: Änderung der Fluoreszenzintensitäten	52
Abbildung 29: Änderung der ratiometrisch ermittelten Fluoreszenzintensität über die Zeit	53
Abbildung 30: Statistische Auswertung des FRET-Signals von 100 YellowCaB-Zellen	53
Abbildung 31: Stimulation des BCR durch Zugabe von anti-IgM-F(ab) ₂	54
Abbildung 32: Wiederholte Stimulation des BCR mit Antikörper	55
Abbildung 33: Durchflusszytometrische Untersuchung der YellowCaB-Zellen.....	56
Abbildung 34: Kinetik der durchflusszytometrischen Untersuchung.....	57
Abbildung 35: Stimulation mit anti-CD40, anti-IgM-F(ab) ₂ -Fragment und Ionomycin.....	58
Abbildung 36: Toll-like-Rezeptor-4-Stimulation mit LPS	59
Abbildung 37: Toll-like-Rezeptor-9-Stimulation mit CpG	60
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Lymphknoten-Gefrierschnittes.....	61
Abbildung 39: Intravitalmikroskopische Untersuchung eines B1-8lo-Keimzentrums.....	62

Abbildung 40: Intravitalmikroskopische Untersuchung eines B1-8hi-Keimzentrums	63
Abbildung 41: Die Momentangeschwindigkeit.....	64
Abbildung 42: Getrackte YellowCaB-Zelle	65
Abbildung 43: Letzter Zeitpunkt der getrackten Zellbewegung (gelb) durch den Lymphknoten. .	66
Abbildung 44: Vergleich des FRET-Signals, der Momentangeschwindigkeit	67
Abbildung 45: Strategie zur Feststellung der Kolo-kalisierung von FDCs und YellowCaB-Zellen	68
Abbildung 46: Punktwolkendiagramm der Momentangeschwindigkeit versus FRET-Signal.	69
Abbildung 47: FRET-Signaling von B1-8hi:YellowCaB-Zellen innerhalb einer Stunde.....	69
Abbildung 48: Histogramm normierter FRET-Signale	70
Abbildung 49: Entwicklung der FRET-Werte im Verlaufe der Keimzentrumsreaktion.	71
Abbildung 50: Farbkodierte Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer τ vom Donor eCFP.....	73
Abbildung 51: Phasorenplot für alle zum Zeitpunkt 8 (vgl. Abbildung 50) getrackten Zellen.....	74
Abbildung 52: Histogramm der Realwerte der diskreten Fourier-Transformation.....	75
Abbildung 53: Schematische Darstellung des Dissoziationsaktivierungsmodells.....	84
Abbildung 54: Möglicher Kontakt zwischen FDC und B-Zelle.....	90
Abbildung 55: Antikörper-abhängige AG-Präsentation	91

Abkürzungen

Abkürzung	Englische Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung
ACDA	Antikoagulant Citrate Dextrose Sol. A	Acid-Zitrat-Dextrose-Lösung A
AG	Antigen	Antigen
AID	Activation induced cytidine deaminase	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
APC	Antigen presenting cell	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
BCL6	B cell lymphoma 6 protein	B-Zell-Lymphomprotein 6
BCR	B cell receptor	B-Zell-Rezeptor
BFP	Blue fluorescent protein	Blau fluoreszierendes Protein
BLIMP-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1	B-Lymphozyten-induziertes Reifeprotein
bp	Base pairs	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium [divalent kation]	Calcium [divalentes Kation]
CaM	Calmodulin	Calmodulin
CD	Cluster of differentiation	Differenzierungscluster (Oberflächenprotein)
CD40L	CD40 ligand	CD40-Ligand
(e)CFP	Enhanced cyan fluorescent protein	Verbessertes cyan fluoreszierendes Protein
CGG	Chicken gamma globulin	Huhn-Gamma-Globulin
CLM	Cross-linking model of BCR activation	Vernetzungsmodell der BCR Aktivierung
CLP	Common lymphoid progenitor	Gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle
CpG	Phosphorylated cytosine-guanine oligonucleotide	Phosphoryliertes Cytosin-Guanin Oligonukleotid
CRAC	Calcium release activated channel	Durch Calciumstrom aktivierter Kanal
CRs (CR1, CR2)	Complement receptors 1 und 2	Komplementrezeptoren 1 und 2
cSMAC/pSMAC	Central/ peripheral supramolecular activation cluster	Zentrale/ periphere supramolekulare Aktivierungscluster
CSR	Class switch recombination	Klassenwechselrekombination
CXCL	C-X-C motif chemokine receptor ligand	C-X-C-Motiv-Chemokinerezeptor-Ligand
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor	C-X-C-Motiv Chemokinrezeptor
DAM	Dissociation-activation model of BCR activation	Dissoziationsaktivierungsmodell der BCR-Aktivierung
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylene glycol-bis(aminoethyl ether)-tetra acetic acid	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen binding fragment	Antigen-bindendes Fragment
Fc	Constant fragment	Konstantes Fragment
FcγRIIB	IgG-Fc-Fragment receptor IIB	IIB-Rezeptor für den Fc-Teil des IgG
FLIM	Fluorescence lifetime imaging	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
FOXO1	Forkhead box protein O1	„Forkhead Box“ Protein O1
f.p.	Foot pad injection	Fußsohleninjektion
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
FT	Fourier transformation	Fourier -Transformation
GC	Germinal center	Keimzentrum
GECI	Genetically encoded calcium indicators	Genetisch encodierte Calcium-Indikatoren
GFP	Green fluorescent protein	Grün fluoreszierendes Protein

Abkürzungen

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfone acid	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSC	Hematopoetic stem cell	Hämatopoetische Stammzelle
ICOS	Inducible costimulator	Induzierbarer Kostimulator
ICOSL	Inducible costimulator ligand	Induzierbarer Kostimulator-Ligand
Ig (M, D, G)	Immunoglobulin (class M, D, G etc.)	Immunglobulin (Klasse M, D, G etc.)
IL	Interleukin	Interleukin
IFN	Interferon gamma	Interferon gamma
IP3	Inositol trisphosphate	Inositoltrisphosphat
IRF4	Interferon regulatory factor 4	Interferon-regulierender Faktor 4
ITAM	Immune receptor tyrosine-based activation motif	Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotif
i.v.	intravenously	intravenös
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Microscope	Konfokalmikroskop
M	Molar	Molar
MACS	Magnetic assisted cell sorting	Magnetisch-unterstützte Zellsortierung
MFI	Mean fluorescence intensity	Mittlere Fluoreszenzintensität
mm	Millimeter	Millimeter
mM	Millimolar	Millimolar
ml	Milliliter	Milliliter
MHC(I+II)	Major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
µm	Micrometer	Mikrometer
µM	Micromolar	Mikromolar
MOG	Myelin oligodendrocyte protein	Myelinoligodendrozytenprotein
MS	Multiple sclerosis	Multiple Sklerose
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	Kernfaktor aktivierter T-Zellen
NF-κB	Nuclear factor 'kappa light chain' enhancer of activated B cells	Kappa-Leichtketten- <i>Enhancer</i> -Kernfaktor aktivierter B-Zellen
nm	Nanometer	Nanometer
nM	Nanomolar	Nanomolar
NP	4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl	4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl
Nur77	Nuclear receptor 77	Kernrezeptor 77
p.i.	Post immunization	Nach Immunisierung
PAX5	Paired box protein 5	„Paired Box“ Protein 5
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD1	Programmed cell death protein 1	Protein für programmierten Zelltod 1
PFA	Paraformaldehyde	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-bisphosphate	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PLB	Plasma lipid bilayer	Plasmalipiddoppelschicht
PLC-γ2	Phospholipase C gamma 2	Phospholipase C gamma 2
PKC	Protein kinase C	Proteinkinase C
PMS	Plasma membrane sheets	Plasmamembranschichten
PMT	Photomultiplier tube	Photoelektronenvervielfacher
PRR	Pattern recognition receptor	Mustererkennungsrezeptor
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“ cell culture medium	„Roswell Park Memorial Institute“ -Zellkulturmedium
S1P	Sphingosine-1-phosphate	Sphingosin-1-Phosphat

SD	Standard deviation	Standardabweichung
SH2	Src homology 2 (domain)	Src Homologie 2 (Domäne)
SHM	Somatic hypermutation	Somatische Hypermutation
SHP-1	SH2 domain-containing phosphatase 1	SH2-Domäne besitzende Phosphatase 1
SLO	Secondary lymphoid organ	Sekundäres lymphatisches Organ
snRNA	Small nuclear ribonucleic acid	Kleine Kern-Ribonukleinsäure
SOCE	Store-operated calcium entry	Speicher-gesteuerter Calciueinstrom
STIM1	Stromal interaction molecule 1	Stromales Interaktionsmolekül 1
Syk	Spleen tyrosine kinase	Milz-Tyrosin-Kinase
TACI	Transmembrane activator and calcium modulating cyclophilin ligand interactor	Transmembranaktivator und Calcium-modulierender Cyclophilin-Ligand-Interaktor
TCR	T cell receptor	T-Zellrezeptor
TCSPC	Time-correlated single photon counting (device)	(Gerät zur) zeitkorrelierten Zählung von Einzelphotonen
TfH	T follicular helper cell	T-follikuläre Helferzelle
TLR4/9	Toll-like receptor 4/9	Toll-ähnlicher Rezeptor 4 bzw. 9
TnC	Troponin C	Troponin C
VOC	Voltage-gated calcium channel	Spannungsgesteuerter Calciumkanal
YFP	Yellow fluorescent protein	Gelb fluoreszierendes Protein

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Ohne das Immunsystem wäre der Organismus von Lebewesen nicht in der Lage, körperfremde Stoffe von körpereigenen zu unterscheiden und so Krankheiten abzuwehren und gleichzeitig die Integrität der eigenen Zellverbände zu bewahren. Ein mehrstufiges Abwehrsystem ermöglicht es dem Körper, das Eindringen von Pathogenen zu verhindern bzw. eingedrungene Pathogene zu bekämpfen. Auch unterliegt die Kontrolle der gerichteten Entwicklung von unschädlich machenden Antikörpern der Aufsicht eines ausgeklügelten Systems aus Immunzellen, Oberflächenrezeptoren und Botenstoffen. Die Zellen des Immunsystems, die Leukozyten (weiße Blutzellen), befinden sich in der Zirkulation in Blut und Lymphe; B-Zellen, T-Zellen¹ und natürliche Killerzellen bilden die Untergruppe der Lymphozyten. B- und T-Zellen ordnen sich außerdem in lymphatischen Organen an. Man unterscheidet primäre und sekundäre lymphatische Organe (SLO). In den primären lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus, fetale Leber) differenzieren die Zellen des Immunsystems aus hematopoetischen Stammzellen (HSC) und reifen zu Effektorzellen. In den SLO (Milz, Lymphknoten, Peyer-Plaques) finden wichtige Prozesse der adaptiven Immunantwort statt, die zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (langlebige Plasmazellen und Gedächtnis-B- und T-Zellen, die bei Bedarf für die Pathogenabwehr schnell reaktiviert werden können) führen.

1.1.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist im menschlichen Organismus, wie der Name sagt, von Geburt an vorhanden. Es besteht aus mechanischen (Epithelzellen, Schleimhäute), chemischen (Fettsäuren der Hautflora, Tränenflüssigkeit, Speichel) sowie unspezifischen, zellulären Bestandteilen (Makrophagen, Neutrophile) und der normalen mikrobiologischen Flora des Körpers (Vgl. Janeway, Immunobiology, 6. Auflage, Garland Science, 2005). Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem, welches sich spezifisch angepassten Oberflächenrezeptoren auf B- und T-Zellen bedient, greifen die Zellen des angeborenen Immunsystems auf Keimbahn-assoziierte Gene für die Ausbildung von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) zurück (1). So sind z.B. Makrophagen u.a. in der Lage, bakterielle Pathogene zu erkennen und aufzunehmen (2). Weiterhin helfen Wundheilungs-induzierte Proteine und das Komplementsystem bei der Zerstörung von Krankheitserregern (3). Diese Faktoren befähigen jedoch nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wie es nur von B- und T-Zellen hergestellt werden kann. Nach dem ersten Kontakt des (angeborenen) Immunsystems mit dem Pathogen wird dieses in antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie z.B. dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, Monozyten und B-Zellen prozessiert und in Form kurzer Peptidsequenzen auf Histokompatibilitätsproteinen (*major histocompatibility complex*, MHC) dargeboten. Sie wandern in

¹ Die Bezeichnung „B“- oder „T“-Lymphozyt, oder wie sie in dieser Arbeit vereinfachend genannt werden sollen, B- und T-Zellen, bezieht sich auf die Herkunft bzw. den Entdeckungsort der Zellen. T-Zellen reifen im *Thymus*, B-Zellen wurden erstmals in der *Bursa fabricii* in Vögeln näher beschrieben.

die SLO, wo T-Zellen sie dann mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennen können. Diese werden somit aktiviert und die erworbene Immunantwort initiiert (4, 5).

B-Zellen können in den reaktiven Einheiten der SLO, den Keimzentren (*germinal centers*, GCs), mit ihrem B-Zell-Rezeptor (BCR) Teile des nativen Pathogens (=Antigen, AG) aufnehmen, das sie von stromalen Zellen, den follikulären dendritischen Zellen (FDCs), in Form von Immunkomplexen dargeboten bekommen, und so ebenfalls auf die Reaktion gegen diesen bestimmten Stoff programmiert werden (6). Beide Zellarten, B- und T-Zellen, müssen für dasselbe Antigen spezifische Rezeptoren besitzen, damit es zur Entwicklung von abwehrenden Antikörpern kommt (siehe im Detail 1.1.2).

Neben der Pathogenabwehr muss der BCR außerdem in der Lage sein, Toleranz gegenüber Autoantigenen zu entwickeln (7). Seine Reaktivität wird fortwährend anhand seiner Fähigkeit, Signale zu übertragen, geprüft. Die Stärke und Dauer dieser Signale, wie z.B. die Stärke des Einstroms von Calcium (Ca^{2+}) –Ionen, entscheidet an verschiedenen Stellen seiner Entwicklung über das Schicksal der Zelle.

B-Zellen

B-Zellen bilden den Zweig des Immunsystems aus, der als humorale Immunantwort bezeichnet wird, indem sie in differenzierter Form Antikörper produzieren. Sie entstehen im Knochenmark aus HSC in spezialisierten Nischen über eine genaue Abfolge von verschiedenen Differenzierungsstadien (Abbildung 1). Sie verlassen das Knochenmark als unreife B-Zellen, um über Blut und Lymphe durch den Körper zu patrouillieren. So findet eine ständige Überwachung auf mögliche Antigene statt. Zur endgültigen Reifung der B-Zellen kommt es schließlich in der Peripherie bzw. in den SLO, wo die B-Zell-Aktivierung stattfindet. B-Zellen sind die Vorläufer von (langlebigen) Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen, welche in Keimzentren nach einem zweistufigen Antigenkontakt entstehen. Kurzlebige Plasmazellen können auch durch die extrafollikuläre, eine vom Keimzentrum unabhängige Immunantwort, entstehen.

HSC verlieren nach und nach ihre Pluripotenz und werden zuerst zu multipotenten Stammzellen, welche noch die genetischen Programme zur Entwicklung in viele verschiedene Zelltypen besitzen, bis sie schließlich auf die Entwicklung zur lymphoiden Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) festgelegt werden (8). Es folgt die Entwicklung zur Pro-B-Zelle. Um die korrekte Entwicklung von B-Zell-Vorläufern zu gewährleisten, ist die Orchestrierung von vielen Transkriptionsfaktoren, (wie z.B. FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) für den Übergang von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle oder PAX5 (*Paired box protein 5*) für die korrekte Entwicklung des BCR) vonnöten (9, 10). Vor allem die Zytokine CXCL12 und Interleukin (IL)-7 regen das Überleben und die Proliferation von Pro- und Prä-B-Zellen an (11, 12). Der BCR wird zuerst auf Prä-B-Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalübertragung durch den Prä-BCR wichtig ist, um verschiedene Prozesse in der Entwicklung der Zelle anzustoßen, wie Proliferation oder Umbau der leichten Immunglobulinkette (IgL) (siehe 1.1.4.), in dem die Funktionalität des Rezeptors so laufend überprüft werden kann (13). Ohne die Stimulation des prä-BCRs können sich die Zellen nicht zu unreifen B-Zellen entwickeln, daher ist immer ein gewisser Grad an sogenannten tonischen Signalen notwendig, um das Überleben der Zellen zu sichern.

B-Zell-Migration

Über venöse Blutgefäße, die Sinusoide, verlassen die reifen B-Zellen das Knochenmark (z.T. durch die Wirkung von CXCR4-Antagonisten und einer erhöhten Sphingosin-1-Phosphat- (S1P)-Konzentration aus dem Endothel im Blut) und gelangen über das Blut und Lymphe in die SLO (14, 15).

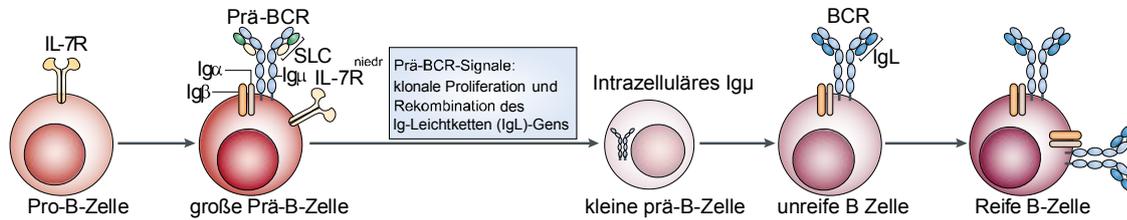


Abbildung 1: Übersicht über die B-Zell-Entwicklung in Zusammenhang mit der Entstehung des B-Zell-Rezeptors (BCR). Aus der Pro-B-Zelle, die noch keinen BCR besitzt, entwickelt sich die Prä-B-Zelle, welche eine Vorform des BCR, den Prä-BCR besitzt, und so Prä-BCR-Signale empfangen kann. Diese führen dazu, dass der Rezeptor internalisiert und umgebaut wird und schließlich, in der unreifen Form, wieder auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Antigen-unabhängige Signale führen zur völligen Ausreifung (13).

Dort finden B-Zellen ihr Einsatzgebiet durch das Vorhandensein von Chemokingradienten und anhand der entsprechenden Ausprägung der zugehörigen Oberflächenrezeptoren. Beispielsweise sorgt das Chemokin CXCL13, welches im Keimzentrum von FDCs abgesondert wird, dafür, dass B-Zellen in Richtung der höchsten Konzentration dieses Lockstoffes wandern und sich so zu B-Zell-Follikeln in den SLO zusammen finden. Der hierfür verantwortliche Rezeptor auf der B-Zell-Oberfläche ist CXCR5. Weiterhin exprimieren B-Zellen den Rezeptor CCR7, welcher fähig ist, auf die Chemokine CCL19 und CCL21, die von T-Zellen sekretiert werden, zu reagieren. Ein Heraufregulieren dieses Rezeptors nach Antigenkontakt veranlasst die B-Zellen in Richtung T-Zell-Zone in den SLO zu migrieren, wo sie an der T-B-Grenze mit ebenfalls durch das Antigen aktivierten, rezeptorverwandten T-Zellen interagieren können (16).

B-Zellen können auf unterschiedliche Arten mit Antigen in Kontakt treten: Kleinere Antigene werden über ein Leitungssystem aus Kollagenfasern durch die SLO geleitet (17), größere von anderen Zelltypen aufgenommen und Komplement-abhängig (d.h. markiert mit bestimmten Proteinmarkern, welche an spezielle Rezeptoren binden) an B-Zellen weitergegeben. Bei über das Blut zugeleiteten Antigenen geschieht dies vor allem durch Makrophagen (in den Lymphknoten subkapsuläre Sinusmakrophagen) und DC (18, 19). Antigen wird außerdem in Form von Immunkomplexen (Immunglobulin- und Komplement-markiertes Antigen) auf den FDCs gespeichert. Dort kann es in endosomalen Kompartimenten, welche vor Degradation geschützt sind, rezirkulieren. (20). T-B-Interaktionen führen schließlich zum Ausbilden von Keimzentren, da sie den B-Zellen Proliferationssignale liefern und sie veranlassen, CXCR5 weiter hochzuregulieren, wodurch sie sich zu dicht gepackten reaktiven Einheiten zusammenfinden (21).

T-Zellen

T-Zellen lassen sich anhand der Expression des CD4- oder CD8-Rezeptors in zwei Klassen einteilen. Die zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen zerstören beispielsweise von Viren befallene Körperzellen. Die CD4-positiven T-Zellen spielen im Rahmen dieser Arbeit vor allem als folliculäre T-Helferzellen (T_H) eine Rolle. Sie werden durch APCs aktiviert und können spezifisch auf ein

ganz bestimmtes Antigen reagieren. Neben weiteren Prozessen ermöglicht das Hochregulieren der Chemokinrezeptoren CXCR5 und S1P-Rezeptor 2 den T-Zellen die Migration in Richtung der B-Zell-Regionen in den SLO (22, 23). T-Zellen und B-Zellen treten so das erste Mal an der Grenze zwischen T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel (vgl. Abbildung 2) der SLO in Wechselwirkung. T-Zellen treffen hier mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auf B-Zellen, die ebenfalls durch das Antigen aktiviert worden sind und treten mit ihnen in MHCII-TCR Wechselwirkung. Diese B-Zellen können dann über ihr CD40-Oberflächenmolekül mit den von T-Zellen exprimierten CD40-Liganden (CD40L) in Verbindung treten und auf diese Weise das Signal zur Proliferation und Differenzierung erhalten, andererseits sterben sie ab (24–27). Wie durch Experimente mit einem photoaktivierbaren Fluoreszenzreporter gezeigt werden konnte, sind die T-Zellen dabei nicht auf ein GC beschränkt, sondern können sich über den gesamten Lymphknoten verteilen und sorgen so für die maximale Diversifizierung der T-Zell-Hilfe (28, 29). Dabei bestimmt die Menge des von den GC-B-Zellen aufgenommenen Antigens direkt über die von den T-Zellen ausgeschütteten Signale zur Proliferation und Rezirkulation und beeinflusst den Zellzyklus der B-Zellen (30, 31). Die Antigenmenge sorgt dabei in T-Zellen für erhöhte transiente und teilweise nachhaltige Calciumspiegel, was jedoch die Beweglichkeit der T-Zellen nicht einschränkt. Die T_{fh}-Zellen „scannen“ das GC (und eben auch benachbarte) unablässig nach AG-präsentierenden Zellen ab, um T-Zell-Hilfe zu leisten, wo sie benötigt wird (32).

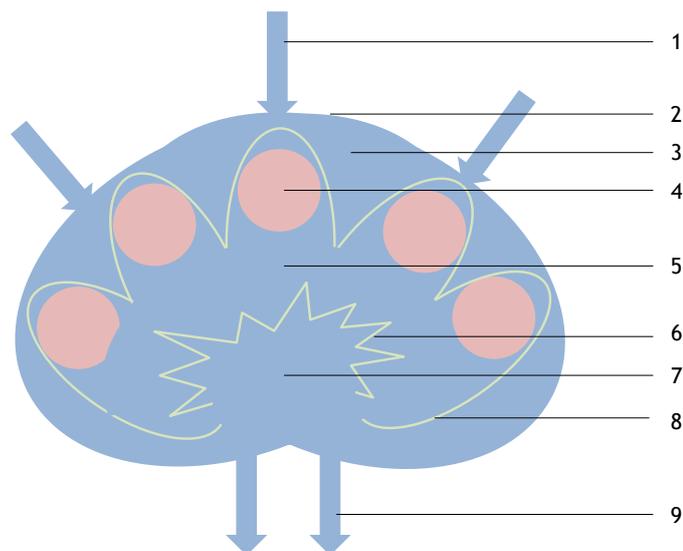


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lymphknotenarchitektur (stark vereinfacht). (1) Zuführende Lymphgefäße, (2) Kapsel aus Bindegewebe, unter welcher sich die (3) aus Lymphozyten bestehende Rinde (Kortex) befindet, welche die (4) B-Zell-Follikel beherbergt, die der Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen dienen und in welchen die Keimzentren entstehen. Darunter schließt sich die (5) T-Zell-Zone an, sowie die (6) Markstränge, die aus dem Bereich der (7) Medulla ins Innere des Lymphknotens ragen. Der Lymphknoten ist durchzogen von Bindegewebssträngen, den Trabekeln (8). Der Abtransport von Zellen findet über (9) abführende Lymphgefäße statt.

Lymphknoten

Lymphknoten sind als Strukturen des Körpers, in denen sich zentrale reaktive Prozesse der Immunantwort abspielen, architektonisch optimal angepasst, um die Interaktionen von B-Zellen und T-Zellen zu erleichtern. Sie bestehen aus einer mit Lymphozyten angereicherten Bindegewebskapsel und gliedern sich subkortikal in Zellansammlungen von B-Zellen, die

sogenannten Follikel, und die basal daran anschließende T-Zell-Zone. Die Lymphknoten werden von lymphatischen Gefäßen durchzogen, den Sinusoiden, die im Bereich der Medulla die mit Lymphozyten angereicherte Lymphflüssigkeit abtransportieren. Hier befinden sich auch die sogenannten Markstränge, in welchen Makrophagen und Plasmazellen angereichert sind (Abbildung 2).

In den B-Zell-Follikeln bilden sich im Verlauf einer Immunreaktion gegen bestimmte Pathogene die Keimzentren aus, in welchen B-Zellen proliferieren und ihre Reaktivität gegen das Antigen getestet wird. Die Keimzentren selbst besitzen ebenfalls eine spezialisierte mikroanatomische Struktur, welche die Affinitätsreifung der B-Zellen unterstützt. Sie gliedern sich in eine helle Zone (light zone, LZ), die sich durch FDCs und Tfh-Zellen auszeichnet und wo die B-Zellen Antigen aufnehmen und je nach BCR-Affinität T-Zell-Hilfe erhalten, und eine dunkle Zone (DZ) in welcher sie proliferieren (Abbildung 3).

1.1.2. Selektion von B-Zellen in Keimzentren und Affinitätsreifung

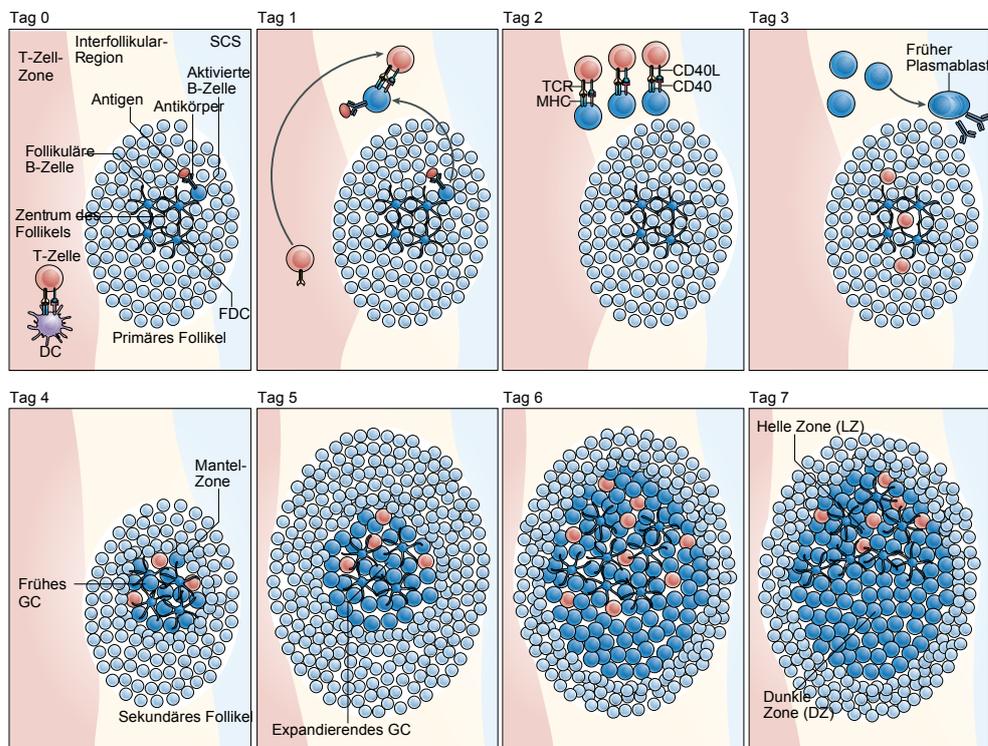


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Keimzentrumreaktion (erste sieben Tage). T-Zellen reagieren auf Antigen, das von professionellen APCs wie z.B. DC, prozessiert und mittels MHCII auf deren Oberfläche präsentiert wird. T-Zellen wandern in die Interfollikularregion. B-Zellen erkennen natives Antigen mithilfe des B-Zellrezeptors und nehmen es in primären Follikeln auf. Zwei Tage später interagieren B- und T-Zellen über MHCII-TCR und CD40-CD40L in der interfollikulären Region, was zur vollständigen B-Zell-Aktivierung führt. An Tag 4 wandern die B-Zellen in das Zentrum des Follikels ein, das charakterisiert ist durch ein Netzwerk von FDCs. Die B-Zellen fangen an, zu proliferieren und die übrigen Zellen zu verdrängen; ein sog. sekundäres Follikel bildet sich aus. Nach sieben Tagen hat sich ein reifes Keimzentrum ausgebildet und es lassen sich eine helle Zone, die aus B-Zellen, T-Zellen und FDCs besteht und eine dunkle Zone, welche dicht gepackte proliferierende B-Zellen enthält, unterscheiden (33), adaptiert.

Keimzentren sind Zellstrukturen in den SLO, in welchen sich B-Zell-Aktivierung, -Selektion, somatische Hypermutation (SHM), klonale B-Zell-Expansion sowie die Induktion der finalen B-Zell-Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen abspielen. Sie bilden sich nach dem Kontakt des

Körpers mit einem T-abhängigen Antigen, also einem Antigen, für dessen Abwehr die Hilfe von T-Zellen notwendig ist. Anhand ihrer Reaktivität gegen das Antigen werden die B-Zellen von T-Zellen dazu befähigt, die Affinität ihres BCR zum Antigen zu erhöhen. Dies geschieht indem sie mehrere Runden von der LZ in die DZ zirkulieren. So werden durch den abwechselnden Umbau der Immunglobulinkette durch SHM/Proliferation und dem Rezeptortest durch Antigenaufnahme und darauffolgende T-Zell-Signale diejenigen B-Zellklone zum Überleben bevorteilt, welche später als Plasmazellen hochreaktive Antikörper in hoher Frequenz herstellen (oder als Gedächtnis-B-Zellen sekundäre Immunantworten starten können) (Abbildung 4).

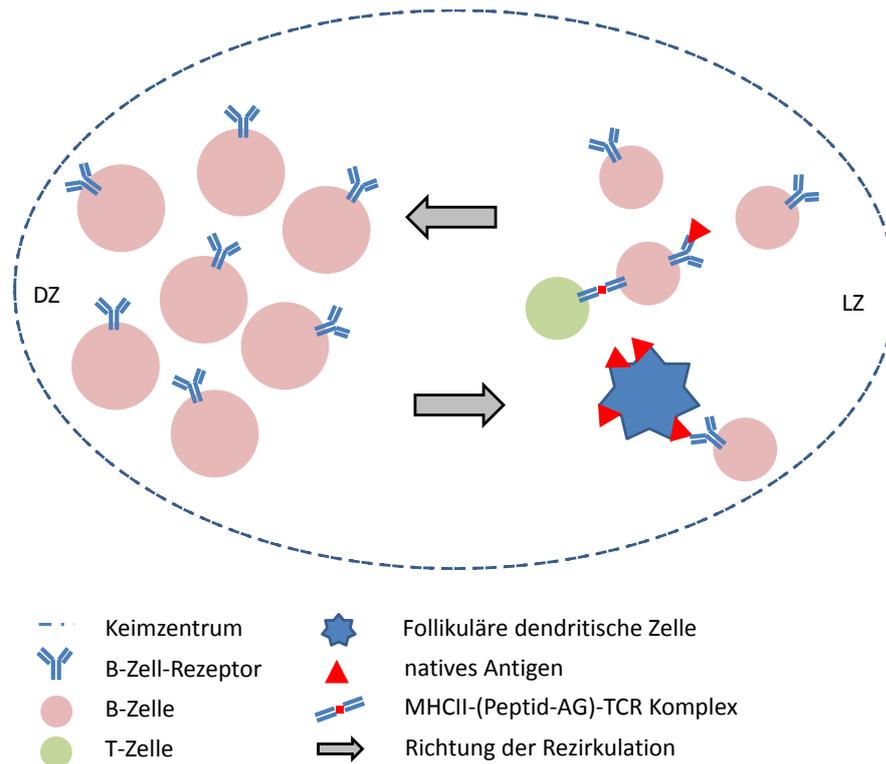


Abbildung 4: Rezirkulation von B-Zellen im Keimzentrum. B-Zellen nehmen von FDCs natives Antigen mit dem BCR auf, prozessieren es und präsentieren es als Peptidabschnitte über MHCII-TCR-Wechselwirkung an T-Zellen. Positive Interaktionen und kostimulatorische Signale (nicht dargestellt) führen zur Wanderung von der LZ in die DZ, wo B-Zellen proliferieren und den BCR durch SHM editieren. Anschließend wandern sie zurück in die LZ. Ein erneutes Durchlaufen dieser Abfolge führt zur graduellen Vergrößerung der Affinität des BCR zum Antigen.

Damit eine B-Zelle im Keimzentrum positiv selektioniert werden kann und proliferieren darf, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Zum einen muss die B-Zelle bereits das Antigen aufgenommen haben, um es auf ihrer Oberfläche im MHCII-Molekül zu präsentieren. Dieses Oberflächensignal erkennen T_H-Zellen. Gleichzeitig muss der BCR der B-Zelle durch Aufnahme desselben Antigens aktiviert worden sein. Die Interaktion zwischen B- und T-Zellen findet in der interfollikulären Region statt, wo sich B- und T-Zellen räumlich treffen. Naive B-Zellen können entweder auf lösliches, besser aber auf membrangebundenes Antigen reagieren, das sie von APC erhalten, z.B. über Wechselwirkungen mit Immunkomplexen, welche an Fc-Rezeptoren oder Komplementrezeptoren gebunden sind (34). Im Keimzentrum selbst erhalten die B-Zellen das Antigen wiederum von Speicherplätzen auf den FDCs, abhängig von der Affinität ihres BCR. Die B-Zellen müssen also BCR-vermittelt zum einen Antigen erkennen, aufnehmen und prozessieren und

zum anderen Kontakt mit T-Zellen herstellen. Nur wenn diese zwei Signale erfolgt sind, führt die T-Zellhilfe durch CD40-CD40L Interaktion zum Proliferationssignal. Zellen, welche dieses Signal nicht erhalten, sterben durch Apoptose (27). Wie gut die Interaktion zwischen T- und B-Zelle ist, entscheidet sich nach Affinität der B-Zelle zum Antigen und anhand der Menge des der T-Zelle dargebotenen Antigens (29). B-Zellen durchlaufen mehrere Runden dieses Selektionsmechanismus. Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion verändern sich so die BCR-Spezifitäten durch SHM. Die negative Selektion schlecht bindender B-Zellen führt dazu, dass nur noch wenige reaktive B-Zellklone am Ende der Reaktion übrigbleiben und diese mit jeder Runde immer höher affine Antigenrezeptoren (welche später als Antikörper sezerniert werden können) gebildet haben. Dieser Vorgang stellt eine herausragende Eigenschaft des adaptiven Immunsystems dar und wird als Affinitätsreifung bezeichnet. Ist die Affinitätsreifung abgeschlossen, erhält die B-Zelle das Signal, sich zur Plasmazelle oder Gedächtnis-B-Zelle zu differenzieren. Welcher Art dieses abschließende Signal jedoch ist, ist noch nicht hinlänglich bekannt. Die Aktivierung des Calciumeinstroms über den BCR und die Amplitude und Dauer scheinen aber eine wesentliche Rolle dabei zu spielen (siehe 1.2.1) (35).

1.1.3. Antigenpräsentation

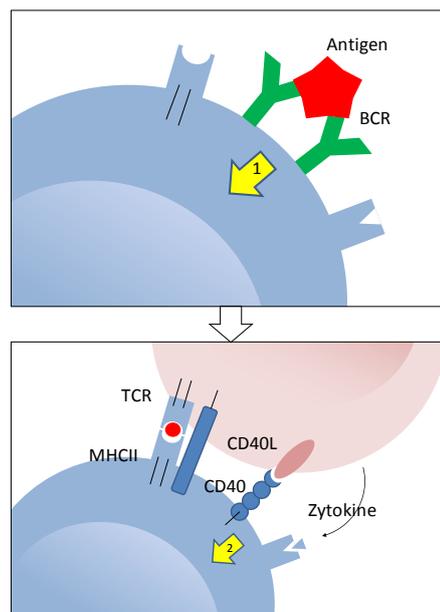


Abbildung 5: Schematische Darstellung der klassischen Immunsynapse. Bei der T-abhängigen Immunantwort präsentiert die B-Zelle (blau) mithilfe des BCR aufgenommenes und prozessiertes Antigen (Signal1) der T-Helfer-Zelle (rosa) über MHCII. Diese erkennt dargebotenes Antigen mittels ihres TCR. Gleichzeitig interagieren CD40 Rezeptor auf der B-Zelle und CD40-Ligand auf der T-zelle miteinander. „Passen“ beide Strukturen zusammen, stimuliert die T-Zelle ihrerseits die B-Zelle mit Zytokinen und gibt ihr so Überlebenssignale (z.B. Expression von BCL-6, Signal 2) Bei der T-unabhängigen Immunreaktion können langkettige, repetitive Sequenzen denselben Effekt hervorrufen, indem sie BCRs und Korezeptoren quervernetzen (nicht gezeigt). Eigene Darstellung nach Janeway, 6. Edition, Garland Science (2005).

Der Begriff „Antigenpräsentation“ beschreibt in der Tat zwei voneinander zu unterscheidende Prozesse: Sofern nicht anders spezifiziert, ist damit zumeist die MHCII-vermittelte Präsentation von Peptidabschnitten eines zuvor aufgenommenen und prozessierten Antigens an T-Zellen zur Erlangung von T-Zell-Hilfe gemeint. Bevor das Antigen den T-Zellen präsentiert werden kann, muss es jedoch von den APC aufgenommen werden. Dieses bewerkstelligen die APC, indem sie

entweder sich frei in der Zirkulation befindende Immunkomplexe oder auf anderen Zelltypen gebundene Immunkomplexe internalisieren. Auch das Zurverfügungstellen dieser Immunkomplexe zur Aufnahme von APC wird manchmal als Antigenpräsentation bezeichnet (ist aber nicht MHCII-vermittelt). B-Zellen sind befähigt, beides zu tun und einerseits Antigen, welches ihnen von spezialisierten Zelltypen in der Form von Immunkomplexen dargeboten wird, aufzunehmen (und gleichzeitig mit der Aktivierung eines entsprechenden Signalweges durch den BCR zu reagieren), und andererseits auch selbst APC zu sein. Diese Interaktion mit T-Zellen passiert bei der B-Zellaktivierung vor Entstehung eines Keimzentrums und während der Keimzentrumsreaktion. Dabei präsentiert die B-Zelle, welche zuvor entweder in der Peripherie, oder aber von stromalen Zellen Antigen aufgenommen hat, kurze Peptidsequenzen des prozessierten Antigens mithilfe ihres MHCII-Moleküls den T-Helferzellen, welche die Sequenz mittels ihres TCR erkennen. Sodann werden kostimulatorische Signale ausgelöst (CD40-CD40L), welche die Sekretion von Überlebenssignalen (d.h. Zytokinen, die unter anderem das B-Zelllymphom-6 Gen (BCL-6), den Master-Regulationsfaktor der Keimzentrumsreaktion, anschalten) durch die T-Zellen zur Folge haben (Abbildung 4) (36, 37).

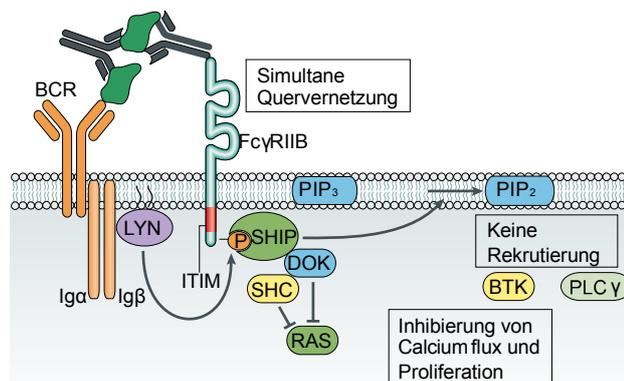


Abbildung 6: Inhibition des Calciumeinstroms durch FcγRIIB. Die simultane Quervernetzung der beiden Rezeptoren Immunkomplexe führt zur Inaktivierung verschiedener nachgeschalteter Moleküle (36), adaptiert

Umgekehrt sind B-Zellen ebenfalls darauf angewiesen, das ihnen von anderen Zellen dargebotene Antigen erkennen zu können. Dies geschieht, indem die B-Zelle auf in Form von Immunkomplexen gebundenes Antigen reagiert. Diese befinden sich in der Zirkulation oder werden auf Fc-Rezeptoren dargeboten. Fcγ-Rezeptoren erkennen den Fc-Teil (c wie *constant*, konstant) des IgG (siehe 1.1.4.). In Menschen und Mäusen existieren sechs verschiedene Untergruppen mit z.T. zwischen den Spezies abweichenden Funktionen. Fc-Rezeptoren können auch Signale übertragen und modulieren. Es gibt aktivierende und inhibierende FcγR, die gemeinsam auf vielen hämatopoetischen Zellen, vor allem angeborenen Immuneffektorzellen, vorkommen. B-Zellen besitzen nur den inhibierenden Rezeptor FcγRIIB, welcher die Aktivierung des BCR herunterreguliert (Abbildung 5) (38). Auch die Bindung von AG-Immunkomplexen auf FDCs im Keimzentrum geschieht durch FcγR.

In der Vergangenheit wurde darüber diskutiert, ob FDCs für die Keimzentrumsreaktion eine gewisse Redundanz aufweisen, denn es konnte gezeigt werden, dass SHM sowie die Produktion von Antikörpern auch stattfinden, wenn dieser Zelltyp fehlt oder die Deposition von

Immunkomplexen auf FDCs unterbunden wird (37, 38). B-Zellen sind bei hoher Affinität ihres BCR in der Lage, durch mechanische Kräfte, die sie mithilfe des Rezeptors auf membrangebundenes Antigen ausüben, dieses zu internalisieren und zu prozessieren (39, 40). Je affiner der BCR dabei für das Antigen ist, desto mehr Antigen kann internalisiert werden. Lösliches Antigen wird zwar ebenfalls aufgenommen werden, wie es ja auch bei der initialen B-Zell-Aktivierung erfolgt (naiver IgM-BCR). Allerdings sind nur hochaffine BCRs in der Lage, durch Einwirkung von mechanischen Zugkräften auf membrangebundenes AG größere Mengen zu internalisieren und somit einen Selektionsvorteil zu erhalten. Es wird diskutiert, ob Immunkomplexe, welche auf den FDCs gespeichert werden, somit die Reifung hochaffiner B-Zellen im Keimzentrum beschleunigen. Auch werden FDCs mit der besseren Ansteuerung von T-Zell-Hilfe und dem Stilllegen bestimmter Apoptosefaktoren in Verbindung gebracht (41). FDCs haben also zumindest eine unterstützende Funktion zur Optimierung der B-Zell-Reifung im Keimzentrum (42).

1.1.4. Antikörper

Als von differenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, sekretierte Form des BCR sind Antikörper in der Lage, durch Blut und Lymphe zu zirkulieren und Pathogene unschädlich zu machen, indem sie sie z.B. für Fresszellen oder spezielle Proteine markieren. Antikörper sind Proteine, die aus je zwei leichten und zwei schweren Aminosäureketten bestehen. Die Ketten werden zusammengehalten durch Disulfidbrücken. Die Y-Form des Immunglobulins macht die Unterscheidung von Fc-Domäne (des „Stamms“) sowie der zwei Fab-Domänen (die zwei „Arme“; a b wie antigenbindend) möglich. Die Fab-Domänen beherbergen an ihren Enden auch die Antigen-bindenden Stellen, während der Fc-Teil dem Andocken der Effektorzellen oder –moleküle dient (Abbildung 7).

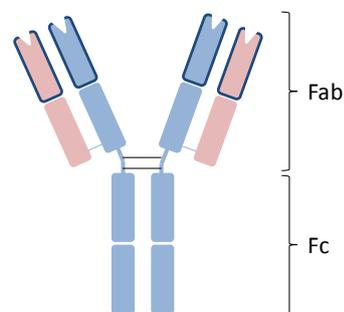


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Immunglobulin-Struktur, die z.B. als IgG-Form des Antikörpers im Körper zirkulieren und Pathogene unschädlich machen können. Der Antikörper besteht aus einer leichten Proteinkette (gelb) und einer schweren (grün). Die Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden. Die Antigen-bindende Stelle befindet sich in der variablen Region (blau umrandet) und wird bei der Affinitätsreifung verändert. Die restlichen Teile des Antikörpers werden als konstante Region bezeichnet, da ihre Struktur im Verlaufe der Reifung der Antikörper gleich bleibt.

Jede Kette hat außer einem konservierten Abschnitt außerdem einen variablen Teil, der sich durch Mutationen so umbauen lässt, dass eine größtmögliche Antikörpervielfalt gewährleistet ist. Antikörper kommen in vielen Klassen im Immunsystem vor. Die naive Form des BCR ist zunächst IgM oder IgD und wird durch Klassenwechselrekombination (*class switch recombination*, CSR) im Verlauf der Keimzentrumsreaktion zu IgG (mit seinen Subklassen IgG1, IgG2a und –b, IgG3 in Mäusen bzw. IgG1-4 in Menschen (36, 43)).

1.2. Calcium als Second Messenger

Als sogenannter „*Second Messenger*“ spielt Calcium bei der Entwicklung und Funktion vieler Zelltypen eine besondere Rolle. Es übernimmt dabei die Aufgabe der Kommunikation zwischen Zell-Innen- und Zell-Außenwelt, d.h. überträgt und übersetzt biochemische oder elektrische Signale inter- und intrazellulär. Die bivalenten Metallkationen sind dabei besonders gut für die Interaktion mit Proteinen geeignet. Ihre hohe Löslichkeit in Wasser, ihre besonders guten Diffusionseigenschaften, sowie die Fähigkeit, mit Carboxyl (C-OH)- und Carbonylgruppen (C=O) der Aminosäuren (zwei freie Elektronen) stabile chemische Bindungen einzugehen, machen Calcium zum idealen Signalüberträgermolekül. Die Calciumionen können dabei aus dem umliegenden Medium oder aus dem Zellinneren stammen. Jeder Zelltyp besitzt eine eigene Ausstattung an Ionenkanälen, Pumpen und Enzymen für die Verarbeitung dieser Signale und zur Aufrechterhaltung eines Gradienten zwischen Zellinnerem und Zelläußerem. Beispiele für Calciumkanäle sind die spannungsabhängigen VOC (*voltage operated calcium*)-Kanäle in Muskel- und Nervenzellen, der ebenfalls neuronale, durch Glutamat aktivierte NMDA (N-methyl-D-Aspartat)-Rezeptor, oder die durch Calciumdepletion aktivierten CRAC (*calcium release activated channel*, Calciumausstrom-aktivierte)-Kanäle auf B-Zellen (44). Auf B-Zellen gibt es (im Gegensatz zu T-Zellen) darüber hinaus noch transiente Rezeptorpotential-Kationenkanäle Typ C (TRPC), deren Funktion zum Teil redundant ist (45). Es existieren unterschiedliche Formen von Calciumsignalen, die unterschiedliche Prozesse stimulieren und in verschiedensten zeitlichen Dimensionen operieren. Der Einstrom von Calcium in die Zelle kann transient (d.h. interne Speicher werden geleert und die Calciumkonzentration in der Zelle erhöht sich nur für Sekundenbruchteile) oder nachhaltig sein, wenn zusätzlich zur Leerung der intrazellulären Calciumquellen der Einstrom von Ionen von außen stattfindet. Dies kann z.B. folgendermaßen sichtbar gemacht werden: Am Durchflusszytometer können nach Stimulation des BCR zweiphasige Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration (durch den Umschlag der Intensität von Farbstoffen) gemessen werden. Der erste Peak resultiert dabei aus dem Ausströmen der Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), der zweite kommt zustande, wenn Calcium von außen nachströmt und ist meist verlängert (46, 47). Die zeitliche Form der Calciumantwort in der Zelle ist außerdem je nach Differenzierungsstatus der B-Zellen verschieden, beispielsweise in transitionalen B-Zellen im Vergleich zu Marginalzonen-B-Zellen. Reife B-Zellen besitzen einen größeren Calciumeinstrom von außen als unreife (48). Auch tragen noch andere Organellen (z.B. Mitochondrien) zur Ausschüttung von Calciumionen und Aufrechterhaltung eines Spiegels bei (49). Die verschiedenen Aktivierungsmuster des Calciumeinstroms können unterschiedliche Transkriptionsfaktoren als Effektoren aktivieren, welche die Expression von Genen (und damit auch Differenzierung und/oder Proliferation) ermöglichen (s.u. am Beispiel von B-Zellen) (35). Als molekulare Grundlage der differentiellen Calciumantworten können sogenannte *membrane zip codes* angesehen werden. Dieser Begriff bezeichnet eine Anzahl reaktiver Domänen in signalübertragenden Membranproteinen, die durch Phosphatasen wie die SH2-Domäne-besitzende Phosphatase 1 (SHP-1) hemmend oder fördernd reguliert werden (50).

1.2.1. Calcium in B-Zellen

Die intrazelluläre Calciumkonzentration in B-Zellen beträgt im Ruhezustand etwa 100nM und liegt damit 10000-fach niedriger als die extrazelluläre (in Standard-Zellkulturmedien etwa zwischen 1-2mM). Im Aktivierungszustand steigt durch den gradientenbedingten Einstrom von außen der Calciumgehalt in der B-Zelle um das bis zu Zehnfache an (51).

BCRs besitzen im Inneren der Zelle signalweiterleitende Domänen (I α /I β). Die Stimulation des BCR durch Antigen führt nach neuesten Erkenntnissen zur Freilegung dieser Rezeptordomänen (siehe 1.3.). Jedes Ig des Heterodimers besitzt ein sieben Aminosäuren langes Motiv, das sog. ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv). Werden die zwei Tyrosinreste jedes ITAMs durch BCR-Aktivierung phosphoryliert, kann die Kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*, Milz-Tyrosin-Kinase) binden und verschiedene nachgeschaltete Moleküle aktiviert werden, die schließlich die internen Calciumspeicher des ER leeren. Zunächst initiiert Syk die Komplexbildung aus den Signalüberträgerenzymen Bruton's Tyrosin Kinase (Btk), B-Zell-Linker-Protein (BLNK, auch SLP-65) und Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2). PLC- γ 2 erzeugt aus Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) Diacylglycerin und Inositol-3-phosphat (IP₃). PIP₂ wiederum wird durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Weg zu PIP₃ umgebaut, welches den Calciumeinstrom zusätzlich positiv beeinflusst. Das entstandene IP₃ öffnet Kanäle auf dem ER, sodass Calciumionen ausströmen können (46, 51). Dieser Ausstrom führt zu einer Verlagerung des stromalen Interaktionsmoleküls 1 (STIM1) und dessen Andocken an CRAC-Kanäle auf der Plasmamembran der Zelle. Dies wiederum führt zu Calciumeinstrom, ein Prozess, der als Speicher-gesteuerter Calciumeinstrom (*store-operated calcium entry*, SOCE) bezeichnet wird (52).

Nachgeschaltete Signalwege der Calciummobilisation

Die mit Calcium in Verbindung stehenden Signalwege in B-Zellen lassen sich unterteilen in BCR-abhängiges und BCR-unabhängiges Signaling (letzteres im Rahmen dieser Arbeit untersucht durch Stimulation von Korezeptoren). Es ist dabei sowohl für die normale Zellentwicklung als auch für das Verhindern von Autoimmunität, also dem Gewährleisten von Toleranz essentiell. Zwei der wichtigsten BCR-abhängigen, Calcium-sensitiven metabolischen Wege sollen hier genannt werden: Der Proteinkinase C (PKC) -vermittelte Weg, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear factor 'kappa light chain' enhancer of activated B cells*, kappa-Leichtketten-Enhancer-Kernfaktor aktivierter B-Zellen) führt sowie der Calcineurin-vermittelte Weg, der zur Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*, Kernfaktor aktivierter T-Zellen, traditionell vor allem der Aktivierung von T-Zellen zugeordnet) führt.

Der NF- κ B-Signalweg wird aktiviert, wenn das PLC- γ 2 Produkt DAG die PKC zur Plasmamembran rekrutiert. Die volle Aktivierung der PKC benötigt dann Ca²⁺-Ionen, welche in der Calciumaktiven Domäne C2 binden. Im Ruhezustand wird NF- κ B durch einen inhibitorischen Adapter-Proteinkomplex gehemmt. Dieser wird durch PKC-Produkte über mehrere Schritte für die proteasomale Degradation markiert (Abbildung 8). Die frei gewordene NF- κ B-Einheit kann damit in den Kern translozieren (53).

Nachhaltig einströmendes Calcium führt zu Calmodulin (CaM)-Calcineurin-Interaktion. Ca^{2+} -Ionen binden an die CaM-Untereinheit von Calcineurin, welches die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT katalysiert. NFAT kann im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern translozieren, wo es die Transkription von mehreren Genen anschaltet. Die Bedeutung dieses Wegs wurde ausführlich in Bezug auf T-Zell-Hilfe beschrieben, wobei defekte Elemente der Calcium-Signalgebung (ORAI1², STIM1) bei Patienten zu einer SCID-ähnlichen Erkrankung (*severe combined immune deficiency*, schwerwiegende Immundefizienz) und der Beeinträchtigung einer wirksamen Antikörperproduktion führen können (54, 55). In T-Zellen kontrolliert NFAT die Expression von Rezeptoren wie CXCR5, PD1-ICOS, Liganden wie CD40L oder Zytokine wie IL-21 (56). In B-Zellen steuert NFAT beispielsweise die Expression von IL-4 und führt zu wichtigen Prozessen, die die GC-Reaktion antreiben, da gezeigt werden konnte, dass die Deletion von Calcineurin zur Beeinflussung des NFAT-Weges zu einer abnormalen GC-Architektur, einer verminderten Proliferation und einem Defekt der Plasmazellenentwicklung führt (57).

Neben dem BCR gibt es weitere Rezeptoren auf der B-Zell-Oberfläche, welche die Intensität und Dauer der Calciumantwort mitbestimmen. Aktivierende Faktoren sind CD19, CD21 und CD81. CD19 setzt beispielsweise den Schwellenwert für den Calciumeinstrom herab, da es die PI3K, welche zur Produktion von PIP_2 beiträgt, aktiviert (58). CD22 und Fc γ RIIB setzen die Calciumantwort herab und tragen so maßgeblich zur Toleranzentwicklung bei (59, 60). Mutationen im Gen für CD22 spielen vermutlich bei der Ausbildung vieler Autoimmunkrankheiten eine Rolle.

Da neu entstehende B-Zellen zu etwa drei Vierteln autoreaktiv sind, ist es zur Verhinderung des Fortbestandes autoreaktiver BCR-Varianten essentiell, dass diese an verschiedenen Kontrollpunkten entsprechend ihrer Avidität (Summe der Affinitäten aller Bindungsstellen) geprüft werden (61). Bei diesen *checkpoints* entscheidet die Stärke des Calciumsignals darüber, ob die Zelle reifen, überleben und sich an der normalen Immunreaktion des Körpers beteiligen darf. Ist die Toleranz von Selbstantigenen nicht gewährleistet, kann das Immunsystem entweder durch Rezeptoreditierung im Knochenmark (Checkpoint 1), durch klonale Deletion in der Milz (Checkpoint 2) und im Keimzentrum (Checkpoint 3) oder durch das Stilllegen der Reaktionsfähigkeit der Zelle (Anergie) eingreifen (62). Interessanterweise zeigen B-Zellen, die konstant mit Antigen stimuliert werden, ohne T-Zellhilfe zu erfahren, diesen anergischen Status und dieser hängt mit einer anhaltend hohen Calciumkonzentration im Zellinneren zusammen (7, 63). Führt bei einer unreifen B-Zelle die Ligation mit einem Autoantigen zu einem starken Calciumeinstrom, wird die Zelle durch Apoptose zum Absterben gebracht. Umgekehrt führt in einer reifen B-Zelle ein starkes Calciumsignal, hervorgerufen von einem Fremdantigen, zum Anschließen der Signalkaskade und damit zur Herstellung von humoraler Immunität, ein schwaches, aber nachhaltiges Signal jedoch eher zu Anergie. Die Stärke des Calciumeinstroms durch SOCE bestimmt auch, ob NF- κ B aktiviert wird ($>500\text{nM}$) und zusammen mit NFAT (benötigt nur ca. 200nM) in den Kern transloziert (35, 64). Andere Modulatoren und SOCE-unabhängige Calciumkanäle können in diesen Prozess eingreifen und selektiv Calciumeinstrom fördern oder hemmen (Abbildung 8).

² Der Name „ORAI“ ist kein Akronym, sondern angelehnt an die griechische Mythologie (Hüter der Himmelstür) (46).

Die Stärke des BCR-Signaling entscheidet im Verlauf der B-Zellentwicklung weiterhin darüber, ob aus transitionalen B Zellen (also B-Zellen, welche ein Zwischenstadium zwischen unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark und reifen B-Zellen in der Zirkulation bzw. den Organen innehaben) Marginalzonen-B-Zellen oder folliculäre B-Zellen werden. Folliculäre B-Zellen migrieren aus dem Knochenmark in die SLO, wo sie in B-Zellfollikeln an der adaptiven Immunantwort teilnehmen und u.a. Keimzentren ausbilden (65). Marginalzonen-B-Zellen sind in der Milz heimisch und erkennen frühzeitig über das Blut transportierte Pathogene (66) (siehe auch 1.2.).

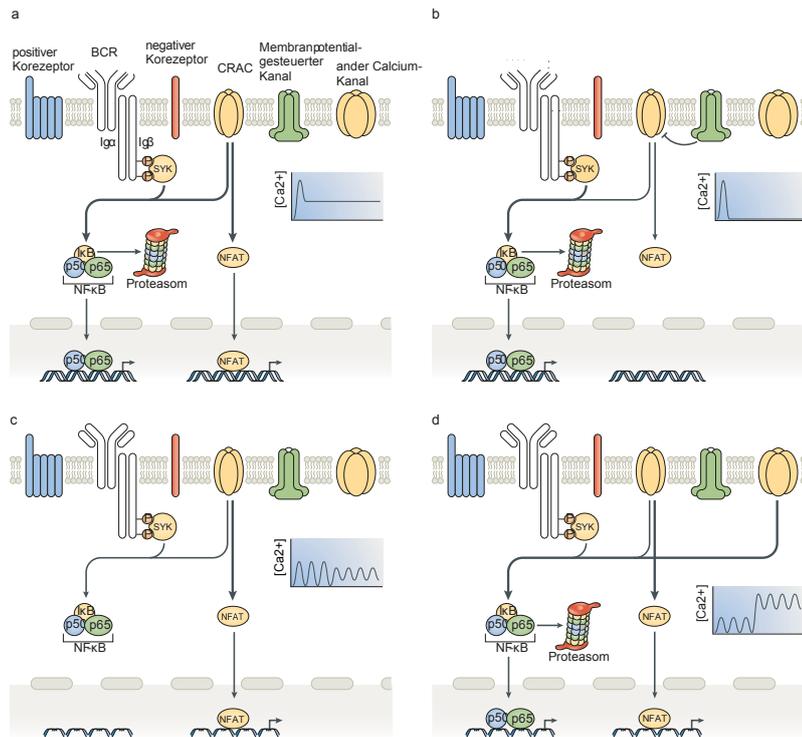


Abbildung 8: Modell der verschiedenen Calciumantworten und ihre möglichen jeweiligen Downstream-Effekte. a) Nachhaltiger, starker Calciumflux durch SOCE ermöglicht die Degradierung des κB -Inhibitors und schließlich die Translokation von NF- κB zusammen mit NFAT in den Kern. b) Membranpotentialmodulatoren attenuieren den Calciumflux und nur NF- κB kann selektiv in den Kern translozieren. c) Ein schwaches Oszillieren des Calciumspiegels sorgt für alleinige Translokation von NFAT. d) Ein nachhaltig oszillierender Calciumspiegel sowie die späte Aktivierung SOCE-unabhängiger Calciumquellen stellt die gemeinsame NF- κB und NFAT-Aktivierung wieder her (58), adaptiert.

Autoimmunkrankheiten

Autoimmunkrankheiten entstehen, wenn die Balance zwischen Toleranz körpereigener Proteine und Abwehr von Pathogenen gestört ist. B- und T-Zellen, deren Entwicklung hin zur Autoreaktivität nicht rechtzeitig vom Körper unterbunden wird, greifen daher normalerweise ungefährliche Zielstellen im eigenen Körper an. Dies kann alle Organsysteme betreffen. Beispiele für Autoimmunkrankheiten, bei denen dieser Toleranzverlust zumindest teilweise zum Krankheitsbild beiträgt, sind beispielsweise Multiple Sklerose (MS), eine Krankheit, die zu neuronaler Degeneration führen kann, Rheumatoide Arthritis mit einer allmählich fortschreitenden Einschränkung des Bewegungsapparates, Systemischer Lupus erythematoses (SLE), welcher unter anderem Haut und Nieren angreift und Sjögrens Syndrom, welches sich multisymptomal äußert, vor allem aber Drüsengewebsfunktionen beeinträchtigt (67, 68). Viele dieser Krankheiten werden zumeist mit einer Dysregulation der Calciumantwort in T-Zellen in Verbindung gebracht. Es

gibt aber auch Hinweise für Fehlfunktionen in der BCR-abhängigen Calciumantwort, vor allem aus der Arbeit mit Mausmodellen. Defekte in der Modulierung des Calciumeinstroms durch CD22 und FcγRIIB, also einer fehlenden Inhibierung und damit Überaktivierung, wurden bereits mit dem Entstehen von Autoantikörpern in Verbindung gebracht (69, 70).

1.3. Modelle der BCR-abhängigen B-Zell-Aktivierung

Die zwei derzeit existierenden Modelle der BCR-Aktivierung werden als Vernetzungsmodell (*crosslinking-model*, CLM) und Dissoziationsaktivierungsmodell (*dissociation-activation model*, DAM) bezeichnet. Diese Hypothesen widersprechen sich zum Teil und wurden in der Vergangenheit ausführlich diskutiert. Forscher fanden, dass viele Gesichtspunkte der BCR-Aktivierung sowohl mit CLM als auch mit DAM erklärt werden konnten (71). B-Zellen besitzen mehrere hunderttausend Kopien von BCRs auf ihrer Plasmamembran. Es wurde gezeigt, dass die Rezeptoren nicht zufällig über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind. Vielmehr gruppieren sie sich als Oligomere in Mikrodomänen, die durch das Zytoskelett der Zelle geformt werden (72, 73). CLM, d.h. die B-Zell-Aktivierung durch Quervernetzung von BCRs ist seit Jahrzehnten das bevorzugte Modell, da gezeigt werden konnte, dass nur multivalentes Antigen in der Lage ist, ruhende B-Zellen zu stimulieren (74). Yang und Reth fanden 2010 heraus, dass BCR-Oligomere für die Signalübertragung dissoziieren müssen. Das DAM-Modell erklärt die Aktivierung von B-Zellen durch multivalentes Antigen wie F(ab)₂-Fragmente als einen Prozess, bei dem die Antigene die BCRs innerhalb sogenannter „Inseln“ in der Plasmamembran auseinander schieben, was ihre Dissoziation erleichtert (75). Sogenannte *Fab-Proximity Ligation Assays* sind eine elegante Methode, um diesen Prozess zu visualisieren (76). Dabei hybridisieren fluoreszierende Fab-Sonden mit BCRs. Das Signal ist stärker, wenn sich mehrere BCRs in nächster Nähe befinden und wird nach Aktivierung der B-Zellen schwächer, da sie auseinander driften. An anderen Stellen auf der Membran wiederum wird so die Öffnung der signalübertragenden Domänen unterstützt. Diese Methode half, die BCR-Aktivierung als mehrstufigen Prozess zu verstehen, der sich selbst verstärkt. Einige BCR-Oligomere öffnen sich bei Kontakt mit Antigen, während andere nicht reagieren. Die Phosphorylierungsstellen der BCR-Signaldomänen, die ITAMs, werden durch die Dissoziation der Rezeptoren für die Milz-Tyrosinkinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) verfügbar, was wiederum mehr ITAMs für die Phosphorylierung zugänglich macht (siehe auch Abbildung 53).

1.4. Förster-Resonanzenergietransfer

Das Phänomen des nach seinem Entdecker benannten Förster-Resonanzenergietransfers, kurz FRET, beschreibt die strahlungsfreie Weiterleitung von Energie zwischen zwei Molekülen durch Elektronenübertragung. Diesen Prozess macht man sich bei der Anregung von Fluorophoren zunutze. Es kann so Energie von einem Fluoreszenzfarbstoff auf einen anderen (hetero-FRET) oder auf ein zweites Molekül desselben (homo-FRET) übertragen werden, welche diesen wiederum zum Fluoreszieren anregt. Abhängig ist dieser Effekt nur vom Abstand zwischen den fluoreszenten Molekülresten (<100Å). Es können so zum Beispiel Enzym-Substrat Wechselwirkungen untersucht werden, oder, wie in dieser Arbeit, die Bindung eines Stoffes an einen Liganden, um dessen Vorhandensein nachweisen zu können. Im Falle des hier verwendeten

Calciumsensors TN-XXL bewirkt die Bindung von Calcium eine Konformationsänderung im Verbindungsprotein Troponin C (TnC) des Sensors, welcher die beiden Fluoreszenzfarbstoffe eCFP (blau) und Citrine (gelb) verbindet (Abbildung 9). Somit kann nach Anregung von eCFP (dem sogenannten Donor) bei Abwesenheit von Calcium eher Licht im blauen Spektrum detektiert werden, während bei Calciumbindung die Energie der Anregung auf Citrine (den Akzeptor) übertragen wird und somit die gelbe Fluoreszenz überwiegt³ (siehe auch Abbildung 13 und 1.5.2.). Anders gesagt wird die Fluoreszenz des Donors abgefangen (engl. *quenched*).

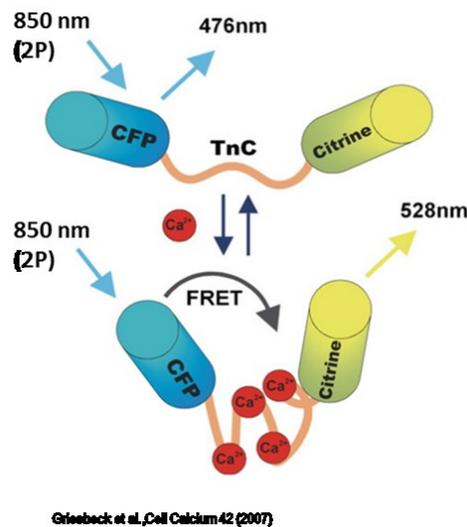


Abbildung 9: Schematische Darstellung des genetisch encodierten Calciumindikators TN-XXL. Das Donorfluorophor eCFP absorbiert bei Zweiphotonenanregung Licht der Wellenlänge 850nm und gibt Licht im blauwelligen Bereich des Spektrums ab, wenn kein Ca^{2+} gebunden ist. Wenn Ca^{2+} gebunden wird, überträgt der Donor Elektronen auf Citrine, da beide Fluorophore in entsprechende Nähe zu einander gelangen (*Quenching*). Licht im grün-gelbwelligen Bereich des Spektrums wird abgegeben (77).

1.5. Genetisch encodierte Calciumindikatoren

Für die Konstruktion genetisch encodierter Calciumindikatoren, kurz GECI, bedient man sich natürlich vorkommender Proteine aus Muskelzellen, welche Calcium-sensitive Domänen aufweisen, wie z.B. TnC und CaM, die zu diesem Zweck Helix-Loop-Helix-Motive besitzen (78, 79). Diese Domänen können mit Fluoreszenzproteinen gekoppelt werden. Hier besteht die Möglichkeit, das Protein entweder an eines oder an zwei Fluorophore zu linken. Wird das Protein mit zwei Farbstoffen verbunden, handelt es sich dabei um ein FRET-abhängiges System, das heißt, Energie wird von einem Donor auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen. FRET-unabhängige Systeme basieren, wie z.B. die Gcamp-Sensoren, auf der Erhöhung der Fluoreszenzintensität nur eines fluoreszierenden Moleküls (Abbildung 10). Als Fluorophore werden in beiden Systemen gängiger Weise mutierte Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) eingesetzt (80, 81).

1.5.1. Calciumindikatoren auf Basis einzelner Fluorophore

Zu den bekanntesten Calciumindikatoren, welche sich nur eines Fluoreszenzmoleküls bedienen, gehören die Sensoren aus der GCaMP-Familie (80). Diese Sensoren nutzen die Tatsache aus, das

³ Geht man von dem idealen Fall aus, dass alle Sensormoleküle in den Zellen korrekt gefaltet und mit Calcium gesättigt sind, würde nur blaues oder nur gelbes Licht detektierbar sein. Dies ist aber im vorliegenden Modell nicht der Fall.

GFP durch Insertion von längeren Aminosäureketten seine Funktion nicht einbüßt, daher konnte hier ein CaM-Insert eingesetzt werden, sowie ein Peptidabschnitt namens M13, den CaM wie im Calcineurin-Komplex bindet, um seine Reaktivität sicherzustellen (82). Bei Bindung von Calcium kommt es zur Deprotonierung des Fluorophors, was einen Shift des Absorptionsspektrums von 400nm nach 490nm zur Folge hat. Da es erst bei Anregungswellenlängen von 450-490nm überhaupt zur Fluoreszenz kommt, ist das Ergebnis der allmählichen Deprotonierung die Steigerung der Fluoreszenzintensität. Ein Nachteil ist die ebenfalls dadurch bedingte pH-Sensitivität. Einzelfluorophorsensoren haben weiterhin den Nachteil, dass mit ihnen keine Quantifizierung des Calciumeinstroms möglich ist, was nur im ratiometrischen FRET-System mit Fluoreszenzlebensdauerbestimmung möglich ist (siehe 2.2.7.).

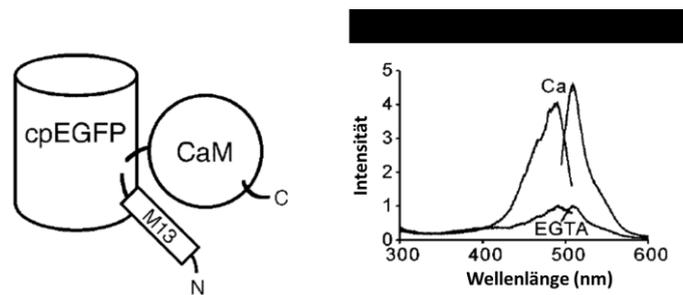


Abbildung 10: Aufbau des Einzelfluorophor-Calciumsensors GCaMP. Links: Schematische Darstellung der Anordnung von fluoreszierendem zirkulär permutiertem EGFP und Calmodulin mit M13-Domäne. Rechts: Anregungs- und Emissionsspektren des Gcamp-Sensors bei Anwesenheit von Calciumionen oder bei Chelatbildung durch EGTA (Ethylenglykol-Tetra-Essigsäure) (80), adaptiert.

1.5.2. FRET-basierte Calciumindikatoren

Zu den ersten GECI, die eingesetzt wurden, um Veränderungen des Calciumspiegels auf Einzelzellebene festzustellen, gehörten die *Cameleons* (Abbildung 11) (81). Die ursprüngliche Version des Cameleon-Sensors verband noch die Fluorophore blau fluoreszierendes Protein (BFP) und GFP. Da BFP sich als Donor jedoch ungeeignet erwies, da es eine geringe Photostabilität besitzt, wurde das FRET-Paar durch cyan fluoreszierendes Protein (CFP) und gelb fluoreszierendes Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) ersetzt (83). YFP wurde durch Punktmutationen anschließend weiterentwickelt zu Venus und Citrine, welche die gelbwellige Fluoreszenz beibehielten, jedoch deutlich heller sind als ihr Ausgangsprotein.



Abbildung 11: Aufbau des Cameleon-2 GECI. XCaM bindet Calcium und wickelt sich um die Calmodulin-bindende Domäne M13, welche ursprünglich aus der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase der glatten Muskulatur stammt. Dadurch erfolgt eine Konformationsänderung und Elektronen werden vom Donor BFP auf den Akzeptor eGFP übertragen (84).

Weitere Entwicklungen des Sensors schlossen schließlich zirkuläre Permutationen (Neuordnung der Aminosäuren und Ringstrukturbildung) des Akzeptors ein, was eine weitere Erhöhung des FRET-Signals bei Anwesenheit von Calciumionen gewährleistete. Da jedoch in den meisten Wirbeltieren genau wie in humanen Zellen Calmodulin und sein bindendes Peptid M13 natürlicherweise vorkommen, ist eine Falschbindung des Sensors an endogene Proteine

wahrscheinlich. Dies führte zum kompletten Ersatz von CaM durch TnC, welches im Herz- und Skelettmuskel vieler Spezies exprimiert wird und neben TnT und TnI Teil des Troponin-Komplexes ist, der für die Calcium-gesteuerte Kontraktion der Muskelzellen verantwortlich ist. Allerdings gelangt TnC auch ohne Anwesenheit der Bindungspartner zur korrekten Faltung. Da dieses Peptid normalerweise nicht in den standardmäßig untersuchten Wirbeltierzellen vorkommt, kann der Sensor nicht abgefangen werden und die Reaktionsstellen für Calcium bleiben frei zugänglich.

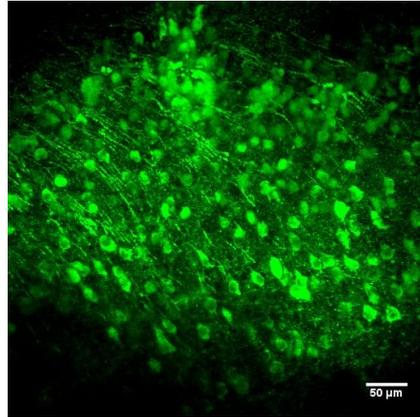


Abbildung 12: Maximalintensitätsprojektion durch einen Gehirngewebsschnitt einer Maus, deren Neuronen den Calciumsensor CerTnL15 exprimieren. Anhand der YFP-Fluoreszenz (grün) sind deutlich die Neuronen mit Zellkörpern und Axonen zu erkennen. Eigene Aufnahme.

Da TnC selbst kein Signalüberträger ist, wird die Kopplung an ein bindendes Peptid wie bei CaM hinfällig (85, 86). So entwickelte die Gruppe um Oliver Griesbeck zunächst den Sensor CerTnL15 (Abbildung 12) (87). Auch transgene Mäuse mit dem Sensor CerTnL15 unter Kontrolle eines neuronalen Promotors werden in unserer Gruppe eingesetzt (Abbildung 12). Aus diesem wurde durch strukturelle Veränderungen in den Helix-Loop-Helix-Motiven sowie den Fluorophoren schließlich TN-XL (86) und dessen zweite Generation TN-XXL, mit dem in Abbildung 13 dargestellten Emissionsspektrum (siehe auch Abbildung 9).

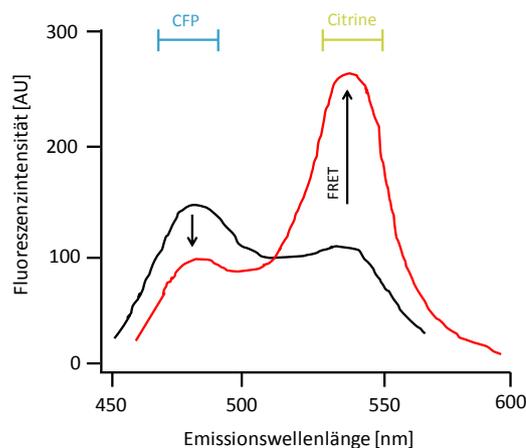


Abbildung 13: Fluoreszenzintensität von Donor- und Akzeptorfluorophor des GECI TN-XXL in Abhängigkeit der Calciumkonzentration (schematisch) (88), adaptiert

1.6. Offene Fragen

BCR-Signalwege sollen im Keimzentrum verschiedenen Forschungsergebnissen zufolge nur in wenigen B-Zellen aktiv sein. Die Mehrheit der Zellen hat diese Signalwege übergangsweise stillgelegt oder „kurzgeschlossen“, indem die Enzyme SHP-1 und SH2-Domäne-besitzende Inositol-5-Phosphatase in GC-B-Zellen hyperphosphoryliert sind (89–91). Nur ein kleiner Teil der B-Zell-Population der Follikel gelangt aufgrund ausreichend getesteter und für passend befundener BCRs in weitere Proliferations- und Selektionsrunden. Es erscheint somit nicht verwunderlich, dass die meisten BCR-Interaktionen keine Calciummobilisation nach sich ziehen. Würde es uns also gelingen, denjenigen Teil der Zellen, die ein hohes Maß an BCR-Signaling zeigen, durch unseren FRET-Sensor TN-XXL näher zu begutachten, könnten wir bestätigen, dass genau diejenigen B-Zellen, welche aktives BCR-Signaling betreiben, die Klone ausbilden, aus welchen sich später Antikörper-sezierende Zellen oder Gedächtnis-B-Zellen bilden. Dafür ist es notwendig, die Aktivierung von B-Zellen genauer zu charakterisieren. Wir erhoffen uns, so vor allem Informationen über die Motilität, den Kontakt mit anderen Zellen und die Signale zur terminalen Differenzierung der Zellen zu erhalten. Um die Frage zu beantworten, welche Rolle die Affinität des B-Zell-Rezeptors zum Antigen hierbei spielt, sollen antigenspezifische B-Zellen mit hoher und niedriger Affinität aus Spendertieren in Wirtstiere transferiert und verglichen werden. Fragen, die wir im Detail beantworten möchten, sind:

Können wir B-Zellen im Keimzentrum identifizieren, in denen BCR-vermittelte Signalwege aktiv sind? Wenn ja, welcher Informationsgehalt wird übertragen und woher stammen die Signale? Hat die Qualität der Signaltransduktion etwas mit der Affinität des Rezeptors zu tun? Verändern sich die Signale über die Zeit? Was bedeuten die Signale für das Schicksal der B-Zellen und ihre Entwicklung? Ist es möglich, dass das nach BCR-Aktivierung einströmende Calcium eine kritische Konzentration erreichen muss, damit die B-Zellen die Keimzentrumsreaktion verlassen? Welche anderen Signale haben Einfluss auf den Calciumspiegel? Und, allgemeiner:

Sind B-Zellen also möglicherweise selbst aktiv an der Erfüllung ihres Schicksals beteiligt?

1.6.1. Anspruch und Zielsetzung dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit möchten wir klären, welche Rolle der Signaltransduktion durch den BCR im Verlaufe der Affinitätsreifung zukommt. Traditionellerweise liegt das Hauptaugenmerk der Wissenschaft bei der Erforschung der zellulären Signalwege in Keimzentrumszellen auf T-Zell-vermittelten Signalen, und man gestand den B-Zellen und ihren Rezeptoren mit der Aufnahme und Präsentation von Antigenen lange Zeit eher strukturelle Aufgaben zu:

„In all cases, the emphasis and data have been focused on T cell-derived signals with selection driven by BCR-mediated AG uptake and consequent presentation to T cells, rather than from BCR signaling.“ – aus: Luo et al., 2018, Immunity 48, S.323 (92)⁴

⁴ "In allen Fällen lag das Hauptaugenmerk [vorangegangener Forschungsvorhaben], wie auch die Datenerhebung, auf Seite der T-Zell-vermittelten Signale, wobei die Selektion durch die BCR-vermittelte AG-Aufnahme und die nachfolgende Präsentation gegenüber T-Zellen gesteuert wurde und nicht durch die BCR-Signaltransduktion."

Selbstverständlich ist die Fähigkeit der B-Zellen zur Antigenaufnahme und –präsentation essentiell für das Zustandekommen stabiler T-B-Interaktionen, ohne welche ein Keimzentrum erst gar nicht entstehen könnte. Dennoch ist aufgrund neuerer Erkenntnisse davon auszugehen, dass B-Zellen nicht nur die passiven Teilnehmer der Keimzentrumsreaktion sind, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel intrazellulärer, eben auch durch Calcium vermittelter Prozesse, aktiv und in Kombination mit T-Zell-vermittelten Signalen ihr Zellschicksal beeinflussen. Mit den Experimenten dieser Arbeit soll diese These unterstützt werden. Hierfür bedienen wir uns der B-Zellen fluoreszenter B-Zell-spezifischer Calcium-Reportermause, der sogenannten YellowCaB-Mäuse (siehe 2.1.1. und 3.1.). Wir wollen die Lymphknoten lebender Tiere mit den Möglichkeiten der Intravitalmikroskopie untersuchen, um so die Zellbewegungen *in situ* und im natürlichen Kontext bei gleichzeitiger Analyse des B-Zell-intrinsischen Calciumspiegels zu beobachten. Hierfür tragen YellowCaB-Zellen den FRET-basierten GECI TN-XXL. Um die Umsetzbarkeit der Experimente am lebenden Tier zu bestätigen, soll zunächst die Funktionalität und Stabilität des GECI TN-XXL in der Zellkultur überprüft werden. Wir möchten damit zeigen, dass die B-Zellen der YellowCaB-Maus in der Lage sind, das FRET-Protein-Konstrukt ordnungsgemäß zu exprimieren und sicherstellen, dass dieses auf einströmende Calciumionen reagiert. Daher soll es im ersten Teil der Arbeit vor allem um den Beweis der technischen Machbarkeit einer funktionalen YellowCaB-Reportermaus gehen. In den darauffolgenden *in-vivo*-Experimenten soll das Entstehen von Keimzentren durch Immunisierung nach Transfer mit YellowCaB-Zellen zweier verschiedener Affinitäten für das Antigen untersucht werden. Wir wollen sehen, ob die B-Zellen zuverlässig in Keimzentren migrieren, dort ihre physiologische Funktion erfüllen und ausdifferenzieren ohne die Fähigkeit zum FRET zu verlieren. Es folgt die Analyse der Funktionalität der Reporter-B-Zellen im Keimzentrum der lebenden Maus. Dafür sollen vor allem Migrationsparameter (z.B. Momentangeschwindigkeit, Richtung, Zell-Zell-Kontakte) mit einer Änderung des FRET-Signals über die Zeit in Verbindung gebracht werden. Wir möchten ebenfalls sehen, wie sich diese Kennwerte über den Verlauf einer Keimzentrumsreaktion verändern und analysieren zu diesem Zweck verschiedene Stadien der Keimzentrumsreifung. Durch eine in unserer Gruppe etablierte Methode, die sog. *In-vivo*-Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM), wollen wir auch quantitativ analysieren, ob wir verschiedenen hohe Ca^{2+} -Konzentrationen innerhalb der Zelle verschiedenen Differenzierungsstadien zuordnen können. Wir wollen so klären, welche Rolle die Signalübertragung durch Calcium in B-Zellen nach Stimulation des BCR für ihre Differenzierung spielt. Da es sich bei einer Keimzentrumsreaktion um einen hochdynamischen Prozess handelt, schließt diese Dissertation Videomaterial (an den entsprechenden Stellen durch S-Nummern gekennzeichnet) auf einem beigefügten Speichermedium ein. Die qualitative Analyse des bewegten Bildes ist neben den quantitativen Aussagen, die über die Calciumkonzentrationen in B-Zellen getroffen werden, ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Durch die Vernetzung dieser Herangehensweisen erhoffen wir uns Antwort auf die unter 1.5. gestellten Fragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

C57BL6/J-Tiere

Mäuse vom Stamm C57-„Black Six“ besitzen einen standardisierten, als Wild-Phänotyp bezeichneten genetischen Hintergrund durch Inzucht. Diese Tiere wurden als Rezipienten transgener Zellen eingesetzt. Die Tiere wurden nach dem Zelltransfer immunisiert und anschließend nach unterschiedlichen Zeitspannen mittels Intravitalmikroskopie untersucht.

ThX-Tiere

Werden Zellen adoptiv in Empfängertiere transferiert, landet ein Großteil dieser Zellen in der Lunge, aber nur wenige in den lymphatischen Organen. Dies stellt ein generelles Problem von Zelltransferexperimenten dar. Die Einwanderung von Donorzellen muss daher entweder durch hohe Zellzahlen oder die Spezifität der Donorzellen begünstigt werden. Eine dritte Möglichkeit ist, unspezifische Zellen in einen spezifischen Wirt zu transferieren. Beim ThX-Tierstamm handelt es sich um Mäuse, deren B-Zellen zu ca. zwei Dritteln einen transgenen BCR tragen. Der BCR dieser Tiere ist spezifisch für das Myelinoligodendrozytenprotein (MOG), ein für unsere Versuche irrelevantes Protein (93). Die meisten der transgenen B-Zellen der ThX-Tiere können nicht auf 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-Huhn-Gamma-Globulin (NP-CGG), welches hier zur Immunisierung verwendet wurde, reagieren. Es entsteht somit eine Leerstelle, die bevorzugt durch transferierte, polyklonale B-Zellen gefüllt werden kann, welche die Möglichkeit haben, auf das Hapten NP zu reagieren. Dieses Verfahren stellt sicher, dass auch zunächst nicht-antigenspezifische Donorzellen im Empfängertier in Keimzentren wieder auffindbar sind.

CD19:TN-XXL-Tiere (YellowCaB)

Diese Tiere sind Nachkommen der Verpaarung von Rosa26:TN-XXL-Tieren mit CD19cre-Tieren. Rosa26:TN-XXL-Tiere tragen die genetische Veränderung codierend für den TN-XXL-Calciumsensor in allen Körperzellen, er gelangt jedoch durch ein zusätzliches Stoppcodon nicht zur Expression. Die CD19⁺ B-Zellen dieser Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase (causes recombination, erzeugt Rekombination). Diese schneidet bei Verpaarung mit den Rosa26:TN-XXL-Tieren das Stoppcodon heraus, wodurch die Nachkommen den Calciumsensor TN-XXL unter Kontrolle des CD19-Promotors, d.h. in B-Zellen, exprimieren. Wir gaben diesen Nachkommen den Namen YellowCaB (siehe auch 3.1.).

B1-8hi und B1-8lo Tiere

Die Plasmablasten und Plasmazellen der Mäuse des B1-8-Stammes produzieren ausschließlich Antikörper, die durch eine Mutation in der schweren Kette des Immunglobulins für das Hapten NP spezifisch sind. Anders ausgedrückt, bindet der BCR mit einer gewissen (im Vergleich zu naiven B-Zellen), erhöhten Affinität an das Antigen. B1-8hi-Tiere besitzen im Gegensatz zu kanonischen B1-8-Tieren dabei um den Faktor 10 höher affine NP-spezifische BCRs (ca. $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), B1-8lo-Tiere um den Faktor 4 weniger affine BCRs als kanonische B1-8-B-Zellen ($1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (94). Dabei sind die B1-8lo-B-Zellen jedoch noch immer affiner für NP als naive B-Zellen.

B1-8hi:YellowCaB bzw. B1-8lo:YellowCaB-Tiere

Diese Tiere sind Nachkommen aus der Verpaarung von YellowCaB-Tieren mit B1-8hi oder B1-8lo d.h. ihre B-Zellen sind NP-antigenspezifisch mit hoher und niedriger Affinität und tragen den Calciumsensor TN-XXL. Dieses System ermöglichte uns, die Calciumantwort abhängig von der Affinität zu einem Antigen zu vergleichen.

2.1.2. Antikörper und Antigene

	Hergestellt in	Hersteller, Hauptsitz
Anti-GFP-Alexa488	Ziege	Rockland (DRFZ-labeled) Boyertown, USA
Anti-IgD-Alexa546	Ratte	DRFZ, Berlin, D
Anti-CD21/35-Fab-Atto590	Ratte	DRFZ, Berlin, D
Anti-IgD-Alexa594	Ratte	DRFZ, Berlin, D
Anti-CD21/35-Alexa647	Ratte	DRFZ, Berlin, D
Anti-CD19-Cy5	Ratte	DRFZ, Berlin, D
Anti-CD40	Ratte	BD Bioscience, San Jose, USA
Anti-IgM-F(ab)₂	Armenischer Hamster	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-kappa	Ratte	DRFZ, Berlin, D
CpG	-	TIB Molbiol, Berlin, D
Erdnuss-Agglutinin (PNA)	-	Vector Laboratories, Burlingam, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	Escherichia coli	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
NP-CGG Ratio >20 (Kopplungsrate)	-	Biocat, Heidelberg, D

2.1.3. Lösungen und Medien

	Zusammensetzung	Hersteller, Hauptsitz
Azid-Zitrat-Dextrose (ACDA)	Azid-Zitrat-Dextrose	Merck, Darmstadt, D
	PBS	DRFZ, Berlin, D
Blockpuffer für Immunfluoreszenzfärbung	1% BSA	PAA Laboratories, Cölbe, D
	0,1% Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	PBS	DRFZ, Berlin, D
	Rattenserum	Life Tech., Waltham, USA
Erythrozyten-Lysis-Puffer pH 7,2	144 mM NH ₄ Cl	Roth, Karlsruhe, D
	17 mM Tris	Roth, Karlsruhe, D
Krebs-Ringer-Lösung pH 7,2	10mM HEPES	Roth, Karlsruhe, D
	140mM NaCl	Th. Geyer, Renningen, D
	4mM KCl	Roth, Karlsruhe, D
	6mM CaCl ₂ · 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe, D

	10mM Glucose	Merck, Darmstadt, D
0,95% Kochsalzlösung	-	B.Braun, Melsungen, D
Komplettes Freundsches Adjuvanz	1mg/ml Mycobacterium tuberculosis (hitzeinaktiviert)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	0,85ml/ml Paraffinöl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	0,15ml/ml Mannid-Monooleat (Wasser-in-Öl-Emulsion)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Narkose	Ketamin 50mg/ml	Inresa, Freiburg, D
	Xylazin 20mg/ml	Bayer, Leverkusen, D
	Kochsalzlösung	B.Braun, Melsungen, D
Paraformaldehydlösung (PFA) 1%	PFA (20%)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
	PBS	DRFZ, Berlin, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2	137mM NaCl	Merck, Darmstadt, D
	2,7mM KCl	Merck, Darmstadt, D
	1,5mM KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
	8mM Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O	Merck, Darmstadt, D
PBS/BSA pH 7,2	0,5% Rinderserum-Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe, D
	PBS	DRFZ, Berlin, D
Puffer für B-Zell-Isolation	1% BSA	PAA Laboratories, Cölbe, D
	2mM EDTA	life technologies, Waltham, USA
	PBS	DRFZ, Berlin, D
Puffer für Zelltransfer	1mM HEPES	Merck, Darmstadt, D
	Gentamicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	2,5% ACDA	Merck, Darmstadt, D
	PBS	DRFZ, Berlin, D
RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium	life technologies, Waltham, USA
	10% fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, D
Saccharose-Lösung (15-30%)	Saccharose	Roth, Karlsruhe
	PBS	DRFZ, Berlin, D
Waschpuffer für Immunfluoreszenzfärbung	0,1% Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	PBS	DRFZ, Berlin, D

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

	Hersteller	Hauptsitz
DC4 Isolationsfett	Dow Corning	Midland, USA
Ethanol 96%	Roth	Karlsruhe, D
Forene ®	Isofluran	Chicago, USA
Methylbutan	Roth	Karlsruhe, D
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Isopropanol	Roth	Karlsruhe, D

Prolong Gold Antifade Eindeckelmedium	Life technologies	Waltham, USA
Tissue Tek O.C.T. Einfriermedium	VWR	Radnor, USA
X-Rhod-1	Life technologies	Waltham, USA

2.1.5. Geräte

	Hersteller	Hauptsitz
Beheizbarer Objektisch	PeCon	Erbach, D
Cryotom	Thermo Fisher	Jena, D
Digitalthermometer	Greisinger Electronic	Regenstauf, D
Energieversorgung	Voltcraft (Conrad Electronic)	Wollerau, SUI
Fortessa Durchflussszytometer	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
MACS Quant Durchflussszyt.	Miltenyi	Bergisch-Gladbach, D
Objektivheizung	Tokai Hit	Shizuoka, J
Poc-R2 Perfusionskammer	PeCon	Erbach, D
Thermocycler	Biometra	Göttingen, D
Umwälzpumpe (Heizschlauch)	Watson-Marlow	Wilmington, USA
Umwälzpumpe (Zellkultur)	Ismatec	Wertheim, D
Zeiss LSM 710	Carl Zeiss	Jena, D
Zweiphotonenmikroskop	La Vision Biotech	Bielefeld, D

2.1.6. Software

	Entwickler	Hauptsitz
FlowJo	Tree Star	Ashland, USA
Graphpad Prism 5	Graphpad Software	La Jolla, USA
ImageJ, FIJI	NIH open source	Bethesda, USA
Imaris	Bitplane	Zürich, SUI
Matlab	Mathworks	Natick, USA
Python	Python Software Foundation	Wilmington, USA
ZEN2009	Carl Zeiss	Jena, D

2.2. Methoden

2.2.1. Zellisolation

Die Isolation von primären Lymphozyten erfolgte aus der Milz von entsprechenden Reportertieren. Dazu wurde die Milz entnommen und steril durch einen Nylonfilter mit einer Maschengröße von 100µm zerrieben, in 1x PBS aufgefangen und 10min bei 300g und 4°C zum Waschen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml Puffer zur Lyse der Erythrozyten aufgenommen. Die Reaktion wurde nach 5-10min durch Zugabe von PBS/BSA abgestoppt, die Zellen nochmals gewaschen und in 10ml 1xPBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Kammer oder Durchflusszytometer gezählt.

Die B-Zell-Isolation erfolgte durch das Magnetsäulensystem von Miltenyi (*magnetic assisted cell sorting*, MACS). Bei dieser Isolationsmethode handelt es sich um eine negative Zellisolation, d.h. es werden alle Nicht-B-Zellen mit einem Antikörper-Cocktail markiert. Ein zweiter Antikörper, welcher selbst an magnetische Perlen (*Microbeads*) gebunden ist, bindet über eine Biotinylierung an diese Antikörper. Wird der Zell-Antikörper-Mix anschließend durch eine in einem Magnet eingespannte, metallische Säule gefiltert, bleiben alle Nicht-B-Zellen in der Säule zurück und die B-Zellen werden unangetastet eluiert. Je zehn Millionen Gesamtzellen werden 40µl MACS-Puffer benötigt und 10µl Primärantikörper. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 4°C mit werden weitere 30µl Puffer je zehn Millionen Zellen hinzugefügt sowie 20µl anti-Biotin-Microbeads (je 10 Millionen Zellen) und für weitere zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgt die Aufreinigung über die Magnetsäule. Die Säule wurde nochmals mit einem Puffervolumen von 3ml gespült. Die eluierten B-Zellen werden anschließend wiederum in der Neubauer-Kammer oder am Durchflusszytometer gezählt.

2.2.2. Konfokalmikroskopische Untersuchung von lebenden B-Zellen

Zuvor auf einem mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckglas inkubierte B-Zellen, wurden in der Perfusionskammer mit Krebs-Ringer-Lösung (6mM Calcium) überspült. Das Medium sowie die Perfusionskammer wurden dabei mit Heizplatte und beheizbarem Objektivtisch konstant auf 37°C erwärmt (Abbildung 14). Die Zellen wurden mit anti-IgM-F(ab)₂ Fragment, anti-CD40-Antikörper, anti-kappa-Antikörper, Lipopolysaccharid, CpG-Oligonukleotiden oder Ionomycin stimuliert. Die Experimente mit einzelner Ionomycinstimulation wurden im offenen Perfusionssystem unter kontinuierlichem Durchfluss durchgeführt. Dabei wurde Ionomycin direkt in das Reservoir der einströmenden Pufferlösung hinzugefügt. Ein Volumen Ionomycin brauchte bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1,41% durchschnittlich 45 Sekunden, um in die Kammer zu gelangen. Dies entspricht 15 Frames, wenn alle 3 Sekunden ein Bild aufgenommen wird. Um die Reversibilität des Sensors in Gegenwart von stimulierendem Antikörper zu zeigen, wurde ein Teil der Experimente in offener Kultur durchgeführt, d.h. ohne Austausch des Mediums durch die Pumpe. Um zu zeigen, dass der Sensor mehrmals hintereinander stimuliert werden kann, wurden die Zellen in der Perfusionskammer kultiviert, der Antikörper direkt in die Kammer getropft und die Pumpe so bedient, dass der Antikörper nach einer gewissen Zeitspanne herausgewaschen und so neuer Antikörper aufgebracht werden konnte.

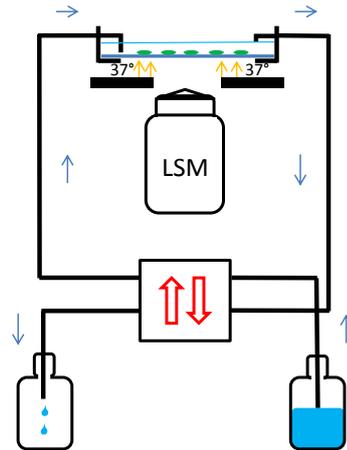


Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Perfusionssystems, in welchem die Stimulationen von YellowCaB-Zellen in Kultur durchgeführt wurden. Die Fluoreszenz wurde mit einem inversen Konfokalmikroskop (Laser Scanning Microscope, LSM) gemessen.

2.2.3. Histologie

Cryokonservierung von Organen

Entnommene Lymphknoten wurden zur Fixation vier Stunden in 1%igen PBS/PFA bei 4°C gelagert und anschließend zur Entwässerung in 15%ige Saccharoselösung überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Lymphknoten noch einmal in 30%iger Saccharoselösung bei 4°C eine weitere Nacht inkubiert. Zur Cryokonservierung wurde ein Trockeneisbad mit Ethanol übergossen und eine Schale mit Methylbutan hineingestellt, so dass das schnelle Herunterkühlen auf Minusgrade gewährleistet war. Die Lymphknoten wurden in TissueTec O.C.T. Medium eingebettet und durch kurzes Eintauchen in das abgekühlte Methylbutan gefroren. Anschließend wurden die Organe bis zur Herstellung von Gefrierschnitten bei -80°C gelagert.

Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden mit einem Cryotom hergestellt. Dazu wurde das in TissueTec O.C.T. eingebettete Organ in einer Umgebung von -20°C auf einen Schneidblock gespannt, ein Teil des Organs angeschnitten und schließlich im Abstand von 10µm Schnitte mit einer Dicke von 7-10µm hergestellt. Diese wurden auf Objektträgern fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Färbung mit Fluoreszenzantikörpern

Die cryokonservierten Schnitte wurden für die Färbung zunächst auf Zimmertemperatur aufgewärmt und mit PBS rehydriert (10min). Dafür wurden die Schnitte mit Wachs-Stift zur Herstellung einer hydrophoben Barriere umrandet. Diese verhindert, dass die Färbe- und Blocklösungen verlaufen. Diese werden direkt auf die Schnitte getropft und die Schnitte dann licht- und bewegungsfrei inkubiert. Zunächst wurden unspezifische Bindungen mit 10%igem Tierserum entsprechend der Hostspezies, in welchen die Antikörper hergestellt wurden, in Waschpuffer (PBS/BSA mit 0,1% Tween-20) geblockt (20min). Die Antikörper wurden in entsprechender Konzentration (welche zuvor durch Titration bestimmt wurde) in Waschpuffer gelöst und diese Antikörperlösung auf die Schnitte getropft. Nach einer Inkubationszeit (30-60min) wurde die

Antikörperlösung abgeschüttet und drei Mal mit Waschpuffer gespült. Nach Abschluss des Färbeprotokolls wurden die Schnitte mit aushärtendem Eindeckelmedium und einem zusätzlichen Deckglas fixiert.

2.2.4. Durchflusszytometrie

Bei der Fluoreszenzdurchflusszytometrie werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften von in einem Flüssigkeitsstrahl fokussierten Zellen gemessen. Eine durch den Lichtstrahl eines Lasers wandernde Zelle streut das Licht auf definierte Weise. Der in einem Winkel von 180° zum einfallenden Licht stehende *Forward Scatter* (FSC) detektiert so das Zellvolumen, der *Sideward Scatter* (SSC) im 90° -Winkel vor allem die Granularität der Zelle. Mit Antikörpern fluoreszenzmarkierte Zellen können mit verschiedenen Lasern angeregt werden, spezielle Filter ermöglichen dabei das Unterscheiden mehrerer Signale pro Laser. Fotomultiplier (die sogenannten FL-Kanäle) sammeln und detektieren Signale einer bestimmten Emissionswellenlänge (z.B. eines Fluoreszenzfarbstoffs) (Abbildung 15).

Die korrekte Expression des Sensors wurde durch Messung der Fluoreszenz von Citrine im GFP/FITC-Kanal (488nm Exzitation und Detektion bei 525/50nm, MACSQuant) überprüft. Die Fluoreszenz im blauen Kanal ist nicht bzw. nur sehr schlecht messbar, da das Signal von eCFP zum einen sehr dunkel ist und zum anderen durch die Laser der benutzten Geräte (BD Fortessa, MACSQuant) nicht optimal anregbar ist (CFP benötigt normalerweise eine Anregungswellenlänge von 432nm, die benutzten Geräte besitzen für die Anregung blauer Fluorophore nur einen 405nm-Laser). Diese Methode ist allerdings auch bei anderen Gruppen, die mit GECI arbeiten, etabliert (95).

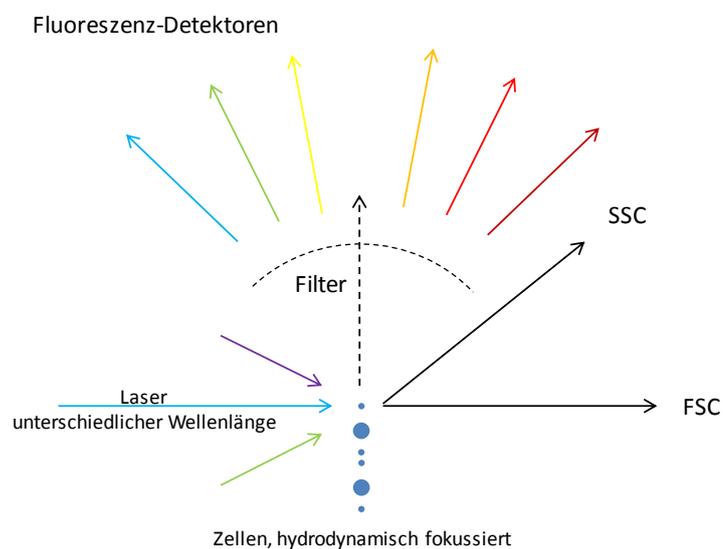


Abbildung 15: Detektion von Zelleigenschaften im Durchflusszytometer. Die Zellsuspension wird in das Gerät injiziert und der Flüssigkeitsstrahl so verdichtet, dass immer eine Zelle vom einfallenden Lichtstrahl getroffen wird. Verschiedene Detektoren (FSC, SSC, Fluoreszenz-Detektoren) wandeln die Signale in Spannungen um. Es können so Zellzahl, -größe, -form, und, je nach untersuchter Eigenschaft, der Zelltyp unterschieden werden.

Zum Test der Aktivität des Calciumsensors TN-XXL wurden die Zellen zusätzlich mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1 (*life technologies*) gefärbt. Die Erhöhung des

Fluoreszenzsignals im Kanal 610/20nm nach Anregung mit 562nm Laserlicht (BD Fortessa) dient dabei als interne Kontrolle für den Calciumeinstrom in die Zellen. Zur Messung des FRET-Signals wurden die Zellen mit 405nm-Laserlicht angeregt und die Fluoreszenz im 525/50nm-Kanal zeitabhängig gemessen. Da Citrine nicht durch 405nm anregbar ist, bedeutet eine Erhöhung der Fluoreszenz in diesem Kanal, dass Energie vom eCFP-Rest auf den Citrine-Rest des GEC1 übertragen wurde und somit der Sensor funktional ist. Die Messungen fanden in calciumhaltiger Ringerlösung statt.

2.2.5. Intravitaluntersuchung von Lymphozyten im Transfersystem

Zelltransfer

Die isolierten Gesamtzellen oder B-Zellen wurden den Mäusen in einem Volumen von 150µl-200µl in die laterale Schwanzvene injiziert. Dafür wurden die Tiere in einem Restriktor fixiert und der Schwanz zur Dilatation der Venen für 30s in 40°C warmes Wasser getaucht. Es wurden 5×10^7 naive YellowCaB-Zellen, 1×10^7 naive YellowCaB-Zellen bei Transfer in Thx-Tiere bzw. 3×10^6 antigenspezifische YellowCaB-Zellen verabreicht. Naive YellowCaB-Zellen, welche einen Tag vor der Bildgebung gespritzt wurden, wurden nach B-Zell-Isolation mit dem rot emittierenden Farbstoff (660nm) *Cell Tracker Deep Red* (life technologies) gefärbt. Dafür wurden die Zellen in 1xPBS mit 0,5µM Farbstoff für 35min im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und schließlich abzentrifugiert und gewaschen.

Immunisierung

Das Immunisat wurde durch Ultraschallsonifikation einer Emulsion aus NP-CGG-Lösung, 1xPBS und kompletten Freund'schem Adjuvanz (CFA) im Verhältnis 1:1,5:2,5 hergestellt. Zur Immunisierung wurde den Tieren 10µl Emulsion mit 10µg NP-CGG in den rechten Fußballen injiziert.

In vivo-Färbung von folliculären dendritischen Zellen

Die Markierung der FDCs erfolgte 12-24h vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchung. Dazu wurden die Tiere im Restriktor fixiert und 10µg Antikörper in den Fußballen injiziert. Die Antikörperlösung enthielt CD21/35-Fab-Fragmente die an den roten Fluoreszenzfarbstoff Atto590 gekoppelt wurden (laborintern). Anti-CD21/35 diffundiert binnen weniger Minuten über die Lymphe in den Lymphknoten und bindet an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche der FDCs, somit können die Zellkörper und retikulären Fortsätze dieser Stromazellen sichtbar gemacht werden.

Betäubung

Die Versuche, bei denen Intravitalmikroskopie angewendet wurde, fanden unter Betäubung der Versuchstiere statt. Die Dosierung der Injektionsnarkose beträgt 0,1mg/g Körpergewicht Ketamin und 0,01mg/g Körpergewicht Xylazin in physiologischer Kochsalzlösung. Zur Einleitung der Narkose wurde diese intraperitoneal verabreicht, dann zur Erhaltung intramuskulär. Für lange andauernde Aufnahmen am Lymphknoten (>1 Stunde) wurde nach Einleitung mit Ketamin/Xylazin auf eine Inhalationsnarkose mit 2-3% Isofluran und 97-98% Sauerstoff umgestellt. Dieses Gemisch wurde mit Hilfe eines Narkosegeräts für Labornager über eine Nasenmaske (beides von Summit Anesthesia Solutions) verabreicht. Zur Fußsohlenimmunisierung oder zum Zelltransfer wurden die Tiere mittels Isofluran-Inhalationsnarkose kurzzeitig betäubt.

Versuchsaufbau der intravitalmikroskopischen Untersuchung

Abbildung 16 zeigt den Versuchsaufbau der intravitalmikroskopischen Untersuchung der mit YellowCaB-Zellen an Tag 0 adoptiv transferierten Thx-Mäuse. Einen Tag nach der intravenösen Gabe der Zellen fand die Immunisierung in den rechten Fußballen statt. Für die Etablierung reifer Keimzentren wurde sechs Tage gewartet, anschließend der fluoreszenzmarkierte, gegen die Komplementrezeptoren 1 und 2 gerichtete Antikörper zur Lebendmarkierung der FDCs in den Fußballen gespritzt. Die Bildgebung erfolgt am nächsten Tag (Tag 7 p.i.) nach Freipräparation des poplitealen Lymphknotens (s.u.). Dafür werden die Tiere unter Injektionsnarkose gelegt (siehe „Betäubung“).

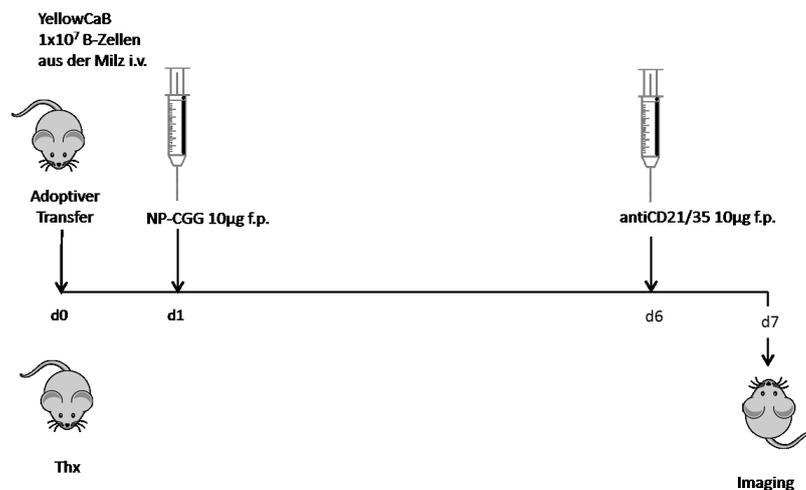


Abbildung 16: Zelltransfersystem mit nicht-antigenspezifischen YellowCaB-Zellen

Abbildung 17 zeigt den Versuchsaufbau der intravitalmikroskopischen Untersuchung der mit B1-8hi:- oder B1-8lo:YellowCaB-Zellen an Tag 0 adoptiv transferierten Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J). Da hier gleichzeitig der Verlauf der Keimzentrumsreaktion über die Zeit beobachtet werden sollte, haben wir immer drei Mäuse gleichzeitig mit Zellen transferiert und noch am selben Tag mit NP-CGG in den Fußballen immunisiert. Wie sich herausstellte, begünstigt die Immunisierung am selben Tag vor allem die Entstehung von B1-8lo-Keimzentren, da diese Zellen aufgrund ihrer geringeren Affinität in so geringer Zahl weniger gut in die Keimzentren einwandern. Um die Eigenschaften der antigenspezifischen Zellen mit den Eigenschaften nicht-antigenspezifischer (follikulärer, naiver) B-Zellen unterscheiden zu können, werden zusätzlich einen Tag vor Beginn der Bildgebung, also je Maus an Tag 6 p.i., Tag 9 p.i. oder Tag 20 p.i. YellowCaB-Zellen (nicht antigenspezifisch aber mit TN-XXL-GECI) gespritzt.

Präparation des poplitealen Lymphknotens für die Intravitalmikroskopie

Die Tiere wurden zur Vorbereitung für die Intravitalmikroskopie durch intraperitoneal verabreichte Narkose (siehe „Betäubung“) betäubt. Der hintere Rücken und das rechte Bein wurden mit Enthaarungscreme komplett von Fell befreit, so dass ein etwa 3mm langer Schnitt entlang des Oberschenkelknochens gesetzt werden konnte. Das Muskelgewebe rund um den Knochen wurde vorsichtig gelöst. Mithilfe einer speziellen Halterung (Abbildung 18, 2) wurde der Oberschenkelknochen an der stereotaktischen Plattform (ebd., 1) befestigt.

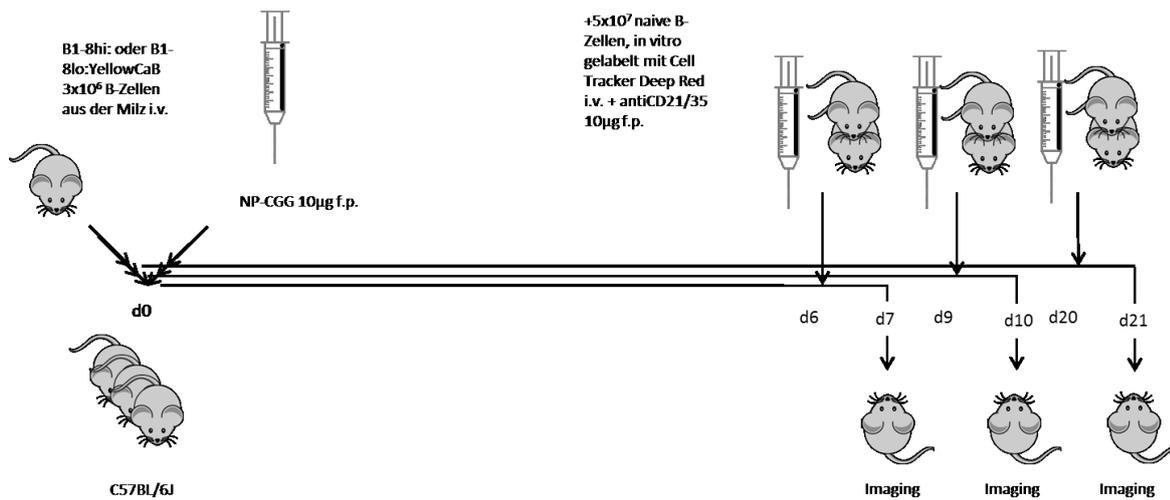


Abbildung 17: Zelltransfersystem mit antigenspezifischen B1-8:YellowCaB-Zellen unterschiedlicher Affinität

Durch eine Inzision über der Lendenwirbelsäule (Abbildung 18, 3) wurde die Maus zusätzlich an der Plattform fixiert und somit sowohl die Atmung unterstützt als auch die planare Position der Kniekehle für die Freilegung des Lymphknotens ermöglicht. Das rechte Bein wurde mit chirurgischem Nähmaterial fixiert. Unter dem Stereomikroskop wurde der popliteale Lymphknoten freigelegt. Dies geschah durch einen einfachen Hautschnitt und anschließendes Befreien von umschließendem Fettgewebe (Abbildung 18, unten, b). Die Kniekehle wurde durch Einsatz von Modelliermasse leicht erhöht, um den Lymphknoten in eine exponierte Position zu bringen. Um den freipräparierten Lymphknoten wurde ein Vaselining aufgetragen und dieser mit Kochsalzlösung gefüllt. Danach wurde die Präparation mit einem Deckglas abgeschlossen und mit einer Heizspirale auf Körpertemperatur erwärmt. Zur Kontrolle der Temperatur wurde ein Temperatursensor auf das Gewebe gelegt.

Zweiphotonenmikroskopie

Fluoreszenzmoleküle haben die Eigenschaft, dass ihre Elektronen durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge kurzzeitig in einen angeregten Zustand, das heißt auf ein höheres Energieniveau (Abbildung 19) übergehen. Beim Rückfallen auf den Grundzustand wird Energie in Form von Licht frei, das entweder mit bloßem Auge oder mittels bestimmter Detektoren gesehen und gemessen werden kann. Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie werden die Fluorophore dabei mit einem Photon des bestrahlenden Lichts der entsprechenden Wellenlänge angeregt und es wird ein längerwelliges Photon emittiert. Bei der Zweiphotonenmikroskopie regen jedoch zwei gleichzeitig eintreffende Photonen doppelter Wellenlänge die Elektronen an. Die Wellenlänge des abgestrahlten Photons ist dann stets halb so groß wie die des anregenden.

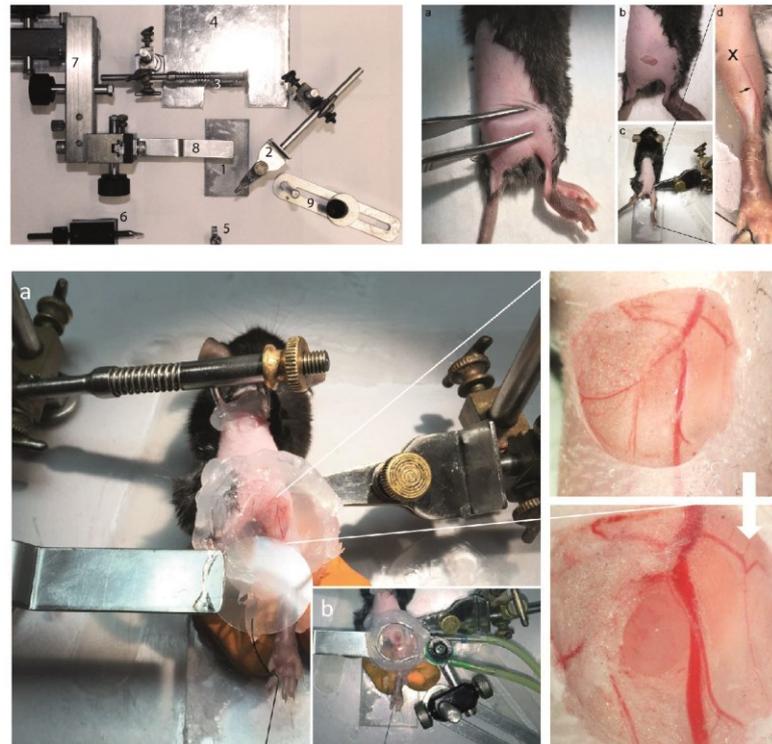


Abbildung 18: Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalmikroskopie. Oben links: Stereotaktische Plattform zur Fixierung der Maus für die Freilegung des poplitealen Lymphknotens. 1) Plattform zur Unterstützung der richtigen Positionierung des Hinterbeins, 2) Femurfixateur 3) Wirbelsäulenfixateur 4) Heizunterlage, die an einer Stromversorgung befestigt werden kann, 5) Schraube zum Aufwickeln des Fadens, der an einem 6) Haken zum Spannen des Beines befestigt wird, 7) 3D-Einstellung für 8) Halter des Deckglases, 9) Halter für den Heizwendel. Oben rechts: Ablauf der Operation. Zunächst wird ein kleiner Einschnitt über dem Oberschenkelknochen vorgenommen (a, b), um die Beinhalterung befestigen zu können (c). Ein zweiter Einschnitt wird direkt über dem Lymphknoten (d, schwarzes X) getätigt und das Fettgewebe entfernt (unten). Der freigelegte Lymphknoten wird mit Vaseline umrandet und mit Kochsalzlösung überdeckt (unten, a). Ein Deckglas wird aufgesetzt, ein Heizwendel wird darüber montiert (unten, b) (96).

Um diesen Effekt hervorzurufen, werden ultrahochfrequente, gepulste Laser verwendet. Da Licht der doppelten Wellenlänge nur halb so viel Energie besitzt und weniger Streuung hervorruft, kann dieses auch lebende Gewebe bis zu einer Tiefe von $1000\mu\text{m}$ durchdringen. Daher eignet sich diese Methode zur Untersuchung von Lebendgewebsschnitten oder zur Intravitalmikroskopie am lebenden Tier. Nur auf diese Weise ist es möglich, Zellen in ihrem natürlichen Kontext beobachten zu können, ohne dass Struktur, Temperatur oder Flüssigkeitsperfusion in einem Organ verändert würden.

Für die intravitalmikroskopische Bildgebung am Zweiphotonenmikroskop wurde der popliteale Lymphknoten mit Laserlicht der Wellenlänge 850nm bestrahlt und die Fluoreszenzsignale des GECI mithilfe vier verschiedener Detektoren (*Photomultiplier tubes*, PMTs) in den Kanälen $466/40\text{nm}$ (wobei 466nm die Wellenlänge der Mitte des aufnehmbaren Spektrums bezeichnet und 40nm die Breite des Kanals ist) und $525/50\text{nm}$ aufgenommen. Das FDC-Signal des Antikörpers anti-CD21/35-Atto590, welcher die Komplementrezeptoren (CRs) CR1 und CR2 auf den FDCs färbt, wurde im Kanal $593/40\text{nm}$ aufgenommen und die Signale der zusätzlich transferierten, mit *Cell Tracker Deep Red* gefärbten, follikulären B-Zellen im Kanal $655/30\text{nm}$.

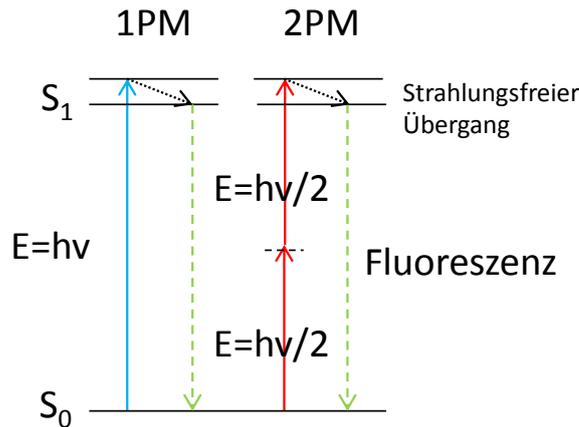


Abbildung 19: Jablonski-Diagramm zum Vergleich von Einphotonenanregung (blau) und Zweiphotonenanregung (rot). Um in den angeregten Zustand S_1 zu kommen, müssen die Elektronen mit Licht bestimmter Energie bestrahlt werden. Da längerwelliges Licht weniger Energie besitzt, ist für die Zweiphotonenanregung im Vergleich zur Einphotonenanregung nur Licht der halben Wellenlänge vonnöten, es müssen allerdings zwei Photonen gleichzeitig am Detektor eintreffen (möglich durch gepulste Laser). Bei der Relaxation in den Ausgangszustand wird Lichtenergie wieder freigesetzt, welche als Fluoreszenz wahrgenommen wird (grün), die bei Einphotonenanregung längerwellig, bei Zweiphotonenanregung aber kürzerwellig ist.

2.2.6. Ratiometrische Auswertung

Einzelzellanalyse der Zellkultur

Die Analyse der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen aus Kultur, welche zuvor mit 405nm-Laserlicht angeregt und während der Messung stimuliert wurden, erfolgte mithilfe des Programms Fiji/ImageJ. Die Zellen wurden mit dem Werkzeug für elliptische „Regions of Interest“ (ROI) umrandet und die Fluoreszenzintensität von eCFP und Citrine (gleichzeitig aufgenommen) bestimmt. Die Werte wurden als Rohintensitätsdichte in Excel exportiert und dort weiterverarbeitet. Zur Ermittlung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten R wurden die Werte für Citrine durch diejenigen von eCFP geteilt. Als Basislinie wurde die Zeit vor der Stimulation festgelegt und der Median dieser Werte über die Zeit gebildet. Dieser Wert wurde dann von R abgezogen ($=\Delta R$) und durch R geteilt. Ist die Calciumkonzentration in der Zelle erhöht, wird das blauwellige Signal des eCFP schwächer und das gelbe Signal des Citrinerestes nimmt zu. In der Konsequenz bedeutet dies einen Anstieg von $\Delta R/R$. Die resultierende Kurve wurde über die Zeit dargestellt.

Analyse der intravitalmikroskopischen Daten

Um die Bewegungen von Zellen und ihr Verhalten während der Bildgebung im poplitealen Lymphknoten verfolgen und auswerten zu können, ist es zunächst notwendig, das Bildmaterial nach Zellen zu segmentieren, d.h. festzulegen, welche Pixel zu Zellen gehören und welche nicht. Auf diese Weise lassen sich Regionen festlegen, die später statistisch analysiert werden und anhand von Motilitätsparametern, Größe und Helligkeit der intrinsischen Fluorophore (und damit Calciumeinstrom) analysiert werden können. Für diese Arbeit wurde das Programm Imaris, Versionen 8 und 9 (Bitplane AG) benutzt.

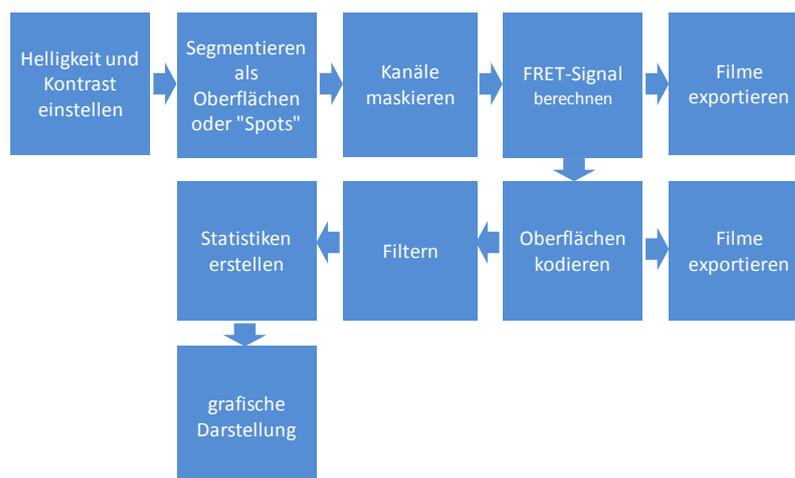


Abbildung 20: Prozess der Auswertung von intravitalmikroskopischen Daten

Die Segmentierung erfolgte dabei auf zwei unterschiedliche Arten: Entweder durch die Rekonstruktion der B-Zell-Oberfläche oder über die grobe Festlegung der Zellregionen als ellipsoide Spots mit automatischer Korrektur der Punktspreizfunktion. Die erste Methode ist vor allem bei der Analyse von Einzelzellen und dem Beobachten von Zell-Zell-Kontakten von Vorteil. Mit ihrer Hilfe können z.B. einzelne Verformungen und Ausstülpungen von Zellen sichtbar gemacht werden. Die zweite Analysemethode eignet sich besser, wenn ganze Populationen von Zellen in ihrer Gesamtheit untersucht werden sollen.

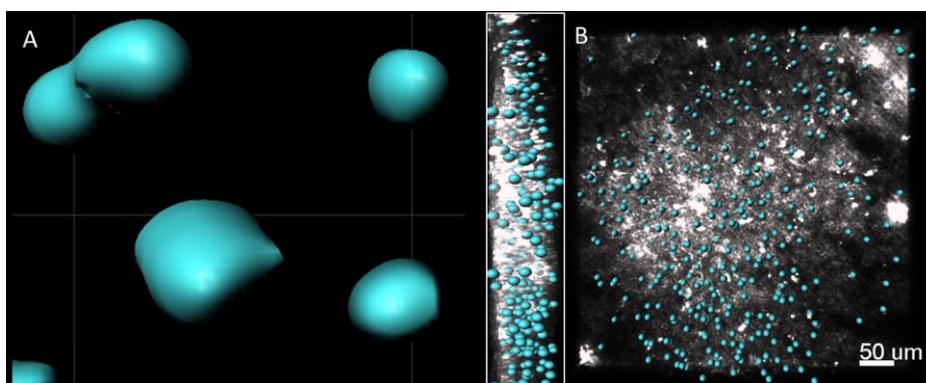


Abbildung 21: Beispiel für die Segmentierung der B-Zellen, A: mit Oberflächenrekonstruktion; B: mit Ellipsoiden (Darstellung mit Seitenansicht und FDC-Signal in weiß)

Zunächst müssen Helligkeit und Kontrast der Rohdaten korrigiert werden, bevor mit der Segmentierung begonnen werden kann. Die Segmentierung ist die Grundlage für das Maskieren der Zellen. Das bedeutet, dass der Hintergrund ignoriert und nur die Regionen, die mit der Segmentierung als Zellen gekennzeichnet wurden, für weitere Rechenoperationen benutzt werden (Alle Voxelwerte, die außerhalb der Oberfläche oder außerhalb der Ellipsoiden liegen, werden gleich Null gesetzt). Aus den verbleibenden Informationen kann nun das FRET-Signal berechnet werden. Die Berechnung berücksichtigt, dass die Fluoreszenz von Citrine jeweils etwa zur Hälfte in den Kanälen 466/40nm und 525/50nm liegt.

Die Signale von eCFP und Citrine überlappen im Kanal 525/50nm stark, sodass 52% des Helligkeitssignals von eCFP stammen und 48% von Citrine. Auch im Kanal 593/40nm ist noch Fluoreszenz beider Fluorophore detektierbar, allerdings soll dieser Bereich des Spektrums hier für die Berechnung des Gesamtsignals vernachlässigt werden, da die Intensitätsanteile von eCFP und Citrine in diesem Kanal nur gering sind und außerdem das Atto590-Signal der FDC-Färbung in diesem Bereich liegt. Weiterhin muss für die Berechnung des resultierenden Gesamtsignals beachtet werden, dass die Detektoren bautechnisch bedingt für die untersuchten Fluorophore nur eine Effizienz η von 37% im 466/40nm-Kanal (ch1) bzw. 40% im 525/50nm-Kanal (ch2) aufweisen.

Dementsprechend ergibt sich die Gleichung für die Gesamtfluoreszenzintensität für eCFP und Citrine:

$$I_{eCFP} = \frac{1}{0,37} * 1 * ch1 + \frac{1}{0,4} * 0,52 * ch2 = 2,7 \cdot ch1 + 1,3 \cdot ch2$$

$$I_{Citrine} = \frac{1}{0,37} \cdot 0 \cdot ch1 + \frac{1}{0,4} \cdot 0,48 \cdot ch2 = 1,2 \cdot ch2$$

Das FRET-Signal wurde ratiometrisch bestimmt als Quotient der Fluoreszenzintensität I von Citrine und der Summe beider Fluoreszenzintensitäten des Sensors TN-XXL:

$$\frac{I_{Citrine}}{I_{eCFP} + I_{Citrine}} \quad (1)$$

Somit ergibt sich als resultierende Gleichung für das ratiometrische FRET-Signal:

$$FRET = \frac{1,2 \cdot ch2}{2,7 \cdot ch1 + 1,3 \cdot ch2 + 1,2 \cdot ch2}$$

Da das FRET-Signal nach dieser Berechnung naturgemäß sehr kleine Werte annimmt, welche von der Software nicht zureichend verarbeitet werden können, und aus Gründen der besseren Darstellbarkeit, multiplizieren wir diese zusätzlich mit 100.

$$FRET = \frac{1,2 \cdot ch2}{2,7 \cdot ch1 + 2,5 \cdot ch2} \cdot 100 \quad (2)$$

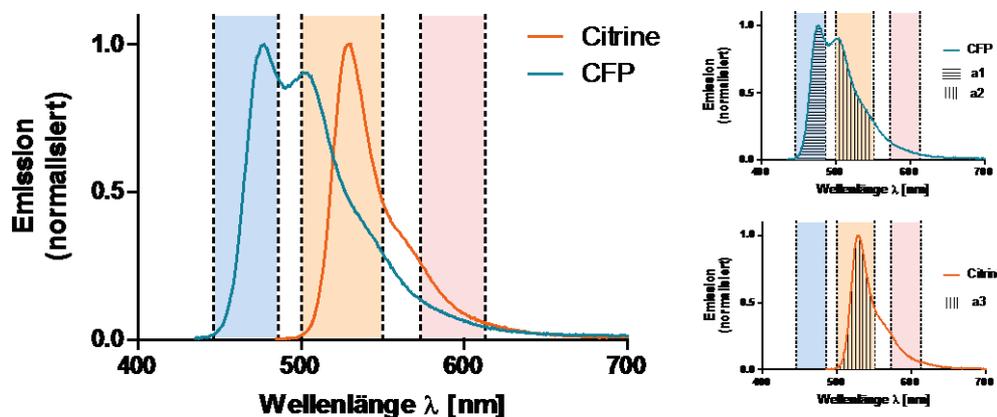


Abbildung 22: Fluoreszenzspektren von eCFP und Citrine mit Kennzeichnung der Kanäle, in welchen bei der intravitalmikroskopischen Bildgebung die Fluoreszenz der TN-XXL⁺ B-Zellen bzw. der FDCs aufgenommen wurde. Im Kanal 466/40nm (blau) beträgt die Fluoreszenz von eCFP 100%. Allerdings überlappen die beiden Fluorophore im Kanal 525/50nm (orange) signifikant. Der Anteil, welcher in den Kanal 593/40nm strahlt, wurde vernachlässigt (rot). Rechts: Die Anteile der Fluoreszenzintensität von eCFP und Citrine in den Kanälen wurden mit a1-a3 gekennzeichnet.

Die oben beschriebene Methode der ratiometrischen Auswertung intravitalmikroskopischer Daten ist ausreichend, um die Zustände von Zellen zu beschreiben, deren Calciumkonzentration in einem bestimmten Bereich liegt. In diesem Bereich bewegt sich das Verhältnis $\Delta R/R$ in Abhängigkeit der Calciumkonzentration annähernd in einem linearen Bereich (Abbildung 23). Wir können davon ausgehen, dass die FRET-Werte der Mehrheit der Zellen sich auf diese Weise gut darstellen lassen. Für die Beschreibung der Extreme jedoch müssen wir das Verhältnis $I_{\text{Citrine}} / I_{\text{eCFP}} + I_{\text{Citrine}}$ ergänzen.

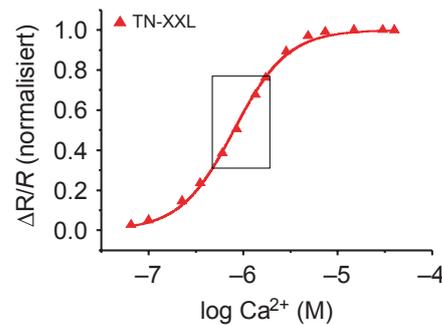


Abbildung 23: Titrationskurve des GECl TN-XXL in Abhängigkeit der Calciumkonzentration. In einem Bereich um den Wendepunkt (Kasten) ist der Anstieg der Kurve annähernd linear. Calciumkonzentrationen außerhalb dieses Bereichs (Extreme) werden nur von wenigen Zellen angenommen. Um diese erfassen zu können, muss die ratiometrische Auswertung mathematisch weiterentwickelt werden (s.u.) (97), adaptiert.

Grundannahme für die weiterentwickelte Gleichung ist die Tatsache, dass die Spektren der reinen Fluorophore eCFP und Citrine (Abbildung 22) in ihrer Form stets konstant sind und nur in der Intensität variieren. Allerdings ändert sich durch FRET das Verhältnis der Fluoreszenzanteile von eCFP und Citrine im Kanal 525/50nm zueinander. Das Verhältnis der Fluoreszenzanteile für eCFP in den Kanälen 466/40nm und 525/50nm bleibt jedoch durch die getroffene Annahme gleich.

Laut der ermittelten Koeffizienten für die Fluoreszenzanteile in den einzelnen Kanälen a_i (Abbildung 22) und unter Einbeziehung der Korrekturfaktoren für die Detektoren ($\eta_{466/40}=0,37$ und $\eta_{525/50}=0,4$) ergibt sich für das Gesamtsignal (also die Fluoreszenzintensität der gesamten Emissionskurve) von eCFP:

$$I_{\text{eCFP}} = ch1 \cdot \frac{1}{0,37} \cdot \frac{1}{a1}$$

Demnach ist der Anteil von eCFP im Kanal 525/50nm wie folgt definiert:

$$I_{\text{eCFPch2}} = ch1 \cdot \frac{1}{0,37} \cdot \frac{1}{a1} \cdot a2$$

Da das Verhältnis der Anteile von eCFP in den jeweiligen Kanälen gleich bleibt, genügt es nun, mit dem Anteil von eCFP im Kanal 525/50nm zu rechnen.

$$I_{\text{Citrine}} = a3 \cdot \left(ch2 \cdot \frac{1}{0,4} - ch1 \cdot \frac{1}{0,37} \cdot \frac{a2}{a1} \right)$$

Die Intensität der Kurven wird sich jedoch bei FRET verändern. Das bedeutet, dass der Anteil an eCFP im 466/40nm-Kanal abnimmt, während die Intensität von Citrine im Kanal 525/50nm um den gleichen Anteil zunimmt. Somit können wir für die Gesamtgleichung (1) (nach Kürzung) folgern:

$$FRET = \frac{a_3 \cdot (a_1 \cdot \frac{ch_2}{0,4} - a_2 \cdot \frac{ch_1}{0,37})}{a_1 \cdot a_3 \cdot \frac{ch_2}{0,4} + \frac{ch_1}{0,37} - a_3 \cdot a_2 \cdot \frac{ch_1}{0,37}} \cdot 100 \quad (3)$$

mit den Koeffizienten a_i entsprechend Abbildung 22. Wir haben diese Formel zum Errechnen des FRET-Signals bei Intravital-Experimenten der mehrwöchigen Keimzentrumsreaktionen verwendet (3.3.5.).

2.2.7. Fluoreszenzlebensdauerbestimmung

FLIM ist eine Technik zum Erzeugen von Bildern, deren Kontrast anstelle durch die Intensität eines fluoreszierenden Moleküls, durch die Lebensdauer τ seines angeregten Zustands berechnet wird. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Intensitätsstreuungen durch das Gewebe keine Rolle bei der Auswertung spielen. Jedes Photon, das bei der Fluoreszenz eines Fluorophors emittiert wird, hat eine bestimmte Lebensdauer. Anders gesagt besitzt die Fluoreszenz eine Abklingkurve, die dem Histogramm der pro Zeiteinheit aufgenommenen Photonen des Fluoreszenzsignals entspricht. Im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroskopietechniken hilft FLIM, Fluorophore mit überlappenden Emissionsspektren (wie die eCFP- und Citrinereste von TN-XXL) zu unterscheiden, da sie unterschiedliche Lebensdauern haben, je nachdem, ob sie gequencht (Donor-Akzeptor) oder ungequencht (nur Donor) vorliegen. Ist das Donor-Fluorophor eCFP gequencht, d.h. liegt es in seiner Energie-übertragenden Form in nächster Nähe zu Citrine vor (d.h. also findet FRET durch Ca^{2+} -Bindung statt), ist die Lebensdauer der Fluoreszenz von eCFP kürzer, als sie es in der ungequenchten Form, also bei Abwesenheit von Calcium, ist.

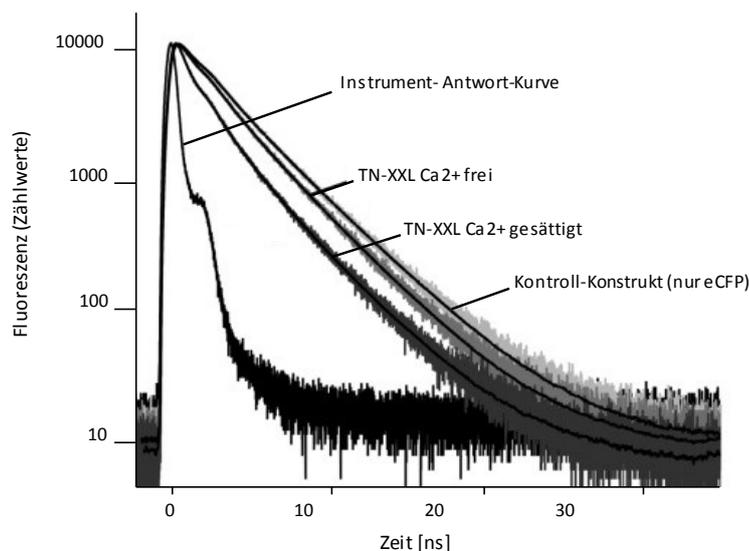


Abbildung 24: Abklingkurve der Donor-Fluoreszenz von eCFP von isoliertem TN-XXL-Konstrukt, sowie Instrument-Antwort-Kurve, welche eine gerätespezifische Konstante darstellt, die für die Auswertung der FLIM-Daten ebenfalls zu beachten ist. TN-XXL zeigt bereits ein initiales Quenching, da die Lebensdauer von eCFP in Ca^{2+} -freiem Medium bereits geringer ist als die der Kontrolle (ohne Akzeptor). Eine Erhöhung der Calciumkonzentration hat eine Verkürzung der Lebensdauer zur Folge. Triexponentiell gefittet (98), adaptiert.

Typische Lebensdauern liegen im Bereich von einigen Nanosekunden. eCFP besitzt Lebensdauern von 2,11ns ($0\mu\text{M Ca}^{2+}$) bzw. 1,26ns ($40\mu\text{M Ca}^{2+}$) (98). Die Donorfluoreszenzlebensdauer wurde *in vivo* durch Zählung der Photonen in der Zeitdomäne (*time-correlated single photon counting*, TCSPC) gemessen. Daneben existieren die Messung via Frequenz-Domäne und das *Time-sampling* (99, 100). Bei der Auswertung der FLIM-Daten basiert die Bestimmung der Lebensdauer auf der exponentiellen Anpassung des Photonenzögerungshistogramms, wobei die Zerfallsneigungskonstante die Lebensdauer des Fluorophors darstellt (Abbildung 24). Im Idealfall, wenn nur Fluorophore eines einzigen Zustandes das beobachtete Anregungsvolumen bevölkern würden, ist der zeitliche Zerfall bei der Zeitbereichsmessung monoexponentiell. Die meisten Proben sind jedoch heterogen, was bedeutet, dass der Zerfall zwei oder sogar mehr Lebensdauerkomponenten enthält, was die Analyse der Lebensdauer komplexer macht, insbesondere wenn die Anzahl der Lebensdauerkomponenten unbekannt ist. In diesem Fall ist der Phasor-Ansatz ein geeignetes Analyseverfahren (101). Hier werden die Lebensdauerdaten im Zeitbereich gemessen, aber in eine virtuelle Phasendomäne übertragen, indem die diskrete Fourier-Transformation (FT) numerisch berechnet wird. Die FT kann in einen sogenannten Real- und Imaginärteil zerlegt werden. Die Summe aller enthaltenen Fluoreszenzlebensdauern kann aus dem normierten realen und imaginären Ergebnis dieser Übertragung berechnet werden. Im Falle eines monoexponentiellen Zerfalls werden diese Ergebnisse eine Position namens Phasor innerhalb eines Halbkreises ergeben ($r = 0.5$, Zentrum bei $(0.5 / 0)$). Wenn das Anregungsvolumen zwei fluoreszierende Spezies enthält, liegt diese Position in der graphischen Darstellung entlang der Geraden, die die Phasoren der reinen Komponenten verbindet. In Abbildung 25 ist beispielhaft ein typischer Phasorenplot dargestellt. Zellen wurden entweder mit YFP allein (B), mit CFP allein (C), eGFP allein (D) oder mit dem FRET-Konstrukt Raicchu-Rac1 (Variante des CFP/YFP-Donor/Akzeptorpaars, E und F) transfiziert. Zellen mit FRET-Paar zeigen je nach Quenching eine Verschiebung des Phasors (rote gestrichelte Linie). Die anderen fluoreszenten Spezies korrelieren jeweils mit speziellen Positionen innerhalb des Halbkreises.

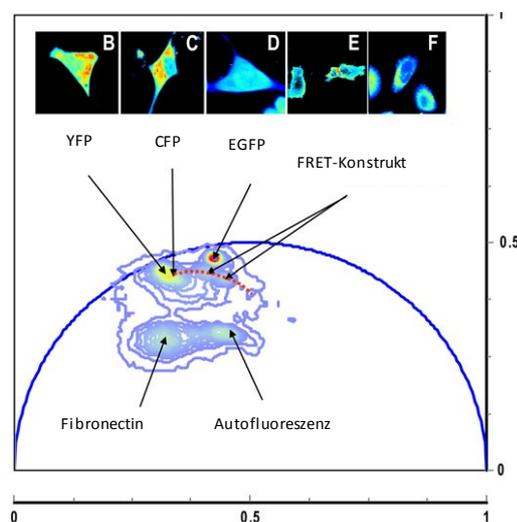


Abbildung 25: Phasor-Auswertung von FLIM-Messdaten (MEF-Zellen transfiziert mit YFP, CFP, EGFP oder einem FRET-Konstrukt (Raicchu-Rac1)). In x-Richtung: Realteil der FT, in y-Richtung: Imaginärteil. Bei FRET wandert die entsprechende Zellpopulation gemäß ihrer FRET-Effizienz entlang des blauen Halbkreises in Richtung vollständig gequenchten Moleküls nach rechts (101), adaptiert.

3. Ergebnisse

3.1. Mäuse mit Expression des GECI TN-XXL in CD19⁺ B-Zellen (YellowCaB-Mäuse)

Unter Zuhilfenahme des Cre-LoxP-Rekombinationssystems gelang es uns, Mäuse zu generieren, welche ausschließlich in B-Lymphozyten des CD19⁺-Phänotyps eine Expression des Calciumsensors TN-XXL aufweisen (102). Hierfür wurden Tiere, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD19-Promotors exprimieren, mit Tieren verpaart, welche das TN-XXL-Insert im Locus ROSA26⁵ auf Chromosom 6 tragen, welches allerdings zunächst durch ein zusätzliches Stoppcodon in 5' an der Expression gehindert ist (Abbildung 26) (103). Der wesentliche Vorteil an einer Insertion des Gens in den ROSA26 Locus ist, dass dieser in nahezu allen Körperzellen vorkommt und die Lebensfähigkeit der Mäuse nicht durch das Transgen eingeschränkt wird. Die Cre-Rekombinase erkennt sogenannte LoxP-Sequenzen (*locus of X over P1*, Locus X aus dem Bakteriophagen P1), 34bp lange DNA-Abschnitte, an welche sie binden kann, und erzeugt Doppelstrangbrüche an den entsprechenden Stellen, fügt die entstehenden Enden zusammen und inaktiviert somit das Stoppcodon. Somit kann erst durch Verpaarung von Mäusen, die das TN-XXL-Gen von LoxP Sequenzen flankiert tragen (d.h. „gefloxt“ sind), mit den CD19Cre-Tieren das Ablesen des TN-XXL-Gens ermöglicht werden. Wir nannten die Mäuse der F1 Generation „YellowCaB“ (**yellow fluorescence after Ca²⁺-flux in B cells**; gelbe Fluoreszenz nach Ca²⁺-Flux in B-Zellen) und ihre B-Zellen entsprechend YellowCaB-Zellen. Nur Zellen, in welchen auch CD19 abgelesen wird, können TN-XXL exprimieren.

50

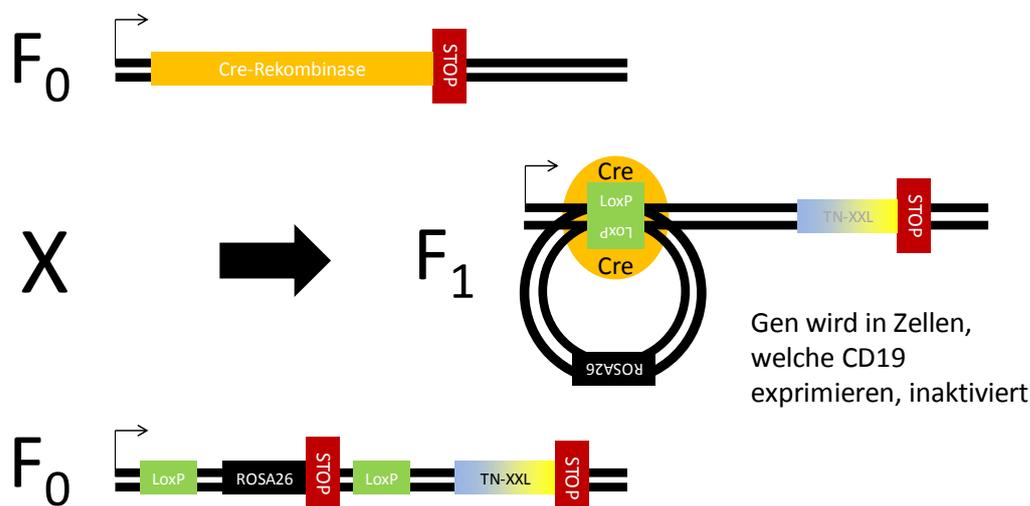


Abbildung 26: Cre-LoxP Rekombination. Die Verpaarung von CD19cre-Mäusen (oben, schwarz) mit TN-XXLfloxed Mäusen (unten, grau) führt zur Expression des Proteins TN-XXL in den CD19⁺-Zellen der ersten Tochtergeneration (Mitte, grau-schwarz). Die Cre-Rekombinase sorgt dafür, dass in CD19⁺-Zellen das ROSA26-Gen mitsamt Stoppcodon inaktiviert wird, und so TN-XXL ungehindert abgelesen werden kann. In allen anderen Zellen der Mäuse bleibt die natürliche Genfunktion erhalten und TN-XXL wird nicht transkribiert.

⁵ Die Region ROSA26 bringt drei Transkripte hervor, von welchen zwei nicht-codierende für kleine Kern-RNA (snRNA) transkribiert werden. Das dritte Transkript enthält einen offenen Leserahmen, welcher für ein unbekanntes Protein codiert (170).

3.1.1. Typisierung

Die Mäuse wurden anhand des Vorhandenseins gelber Fluoreszenz typisiert, da diese sich im Durchflusszytometer optimal anregen und darstellen lässt. Da der GECI TN-XXL sowohl aus Teilen eCFP als auch Citrine besteht, ist davon auszugehen, dass alle positiv typisierten Tiere auch blaue Fluoreszenz aufweisen. Es wurden YellowCaB-Zellen – homo- oder heterozygot – aus der Milz der Tiere isoliert oder als Teil der gesamten Splenozyten vermessen. Die Zellen wurden dazu mit Laserlicht der Wellenlänge 488nm bestrahlt und die Fluoreszenzintensität im 525nm/50nm-Kanal gemessen. Wir überprüften zunächst, ob die Tiere den GECI TN-XXL tatsächlich nur in CD19⁺ B-Zellen tragen. Dazu wurden Splenozyten der Tiere mit einem fluoreszenten anti-CD19-Antikörper gefärbt, und die negativen und positiven Populationen getrennt voneinander hinsichtlich ihrer Fluoreszenz im Kanal 525/50nm untersucht (Abbildung 27, oben). Nur CD19⁺ B-Zellen weisen einen Anteil an Zellen mit gelber Fluoreszenz auf, welcher im heterozygoten Tier bei 30-40% liegt (Abbildung 27, unten links) und im homozygoten bei 60-70% (Abbildung 27, unten rechts, nach B-Zell-Isolation).

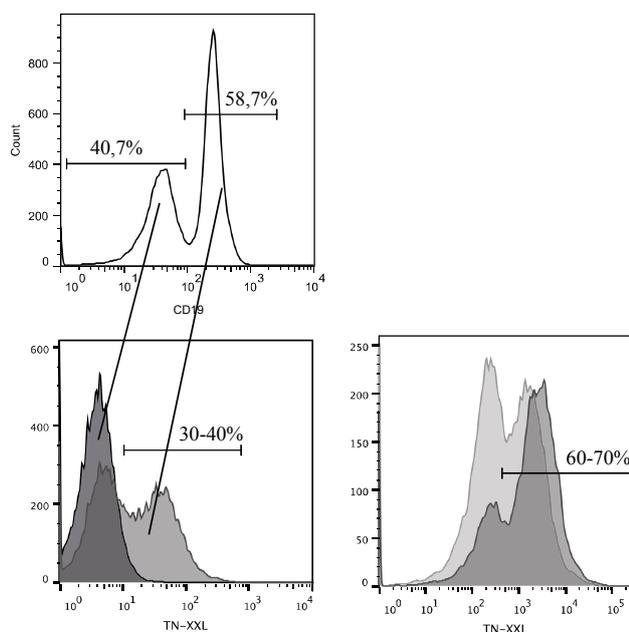


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Typisierung von hetero- und homozygoten YellowCaB-Mäusen anhand der Fluoreszenz im Kanal 525/50nm nach Exzitation durch einen 488nm Laser. Zur Typisierung wurden Gesamtzellen bzw. B-Zellen aus der Milz der Tiere isoliert. Oben: Heterozygote Tiere. Färbung aller Splenozyten mit anti-CD19 Antikörper ergibt ca. 40% CD19-negative und 60% CD19-positive Zellen. Unten links: CD19⁻ Zellen sind TN-XXL-negativ, während CD19⁺ Zellen zu 30-40% TN-XXL exprimieren. Der Vergleich von hetero- und homozygoten YellowCaB-Mäusen (unten rechts) zeigt, dass homozygote Tiere etwa doppelt so viele fluoreszente Zellen besitzen, und sich diese Zellen nach B-Zell-Isolation anreichern (dunkelgrau).

3.2. Zellkultur

3.2.1. Der calciumsensitive FRET-Sensor TN-XXL wird funktional exprimiert

Zunächst untersuchten wir, ob wir nach unspezifischer Stimulation von kultivierten YellowCaB-Zellen mit Ionomycin eine Änderung im Verhältnis der Signalintensitäten von Donorfluorophor eCFP und Akzeptorfluorophor Citrine messen können. Auf einem Deckglas kultivierte B-Zellen (isoliert aus der Milz von YellowCaB-Tieren) wurden zu diesem Zweck mit calciumhaltiger

Ringerlösung überspült. Die Fluoreszenzintensitäten des TN-XXL-FRET-Sensors wurden am konfokalen Mikroskop in ihren jeweiligen Kanälen nach Anregung durch 405nm Laserlicht über einen bestimmten Zeitraum aufgenommen. Nach Messung der Basislinie wurde Ionomycin in das einströmende Medium zugetropft, welches Poren formt und Calcium aus dem extrazellulären Raum in die Zellen transportiert. Nach einer Verzögerung, die das Medium durch das Schlauchsystem der Pumpe benötigt, konnte ein Anstieg in der Fluoreszenz des Akzeptormoleküls Citrine sowie ein Abfall der Fluoreszenzintensität des Donors eCFP beobachtet werden (Abbildung 28). Die Anregung und Bildaufnahme erfolgte dabei, um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern, alle 3 Sekunden. Vom Eintreffen des Signals bis zur Stabilisierung des FRET-Verhältnisses vergehen ca. zehn Sekunden, was für die Messung von Calciumfluktuationen, die sich typischerweise mit nur sehr kurzlebigen Spitzenwerten beschäftigt, eine sehr lange Zeitdauer ist. Da uns aber vor allem die fortgesetzte Antwort der Zellen auf eine Stimulation interessiert, ist dieser Umstand zu vernachlässigen.

Während eCFP nach Stimulation mit Ionomycin seine Fluoreszenzintensität um etwa 1000 Einheiten verringert, steigt gleichzeitig die Fluoreszenzintensität von Citrine um denselben Wert an.

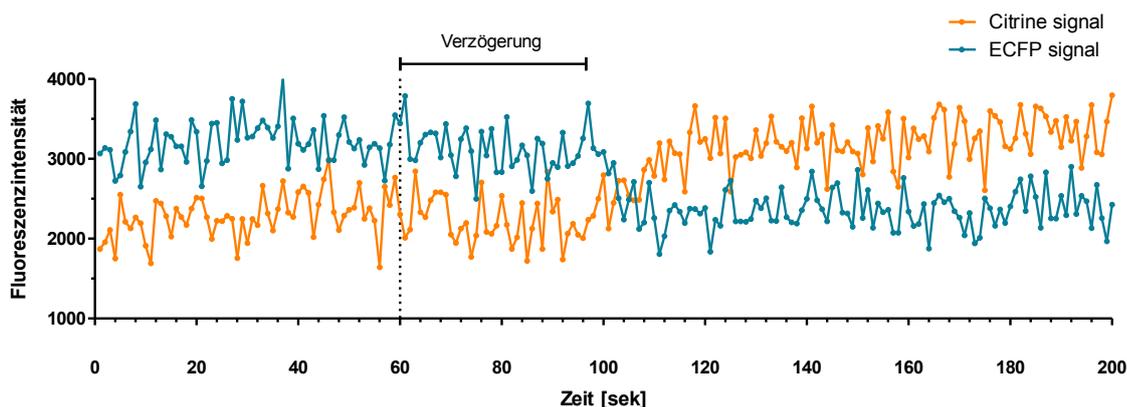


Abbildung 28: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von eCFP bzw. Citrine über einen Zeitraum von 200 Sekunden. Die Zellen wurden alle 3 Sekunden mit Laserlicht der Wellenlänge 405nm angeregt und die Emission in den Kanälen für eCFP und Citrine gemessen. Es ist ein deutlicher Anstieg in der Fluoreszenzintensität von Citrine und ein Abfall in der Fluoreszenzintensität von eCFP zu erkennen, der auf die Stimulation mit Ionomycin folgt (gepunktete Linie), verzögert durch den Weg, den das Medium durch das Schlauchsystem der Perfusionspumpe zurücklegen muss. Messung stellvertretend für mindestens 100 Zellen aus drei YellowCaB-Tieren.

Die ratiometrische Methode der Auswertung dieser Experimente verlangt, dass die Citrine-Fluoreszenz zur eCFP-Fluoreszenz ins Verhältnis gesetzt wird. Bei Calciumeinstrom in die Zelle wird dieses Verhältnis größer werden. Man bestimmt dafür den Quotient $R = I_{\text{Citrine}}/I_{\text{eCFP}}$ (siehe 2.2.6.). Die Änderung von R nach Stimulation gegenüber der Basislinie (Zustand vor Stimulation) wird als ΔR bezeichnet und wiederum zu R in jedem Zeitpunkt ins Verhältnis gesetzt. So erhält man die Kurve $\Delta R/R$, die das Ergebnis der Messung als prozentualen Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Fluoreszenz im unstimulierten Zustand wiedergibt (Abbildung 29). Nach Stimulation mit Ionomycin steigt das Verhältnis $\Delta R/R$ auf einen Wert von 0,5 über das Basislevel des Verhältnisses im unstimulierten Zustand. Das FRET-Signal steigt also um 50%. Da Ionomycin die Calciumkonzentration in der Zelle nachhaltig (auf einen über diese Dauer zytotoxischen Wert)

anhebt, bleibt auch das FRET-Verhältnis auf diesem Wert, ohne dass nach 200 Sekunden ein Abfall des Signals bemerkbar wäre.

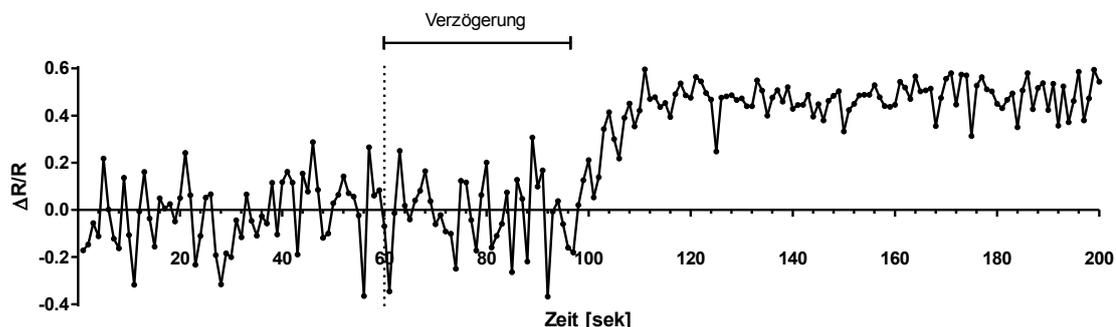


Abbildung 29: Änderung der ratiometrisch ermittelten Fluoreszenzintensität über die Zeit nach Stimulation mit Ionomycin (gepunktete Linie, Reaktion verzögert durch das Schlauchsystem der Pumpe), dargestellt als Änderung des Signalverhältnisses $\Delta R/R$ in Bezug auf die Basislinie. Es wurde alle drei Sekunden ein Bild aufgenommen. Messung stellvertretend für mindestens 100 Zellen aus drei YellowCaB-Tieren.

Mit diesen Experimenten konnten wir zeigen, dass es möglich ist, isolierte YellowCaB-Zellen, welche positiv für den GECI TN-XXL sind, *in vitro* zum Calciumeinstrom anzuregen. Nach Stimulation konnte eine gegenläufige Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von eCFP und Citrine festgestellt werden. Da das Donorfluorophor an Fluoreszenzintensität verliert, nimmt das Akzeptorfluorophor an Intensität zu. In der ratiometrischen Darstellung bedeutet das einen Anstieg des FRET-Signals um 50% gegenüber der Basislinie. Somit haben wir bewiesen, dass unser exklusiv in B-Zellen exprimierter Sensor biologisch aktiv ist und wie erwartet arbeitet. Für eine statistische Analyse wurden exemplarisch 100 Zellen aus drei Tieren auf Calciumflux nach Ionomycin-Stimulation untersucht. Etwa 80% der Zellen reagieren mit $\Delta R/R > 0,2$ auf die Stimulation. Wir legten daher 20% FRET als Schwellenwert für eine erfolgreiche Reaktion zugrunde. Die meisten Zellen zeigten 40-45% FRET nach Ionomycinstimulation (Abbildung 30).

53

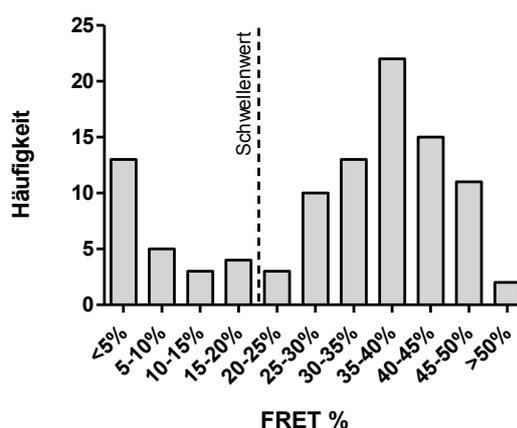


Abbildung 30: Statistische Auswertung des FRET-Signals von 100 YellowCaB-Zellen nach Ionomycin-Stimulation. Es zeigen sich eine FRET-positive und eine FRET-negative Population. Anhand der Grenze zwischen diesen wurde ein Schwellenwert von 20% FRET festgelegt. Diesen Wert müssen Zellen mindestens erreichen, um als FRET-positiv zu gelten.

3.2.2. BCR-Stimulation führt zu Calciumeinstrom und FRET-Signalanstieg

Um zu überprüfen, ob wir ebenfalls einen Calciumeinstrom nach spezifischer Stimulation des BCR (wie es auch *in vivo* durch Aufnahme von Antigen geschieht) erzeugen können, wurden die Antikörper anti-kappa, welches die leichte Kette des BCR anspricht, sowie anti-IgM, welches die schwere Kette des naiven Rezeptors anspricht, getrennt bzw. aufeinanderfolgend in das Perfusionsmedium zugetropft.

Stimulation der schweren Kette

Der Kontakt der B-Zellen mit Antigen kann simuliert werden, in dem man mehrere BCRs auf der Zelloberfläche mit einem gegen den BCR selbst gerichteten Antikörper aktiviert. Da die Spreizwirkung des Antigens auf die BCRs nicht durch monovalentes anti-IgM erreicht werden kann, wird das F(ab)₂-Fragment benötigt. Die schwere Kette des BCR reifer B-Zellen, die noch keinen Klassenwechsel erfahren haben, ist vom Typ IgM. B-Zellen mit diesem BCR sollten demnach in frisch aus der Milz isolierten Primärzellkulturen die Mehrheit darstellen. Abbildung 31 zeigt die Stimulation der YellowCaB-Zellkulturen mit anti-IgM-F(ab)₂ und anschließender Ionomycin-Positivkontrolle.

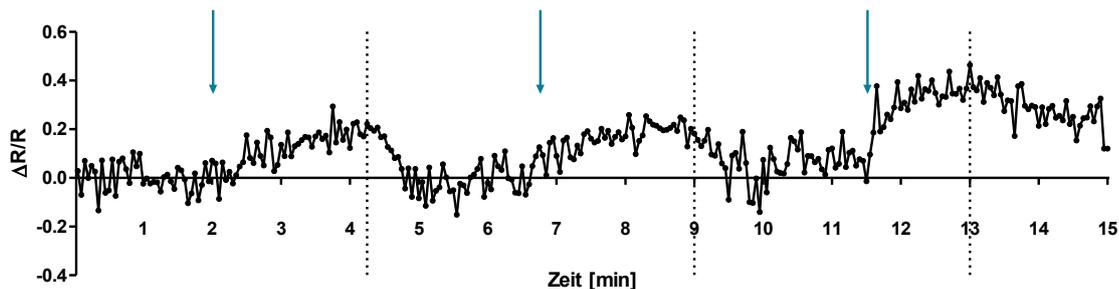


Abbildung 31: Stimulation des BCR durch Zugabe von anti-IgM-F(ab)₂, der die schwere Kette des BCR bindet. Blaue Pfeile: Stimulationszeitpunkt. Bei Minute 2 und 7 wurde mit 4 µg/ml IgM-F(ab)₂-Lösung stimuliert, bei Minute 11,5 mit 4 µg/ml Ionomycin. Gepunktete Linie: Zeitpunkt des Anschaltens der Perfusionspumpe. Die Pumpe wurde jeweils zusammen mit der Stimulation ausgeschaltet. Es wurde alle drei Sekunden ein Bild aufgenommen. Messung stellvertretend für mindestens 50 Zellen aus fünf YellowCaB-Tieren.

Eine Zuleitung der Antikörper über das Schlauchsystem war nicht möglich, da die Antikörperlösung dabei zu stark verdünnt worden wäre. Aus demselben Grund, und um ein Auswaschen des Antikörpers zu verhindern, wurde gleichzeitig mit der Stimulation auch die Pumpe ausgeschaltet. Um die Reaktion rückgängig zu machen und den Antikörper auszuwaschen, wurde die Pumpe nach einem bestimmten Zeitraum wieder eingeschaltet. Dies kehrte die Signaländerung des TN-XXL-Sensors um und die Stimulation konnte erneut erfolgen.

Stimulation der leichten Kette

Wir wollten nun sehen, ob auch ein Angriff der leichten Kette, also des kappa-Teiles des BCR (siehe Abbildung 7) zu einer positiven Reaktion und damit zu Calciumeinstrom in die Zelle führt. Nach zweieinhalb und zehn Minuten wurde mit anti-kappa stimuliert, nach fünf, siebeneinhalb und 12,5 Minuten wurde mit anti-IgM-F(ab)₂ stimuliert (Abbildung 32).

Nach Zugabe von anti-kappa konnten wir einen scharfen, aber verzögerten Signalanstieg von $\Delta R/R$ um ca. 50% beobachten. Die hier eingesetzte Stock-Konzentration war mit 7,5mg/ml um das 15-fache gegenüber der Stock-Konzentration von anti-IgM-F(ab)₂ mit 0,5mg/ml erhöht. Geringere Konzentrationen konnten in Vorversuchen keinen Signalanstieg durch Calciueinstrom erzeugen. Nach Einbezug des Kammervolumens von 2,5ml ergibt sich eine für die Zellen verfügbare Konzentration von 300 μ g/ml anti-kappa bei einem Stimulationsvolumen von 100 μ l (nach zweieinhalb Minuten) bzw. 150 μ g/ml bei einem Stimulationsvolumen von 50 μ l (nach zehn Minuten). Es ist zu bemerken, dass die halbierte Konzentration des anti-kappa-Antikörpers zu einem etwa um die Hälfte verringerten Signal führt. Durch Anschalten der Pumpe flachte das Signalverhältnis wieder ab, bis es durch erneute Stimulation wieder hervorgerufen werden konnte. Die Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂ bei einer finalen Konzentration von 20 μ g/ml (nach fünf und siebeneinhalb Minuten) und die Stimulation bei einer finalen Konzentration von 10 μ g/ml (nach 12,5 Minuten) führten dabei zu abgeflachten Signalpeaks. Interessanterweise erzeugte die anti-IgM-F(ab)₂-Stimulation nach fünf Minuten mit rund 20% einen geringeren Signalanstieg als die darauffolgende Stimulation nach siebeneinhalb Minuten (bei gleicher Konzentration). Zu bemerken ist auch, dass das vorangegangene Signal zum Zeitpunkt des Einsetzens des nachfolgenden noch nicht ganz abgeklungen zu sein scheint. Die letzte Stimulation nach 12,5 Minuten erzeugte mit 30% einen ähnlich hohen Peak.

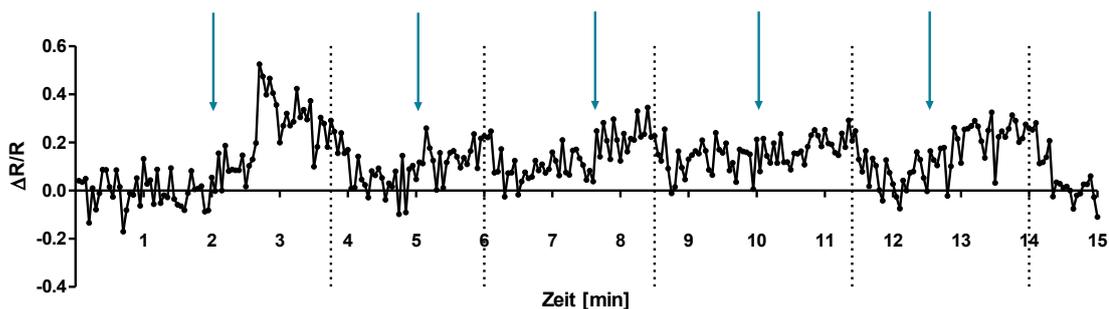


Abbildung 32: Wiederholte Stimulation des BCR mit Antikörper führt zur Änderung des Signalverhältnisses $\Delta R/R$ in Bezug zur Basislinie. Zwei Minuten nach Beginn der Messung wurden 300 μ g/ml anti-kappa Antikörper direkt ins Medium der Durchflusskammer getropft. Nach fünf und siebeneinhalb Minuten wurde mit einer 20 μ g/ml anti-IgM-F(ab)₂-Lösung stimuliert. Nach zehn Minuten wurde wiederum anti-kappa, dieses Mal in einer Konzentration von 150 μ g/ml zugetropft. Anschließend wurde, nach 12,5 Minuten, noch einmal mit einer geringeren Menge anti-IgM-F(ab)₂-Antikörper (10 μ g/ml) stimuliert (ein blauer Pfeil markiert jeweils den Stimulationszeitpunkt). Die gestrichelten Linien geben den Zeitpunkt des Anschaltens der Perfusionspumpe wider. Es wurde alle drei Sekunden ein Bild aufgenommen. Messung stellvertretend für 16 Zellen aus drei YellowCaB-Tieren.

Zusammengefasst kann beobachtet werden, dass die Stimulation mit anti-kappa in einer viel höheren Konzentration erfolgen muss und proportional von dieser abhängig ist. Auf anti-IgM-F(ab)₂ reagieren die B-Zellen wesentlich sensibler. Für die Zellkulturexperimente wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen anti-IgM-F(ab)₂ gearbeitet, um gleichzeitig eine Titration des Antikörpers zu gewährleisten. Es konnte aus den Experimenten der leichten und schweren Kette sowie der Stimulation von CD40 (s.u.) geschlossen werden, dass eine Konzentration von 4 μ g/ml anti-IgM-F(ab)₂-Antikörperlösung ausreichend ist, um einen 20-30%igen Umschlag des FRET-Signals zu erzielen. Es wurde versucht, ebenfalls mit 2 μ g/ml Antikörperlösung zu stimulieren, dies hatte jedoch keinen signifikanten Signalumschlag mehr zur Folge (Daten nicht gezeigt). Höhere,

hier eingesetzte Konzentrationen des Antikörpers (8, 10 und 20µg/ml) waren nicht in der Lage, einen höheren FRET-Peak hervorzurufen, womit davon ausgegangen werden kann, dass eine Konzentration von 4µg/ml bei naiven B-Zellen bereits die Sättigung darstellt. Wir definierten daher einen Signalanstieg auf 20% FRET als Schwellenwert für BCR-induzierten Ca^{2+} -Flux.

Durchflusszytometrische Untersuchung bestätigt Ergebnisse

Um mit einer weiteren Methode die Funktionalität des Calciumsensors TN-XXL zu überprüfen, haben wir frisch aus der Milz von YellowCaB-Tieren isolierte B-Zellen, suspendiert in Ringerlösung mit 6mM Ca^{2+} , durchflusszytometrisch untersucht (am Zytometer Fortessa von Becton-Dickinson, welches den kontinuierlichen Einzug der Zellsuspension ermöglicht sowie dessen Unterbrechung zur Stimulation, ohne dass die Messung gestoppt werden müsste). Um herauszufinden, ob die Signaländerung die wir bei der mikroskopischen Analyse beobachtet hatten, tatsächlich Ca^{2+} -abhängig ist, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff X-Rhod-1 (life technologies) gefärbt (530nM in RPMI + 5%FCS, 30min, 37°C). Dies ermöglichte es uns, die Funktionalität des GECl in einem von ihm unabhängigen System zu validieren. Leider war es nicht möglich, mit X-Rhod-1 gefärbte YellowCaB-Zellen gleichzeitig auf FRET (Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im grünen Kanal nach Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 405nm) zu überprüfen und die Reaktion auf X-Rhod-1 aufzunehmen, obwohl die Spektren von Citrine und X-Rhod-1 nicht überlappen. Allerdings fängt der Farbstoff die Ca^{2+} -Ionen ab, weshalb die Messungen separat erfolgen mussten.

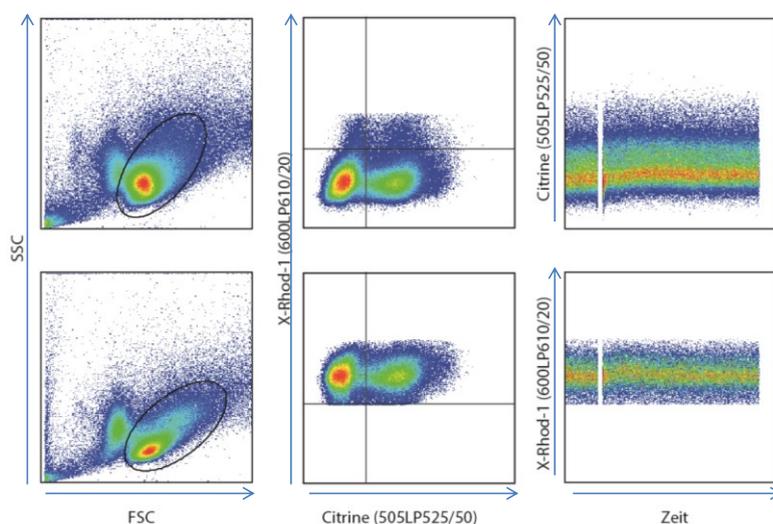


Abbildung 33: Durchflusszytometrische Untersuchung der YellowCaB-Zellen. Gating von links nach rechts: 1. Lymphozyten, 2. TN-XXL versus X-Rhod-1, 3. Citrine-positive Zellen und MFI über die Zeit (250sek) Oben: ungefärbte YellowCaB-Zellen, unten: X-Rhod-1-gefärbte YellowCaB-Zellen

Es wurde die Erhöhung der MFI nach Stimulation mit Ionomycin oder anti-IgM-F(ab)₂ über die Zeit bestimmt. Die Stimulation erfolgte nach 50-55 Sekunden, entweder mit PBS als Vehikelkontrolle, mit 20µg/ml IgM-F(ab)₂ als physiologische, BCR-anregende Kontrolle oder mit 4µg/ml Ionomycin als unphysiologische Positivkontrolle. Auf Basis der Gesamtzellen wurde die Unterpopulation der Lymphozyten (siehe Gating-Strategie in Abbildung 33) festgelegt, diese wiederum im Fluoreszenzkanal der Konfiguration 505nmLP (Langpassfilter) 525/50nm (MFI von Citrine) untersucht, sowie im Kanal 600nmLP610/20nm (MFI von X-Rhod-1). Auch dieses

Experiment konnte bestätigen, dass der Sensor TN-XXL funktional in YellowCaB-Zellen exprimiert wird, denn es konnte im FRET-Kanal eine Änderung der MFI nach Zugabe von Antikörper und Ionomycin beobachtet werden. Wie zu erwarten führt dabei vor allem die unphysiologische Stimulation mit Ionomycin zu einem sehr deutlichen Signalanstieg um 300% bzw., ausgedrückt als $\Delta R/R$, auf 0,67 oder 67% im Falle von X-Rhod-1. Die weniger helle mittlere Fluoreszenzintensität von Citrine steigt nach Anregung mit 405nm Laserlicht von einem Wert von etwa 275 auf 450 an und damit immerhin um 163% oder auf $\Delta R/R=39\%$. Das Signal bleibt über die gesamte Messdauer auf diesem Niveau. Weniger eindeutig ist die Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂. Die Basislinie liegt hier bereits etwas über dem Niveau der anderen Proben, was auf eine Vorstimulation der Zellen deuten könnte (Abbildung 34, oben). Die Reaktion ist aber erkennbar, und wird durch die Reaktion der X-Rhod-1-gefärbten Zellen bestätigt. X-Rhod-1 ist sehr viel heller als der GECI TN-XXL und besitzt eine wesentlich größere Dynamik (Abbildung 34, unten).

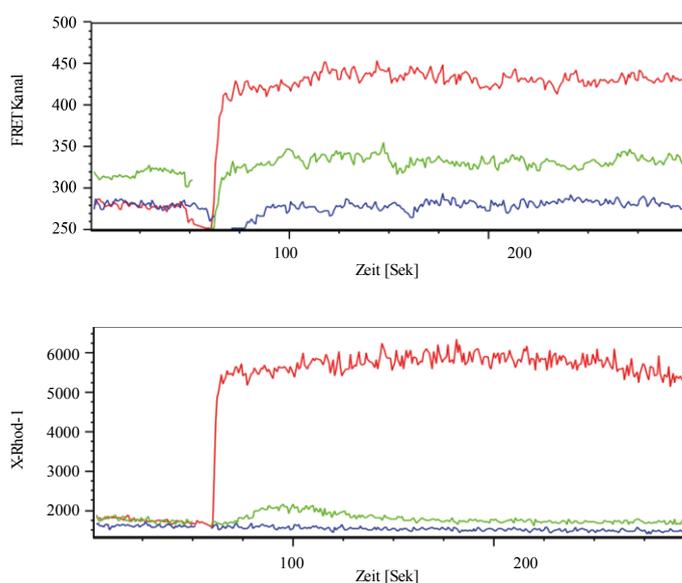


Abbildung 34: Kinetik der durchflusszytometrischen Untersuchung der Funktionalität von TN-XXL. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität in den entsprechenden Kanälen über die Zeit. Es wurde entweder der Signalanstieg im 505nmLP525/50nm-Kanal nach Anregung mit 405nm Laserlicht gemessen (oben) oder der Signalanstieg im 600nmLP610/20nm-Kanal (hierfür wurden die YellowCaB-Zellen zuvor mit X-Rhod-1, einem calciumsensitiven Farbstoff, gefärbt, unten) Blau: Stimulation mit PBS, Grün: Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂, Rot: Stimulation mit Ionomycin (Positivkontrolle). Messung stellvertretend für 15 Messungen mit YellowCaB-Zellen aus fünf Tieren.

3.2.3. Die Stimulation von Korezeptoren moduliert das FRET-Signal

Um herauszufinden, ob Calciumeinstrom auch durch andere Rezeptoren stimuliert werden kann, testeten wir *in vitro* die Reaktion der Zellen auf anti-CD40, auf Lipopolysaccharide (LPS), sowie auf CpG-Oligonukleotide (unmethyliertes Sequenzmotiv aus Cytosin, Phosphat und Guanin in der Bakterien-DNA). CD40 ist ein Korezeptor auf B-Zellen, der sich bei der Bildung der Immunsynapse, d.h. bei der Interaktion der T-Zelle mit der B-Zelle zum Zwecke der Übertragung von Überlebens- und Differenzierungssignalen, mit dem CD40-Liganden (CD40L) verbindet (Abbildung 5). LPS wird

als Membranbestandteil gramnegativer Bakterien als Antigen von Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) erkannt, CpG von TLR9.

Simulation von T-Zell-Hilfe durch Stimulation mit anti-CD40

In der Perfusionskammer wurden isolierte YellowCaB-Zellen zunächst mit 4µg/ml anti-CD40 Antikörper prästimuliert. Die Zugabe des Antikörpers hatte keinen Effekt auf das Donor/Akzeptor-Fluoreszenzniveau des FRET-Sensors (Abbildung 35, Pfeil links). Die anschließende Zugabe von 8µg/ml anti-IgM-F(ab)₂-Fragment zur Stimulierung des BCR jedoch bewirkt, dass Calcium in die Zelle einströmt. Allerdings variieren Form und Dauer des Signals. Es konnten sowohl transiente, sehr kurze Peaks als auch länger anhaltende beobachtet werden (Abbildung 35, mittlerer Pfeil), die Zugabe von Ionomycin als entsprechende Positivkontrolle erhöht das Calciumlevel in der Zelle schließlich nachhaltig (Abbildung 35, rechter Pfeil). BCR-abhängige Signale scheinen also durch die vorherige CD40-Stimulation beeinflusst zu werden.

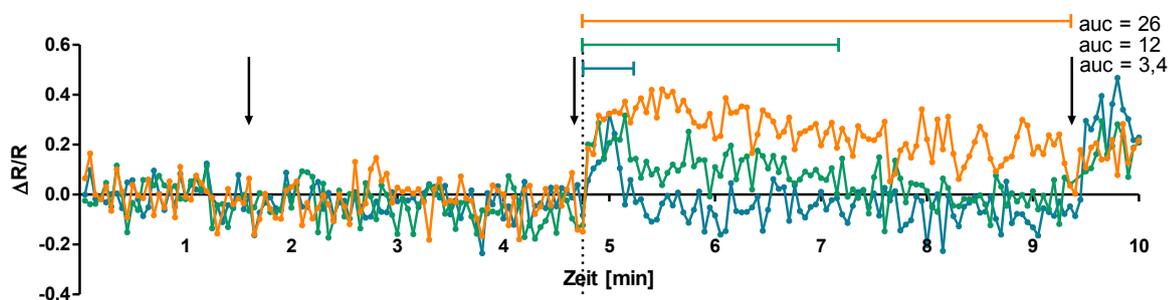


Abbildung 35: Stimulation mit anti-CD40, anti-IgM-F(ab)₂-Fragment und Ionomycin. Linker Pfeil: anti-CD40-Zugabe. Mittlerer Pfeil: anti-IgM-F(ab)₂-Zugabe. Rechter Pfeil: Ionomycin-Kontrolle. Es konnten innerhalb derselben Messung drei verschiedene Kurvenformen beobachtet werden. Orange Kurve: prolongierter Calciumflux. Grüne Kurve: Intermediärer Calciumflux. Blaue Kurve: Transienter Calciumpeak. Messung stellvertretend für 26 Zellen, isoliert aus 2 Tieren.

Toll-like-Rezeptor Stimulation

Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass der Klassenwechsel von B-Zellen durch LPS-Stimulation in der Gegenwart von BCR-Signaling beschleunigt ist, und LPS zur Calciummobilisation in B-Zellen beiträgt. Bei Abwesenheit von BCR-Stimulation jedoch wird der Klassenwechsel sogar verhindert. LPS ist darüber hinaus auch allein in der Lage, in einer Gruppe von B-Zellen Calciumflux hervorzurufen (104–106). Unsere Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass LPS in einer Konzentration von 20µg/ml tatsächlich in der Lage war, einen kleinen Peak in der Calciumantwort hervorzurufen, allerdings blieb das Mittel unter dem Schwellenwert von 0,2 (Abbildung 36). Vergleichsweise wurde mit einer anti-IgM-F(ab)₂ Konzentration von 4µg/ml eine wesentlich geringere Konzentration benötigt, um einen ΔR/R-Mittelwert von ca. 0,3 zu erreichen (Abbildung 36, links). Die Stimulation des Calciumeinstroms in B-Zellen durch TLR4-Stimulation kann somit für die spätere Auswertung unserer *in vivo*-Daten zunächst vernachlässigt werden. Zu bemerken wäre noch, dass sich bei der zweiten Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂ eine Tendenz zum geringeren Signalanstieg zeigt, der Unterschied zur ersten Stimulation ist allerdings statistisch nicht signifikant.

Die alleinige Zugabe von CpG zur Stimulation von TLR9 konnte gar keine Reaktion hervorrufen. Zusammen mit den dreimal hintereinander durchgeführten PBS-Kontrollen (um Effekte des

Pumpsystems sowie der Stimulation an sich auf die Messung auszuschließen) bleibt das Level von $\Delta R/R$ auf dem Basalniveau. Die Ionomycinzugabe als Experimentpositivkontrolle erzeugt wie erwartet einen starken Anstieg des FRET-Signals, womit bestätigt werden kann, dass der Sensor aktiv ist (Abbildung 36, rechts). Die Stimulation von TLR9 wurde noch einmal mit anti-IgM-F(ab)₂ als Experimentpositivkontrolle wiederholt (Abbildung 37). Auch hier wurde immer zum Stimulationszeitpunkt das Pumpensystem ausgeschaltet und nach einiger Zeit wieder eingeschaltet, um die Stimulationsfaktoren wieder auszuspülen und die Zellen für eine erneute Stimulation vorzubereiten. Wie erwartet, konnte CpG allein keinen Flux von Ca²⁺-Ionen und somit kein FRET-Signal erzeugen. Überraschenderweise reagierten die Zellen nach CpG-Stimulation aber mit Verzögerung auf die nachfolgende Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂. Eine deutliche Änderung des FRET-Signals trat erst nach Wieder-Einschalten der Pumpe ein (Abbildung 37).

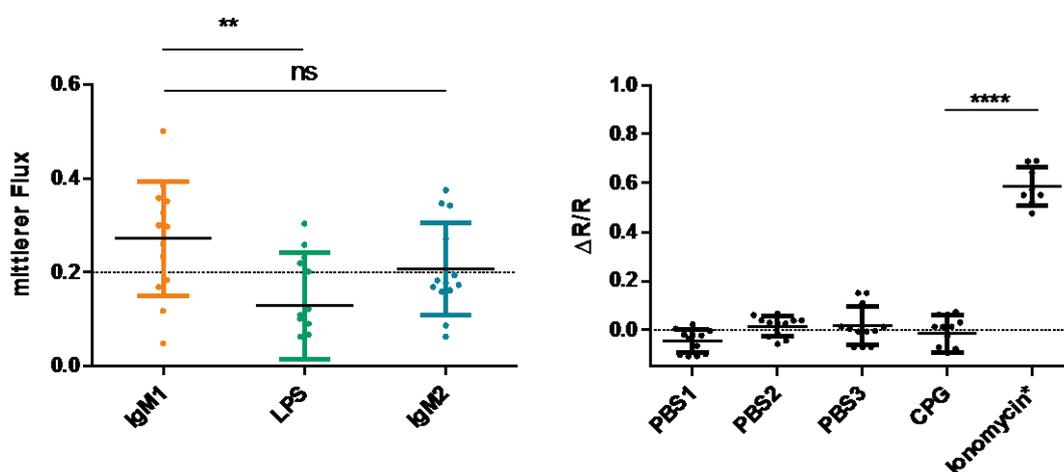


Abbildung 36: Toll-like-Rezeptor-4-Stimulation mit LPS, sowie Kontrolle durch IgM-F(ab)₂-Gabe (links) und CpG sowie Vehikelkontrollen (rechts), mittlerer Flux über die Zeit (Median). Die erstmalige anti-IgM-F(ab)₂-Zugabe (IgM1) vermag einen hohen Calciumflux von 0,3 zu erreichen. Durch LPS kann nur ein geringer Flux hervorgerufen werden. Die zweite BCR-Stimulation (IgM2) derselben Zellen erzeugt geringere $\Delta R/R$ -Werte als die erste, der erzeugte Calciumflux ist im Mittel aber nicht signifikant von Stimulation 1 zu unterscheiden. CpG-Stimulation hat keinen Effekt auf das $\Delta R/R$ -Basalniveau der B-Zellen, es besteht kein Unterschied im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Ionomycin* kann einen sehr ausgeprägten Calciumflux hervorrufen und bestätigt somit, dass der Sensor aktiv ist. *Einzelner Wert aus einer Momentaufnahme. Ungepaarter Student'scher T-Test **p=0,0047, ****p<0,0001. Mittelwert und Standardabweichung (SD). LPS-Stimulationsexperiment stellvertretend für 30 Zellen aus drei Tieren; CpG-Stimulationsexperiment stellvertretend für 26 Zellen aus drei Tieren. PBS: Eine Messung, 10 Zellen. Dargestellt sind 12 (links) bzw. 8 Zellen (rechts).

Dieses ist signifikant gegenüber der Reaktion auf CpG erhöht. Die mittleren FRET-Werte für die Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂ bleiben unter 0,2, dies ist allerdings darauf zurückzuführen, dass das Signal stufenförmig über ca. drei Minuten absinkt und innerhalb der ersten eineinhalb Minuten von 0,3 auf 0,1 fällt. Da über die gesamte Stimulationsperiode bis zum Anschalten der Pumpe gemittelt wurde, erscheint der Gesamtmittelwert niedriger. Mit einem Spitzenwert für $\Delta R/R$ von 0,35 ist die Reaktion auf BCR-Stimulation von mit CpG vorstimulierten Zellen aber kurzzeitig sogar stärker als die von Zellen, welche nicht vorstimuliert wurden. Der Peak tritt jedoch verzögert ein und zeigt statt eines stetigen Abfalls ein charakteristisches Stufenmuster (Abbildung 37).

Wir konnten unser System mit den *in-vitro*-Experimenten validieren. Wie wir gezeigt haben, lässt sich ein Umschlag des Fluoreszenzsignals des GECI TN-XXL messen, wenn der BCR von

YellowCaB-Zellen stimuliert wird. Wir wollten daher als nächstes in Zelltransferexperimenten und mit Intravitalmikroskopie überprüfen, ob YellowCaB-Zellen in der Lage sind, Keimzentren in lebenden Tieren zu auszubilden.

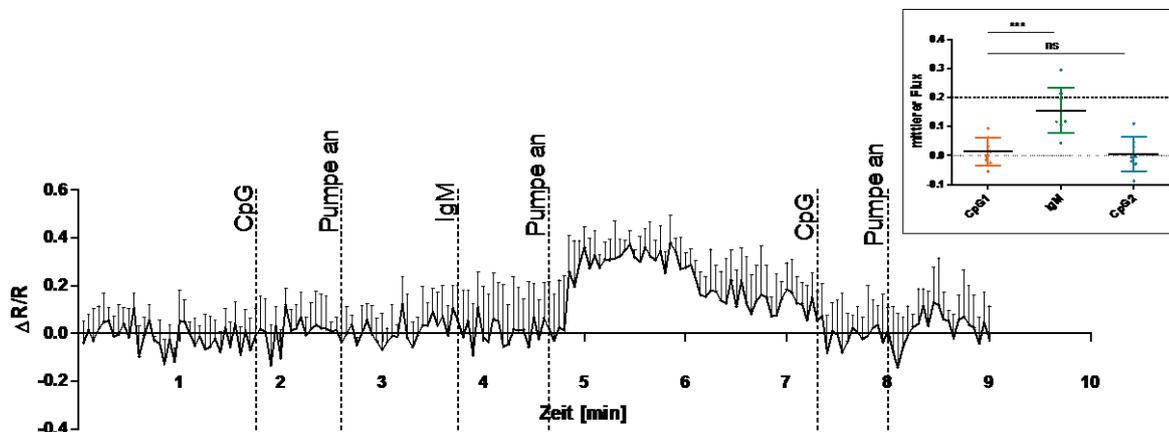


Abbildung 37: Toll-like-Rezeptor-9-Stimulation mit CpG (10µg/ml). Über sieben Zellen gemittelter Graph. Die Zellen reagieren nicht auf die Stimulation mit CpG. Wird allerdings mit anti-IgM-F(ab)₂ stimuliert (4µg/ml), zeigt sich ein deutlicher Flux um einen Wert von $\Delta R/R=0,3$, der sich nach ca. einer Minute halbiert und nach einer weiteren Minute auf das Basislevel zurücksinkt. Eine erneute Stimulation mit CpG (CpG2) hat ebenfalls keinen Calciumflux zufolge. Oben rechts abgebildet sind die mittleren Fluxwerte (Median von $\Delta R/R$ über die Zeit) zwischen den Stimulationszeitpunkten. Da die spezifische BCR-Stimulation erst verzögert eintritt, erreichen die Werte im Median nicht den Schwellenwert von 0,2. Es ist aber ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit CpG und der Stimulation mit anti-IgM-F(ab)₂ zu erkennen. Messung stellvertretend für 26 Zellen aus drei Tieren, Mittelwerte und SD.

3.3. Intravitalmikroskopie

3.3.1. Naive YellowCaB-Zellen migrieren in GCs von restringierten Wirten

Zunächst wollten wir das Verhalten von YellowCaB-Zellen im Keimzentrum untersuchen, welche den Rezipienten in naiver Form an Tag 0 des Experiments verabreicht wurden. Da die Einwanderung der naiven, also nicht-antigenspezifischen Zellen, die intravenös gespritzt werden, in den ableitenden Lymphknoten ein stochastischer Prozess ist, gelangen bei der aus einer Milz gewinnbaren Anzahl an YellowCaB-Zellen (ca. $1-2 \times 10^7$ Zellen) nur wenige nach Immunisierung in das Keimzentrum. Die transferierten Zellen müssen daher gegenüber den körpereigenen B-Zellen des Wirts einen Vorteil haben, der sie bevorzugt in die Keimzentren einwandern lässt. Aus diesem Grund haben wir uns dafür entschieden, unser Zelltransfersystem zunächst in Tieren mit einem restringierten B-Zell-Repertoire zu testen. In unserem Fall sind dies die ThX-Mäuse, wie sie Litzenburger und Kollegen beschrieben haben (93). Sechzig Prozent der B-Zellen dieser Tiere erkennen das Protein MOG, welches normalerweise eine Rolle in Tiermodellen der MS spielt. Die meisten B-Zellen der Hosttiere können also nicht auf NP-CGG reagieren, daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass YellowCaB-Zellen diese Aufgabe übernehmen, größer. Eine zweite Möglichkeit wäre, eine sehr große Zellzahl zu injizieren. Dies setzt allerdings wesentlich höhere Tierzahlen voraus und ist daher zu vermeiden. Wie Abbildung 38 zeigt, sind die YellowCaB-Zellen wie erwartet sieben Tage nach Fußsohlen-Immunisierung mit NP-CGG in den Keimzentren des ableitenden Lymphknoten in der Kniekehle zu finden. Der Kachelscan des Längsschnitts durch den Lymphknoten lässt drei Keimzentren erkennen. Keimzentren sind in diesem Falle am

kreisrunden Fehlen der IgD-Färbung (blau), die den naiven BCR markiert, bei gleichzeitiger PNA-Färbung (rot) der Zellen zu erkennen. Da PNA auch T-Zellen anfärbt, ist die T-Zell-Zone im Kachelscan in der Mitte des Lymphknotens ebenfalls gut zu erkennen. Die Fluoreszenz von eCFP und Citrine der YellowCaB-Zellen bleibt bei der PFA-Fixation der Lymphknoten nicht erhalten, da allerdings beide Fluorophore GFP-Varianten sind, ist es möglich, Zellen, die den Sensor im Zytoplasma besitzen, mit anti-GFP-Antikörpern zu färben (dargestellt durch grüne Färbung). Aktivierte YellowCaB-Zellen sind demnach durch eine gelbe Färbung (Überlagerung rotes und grünes Signal) zu erkennen. Die dichtere Packung der PNA⁺ B-Zellen auf der rechten Seite des dargestellten Keimzentrums (Detail) deutet auf die korrekte Ausbildung einer dunklen Zone, die gespreiztere Verteilung der YellowCaB-Zellen auf der linken Seite auf die Ausbildung einer hellen Zone hin. Wir konnten somit zeigen, dass der Transfer von YellowCaB-Zellen in Wirtstiere möglich ist, dass diese Zellen sich in Keimzentren ansiedeln sowie auch aktiviert werden können.

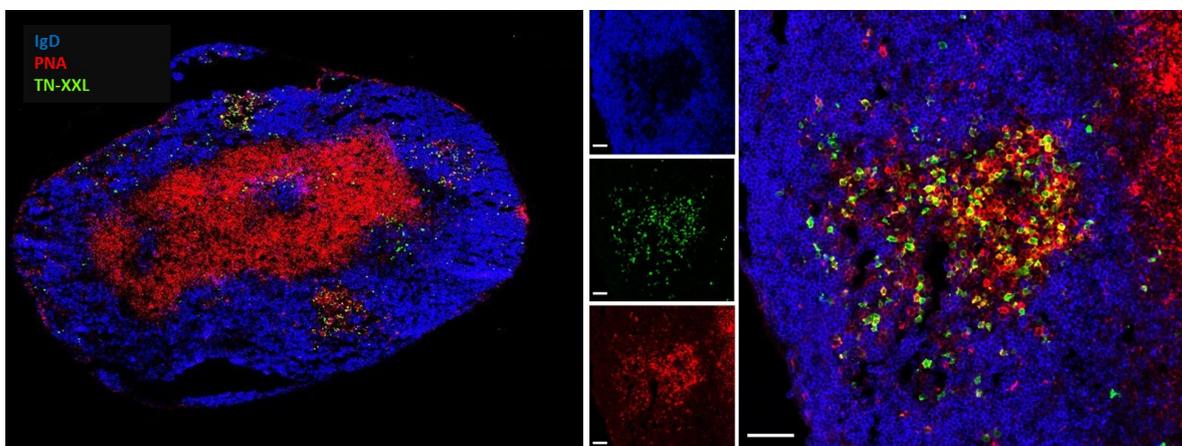


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Lymphknoten-Gefrierschnitts nach YellowCaB-Zelltransfer und Immunisierung mit NP-CGG. Als Empfängertiere wurden Thx-Mäuse mit restringiertem BCR-Repertoire verwendet, damit sich die adoptiv transferierten B-Zellen bevorzugt in den Keimzentren ansiedeln. Blau: anti-IgD-Alexa594 (naiver BCR), Grün: anti-GFP-Alexa488 (TN-XXL), Rot: PNA-bio (Erdnussagglutinin, biotinyliert), detektiert durch Streptavidin-Alexa555 (aktivierte B-Zellen und T-Zellen). Der Kachelscan des gesamten Lymphknotenlängsschnitts (links) zeigt mindestens 3 Keimzentren, der vergrößerte Detailauschnitt (rechts) und die Einzelfarbdarstellung (Mitte) zeigen die Infiltration des Keimzentrums mit TN-XXL⁺ Zellen. Sie sind aktiviert und besitzen keine IgD-Färbung (Marker für naive B-Zellen) mehr. Maßstabsbalken: 50µm.

3.3.2. Antigen-spezifische YellowCaB-Zellen migrieren in GCs von Wildtyp-Wirten

Nachdem der Transfer von B-Zellen mit einer irrelevanten Spezifität zu positiven Ergebnissen geführt hatte, kreuzten wir die YellowCaB-Reportertiere mit B1-8-Tieren. Diese Mäuse zeichnen sich durch B-Zellen aus, welche einen für das Antigen NP spezifischen BCR besitzen. Dadurch erkennen die adoptiv in C57BL6/J (Wildtypmäuse) transferierten B-Zellen nach Immunisierung mit NP-CGG in die Fußsohle dieses Antigen, welches ihnen im Keimzentrum präsentiert wird. Diese Methode ermöglicht die Messung standardisierter Interaktionen zwischen B-Zellen bekannter Reaktivität mit anderen Zellen und lässt Rückschlüsse zu auf das Verhältnis von Spezifität und Affinität der Zellen mit den korrelierten Parametern Calciumeinstrom und Motilität. Um den Einfluss der Affinität zu bestimmen, wurden B-Zellen mit zwei verschiedenen Rezeptoraffinitäten (B1-8lo:YellowCaB und B1-8hi:YellowCaB, siehe 2.1.1.) in der Keimzentrumsreaktion verglichen. Da die Spezifität des Rezeptors die Zellen bevorzugt in die Keimzentren migrieren lässt, ist eine geringere zu transferierende Zellzahl von 3×10^6 vonnöten. Wir konnten mit dieser Methode sowohl

nach Transfer von B1-8lo:YellowCaB als auch nach Transfer von B1-8hi:YellowCaB und Immunisierung in die Fußsohle Keimzentren in den poplitealen Lymphknoten von Wildtyp-Wirtstieren erzeugen. Diese enthielten fluoreszente B-Zellen in vermutlich unterschiedlichen Differenzierungsstadien, zu erkennen an unterschiedlicher Helligkeit und Größe (Abbildung 39). Zusätzlich wurden allen Tieren einen Tag vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung nicht-antigenspezifische, naive YellowCaB-Zellen gespritzt, die zur Unterscheidung mit dem roten Farbstoff *Cell Tracker Deep Red* (life technologies) gefärbt wurden. Dies dient zum einen der Lokalisierung des folliculären Mantels und zum anderen als interne Kontrolle und Vergleich zu antigenspezifischen Donorzellen.

Transfer von B1-8lo:YellowCaB-Zellen

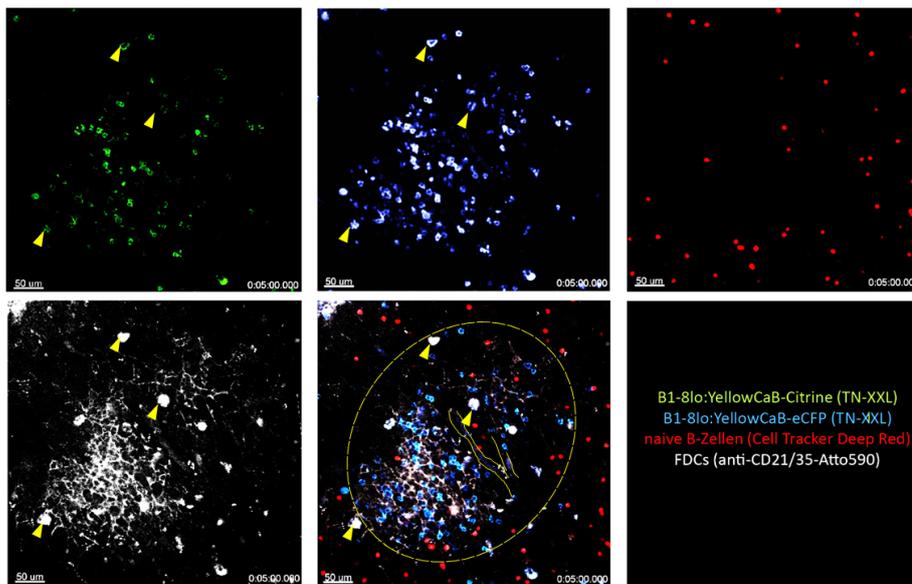


Abbildung 39: Intravitalmikroskopische Untersuchung eines B1-8lo-Keimzentrums, Tag 7 p.i. (eine Ebene in Z). Das Keimzentrum ist deutlich an der Ausbildung einer netzartigen Struktur, der FDCs (weiß) und der Überlagerung dieser mit TN-XXL⁺-Zellen zu erkennen, diese wiederum entweder durch die Fluoreszenz des Citrine-Restes des GECI (grün) bzw. durch die eCFP-Fluoreszenz (blau) zu erkennen (s.a. unten, Mitte, gelb gestricheltes Ellipsoid). Im Inneren des GC sind Blutgefäße zu erkennen (durch Autofluoreszenz der Epithelzellen, gelbe Linien). Die folliculären B-Zellen wurden vor dem Transfer mit Cell Tracker Deep Red gefärbt (rot) und lagern sich rund um das GC herum an, einige jedoch sind auch in Kontakt mit FDCs zu finden. Mit gelben Dreiecken gekennzeichnet sind Makrophagen, welche abgestorbene (negativ selektionierte) B-Zellen aufnehmen und in allen Kanälen (außer in rot) Autofluoreszenz emittieren. Standbild bei 5 von 10 Minuten, 500µm².

Auch der Zelltransfer antigenspezifischer B-Zellen mit geringerer Affinität des BCR führte zur Entstehung von Keimzentren in den Empfängertieren, wie Abbildung 39 zeigt. B1-8lo:YellowCaB-Zellen können damit an der Immunreaktion nach Fußsohlenimmunisierung teilnehmen, wie die intravitalmikroskopische Bildgebung bestätigt. Im Bild, das eine Momentaufnahme aus einer zehnmütigen Messung in einer Z-Ebene zeigt (die Dicke des aufgenommenen Stapels ist 120µm), ist die LZ eines Keimzentrums zu erkennen (gelbes Ellipsoid). Die LZ wird markiert durch das positive Signal in 593/40nm. In diesem Kanal emittiert der Antikörper anti-CD21/35-Atto590, mit welchem die FDCs gefärbt sind (weiß). Besonders deutlich zu sehen ist hier die retikuläre Struktur der Stromazellen mit feinen, länglichen Fortsätzen. Weiterhin ist die LZ an der Überlagerung des FDC-Signals mit YellowCaB-Zellen zu erkennen (grün/blau) (siehe auch **Film S01** – Aufnahme nicht mit der abgebildeten Messung identisch). Zusätzlich emittieren in den

Kanälen 466/40nm, 525/50nm sowie 593/40nm Makrophagen, welche einerseits Autofluoreszenz aufweisen und zusätzlich negativ selektierte YellowCaB-Zellen aufgenommen haben (gelbe Pfeile). Das GC wird umringt von den polyklonalen, naiven YellowCaB-Zellen, die wir einen Tag vor Bildgebung isoliert, gefärbt und intravenös verabreicht haben (rot). Wie erwartet zeichnen sie den folliculären Mantel nach und ihre Dichte ist dort, wo kein FDC-Signal zu sehen ist, größer (da sie noch nicht ins GC einwandern können bzw. gerade erst dazu befähigt werden). Auch Blutgefäße können anhand ihrer Autofluoreszenz identifiziert werden (Abbildung 39 unten, Mitte).

Transfer von B1-8hi:YellowCaB B-Zellen

Die Immunisierung nach Transfer von B-8hi:YellowCaB-Zellen erzeugte ebenfalls gut sichtbare Keimzentren, wie es auch nach Transfer von B1-8lo:YellowCaB-Zellen der Fall war (Abbildung 40). Diese scheinen allerdings, bei gleicher transferierter Zellzahl, dichter gepackt zu sein. Demnach wandern mehr antigenspezifische YellowCaB-Zellen mit hoher Affinität in diese Keimzentren ein, als antigenspezifische mit niedriger affinem BCR. Dieser Umstand erscheint logisch (aus diesem Grund mussten bei nicht antigenspezifischen Transfers wesentlich mehr Zellen transferiert werden und der Wirt bezüglich des BCR-Repertoires restringiert sein, siehe 3.3.1.), da die Affinität des BCR zum entsprechenden Antigen die bevorzugte Migration in die Keimzentren begünstigt. Bei der dargestellten Messung wurden ebenfalls nicht-antigenspezifische Reporter-B-Zellen mittransferiert, die zur Unterscheidung von den antigenspezifischen Zellen *ex vivo* gefärbt wurden.

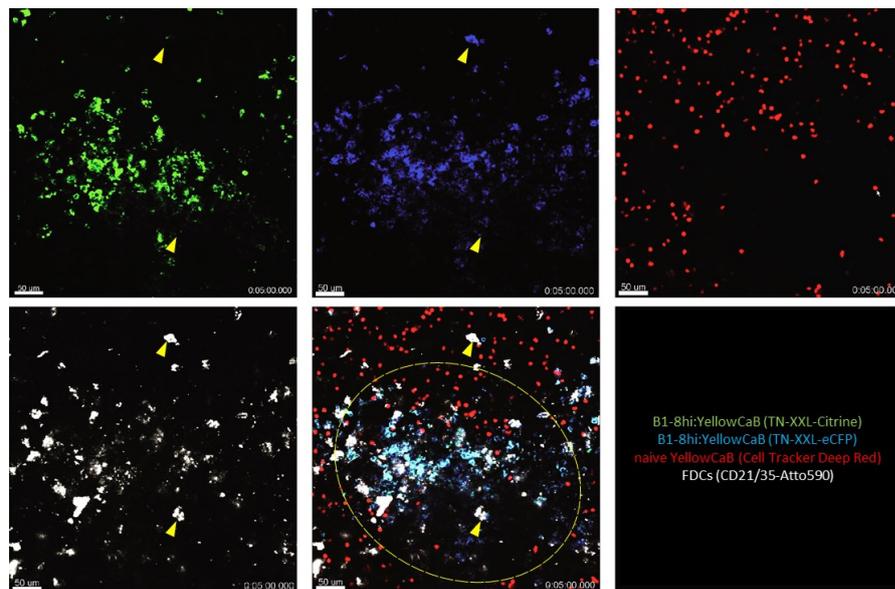


Abbildung 40: Intravitalmikroskopische Untersuchung eines B1-8hi-Keimzentrums, Tag 7 p.i. Das Keimzentrum ist in seiner Ausdehnung ähnlich groß wie das von B1-8lo:YellowCaB Zellen gebildete (s.o.). Einen Tag vor Präparation wurden zusätzlich mit Cell Tracker Deep Red gefärbte YellowCaB-Zellen (ohne Antigen-spezifität) transferiert, welche sich als naive oder folliculäre B-Zellen (rot) rund um das Keimzentrum ansiedeln und zum Teil auch hinein migrieren. Die Färbung der FDCs mit anti-CD21/35 (weiß) fällt hier verwackelter aus. TN-XXL⁺ B-Zellen (cyan durch Überlagerung von grün und blau) sind dichter gepackt als im B1-8lo:YellowCaB-GC. Die größeren Flecken, welche in allen Kanälen außer rot detektiert werden konnten, sind Makrophagen (gelbe Dreiecke). Standbild bei 5 von 47min, 500µm²

Über die Größenverhältnisse von B1-8lo:YellowCaB-Keimzentren zu B1-8hi:YellowCaB-Keimzentren kann keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Für eine Vermessung der GCs muss beachtet werden, dass die Keimzentren in individuell vom Tier abhängigen Tiefen liegen, auch lässt unsere Bildgebungstiefe in Z-Richtung zumeist nicht zu, ein komplettes Keimzentrum zu

vermessen. Wir erhielten also immer nur einen Ausschnitt der Follikel. Überdies können wir nicht davon ausgehen, dass die GCs in 3D immer gleich orientiert sind, d.h., ob wir z.B. nur die schmale Seite eines ellipsoiden GCs mikroskopieren. So kann es leicht zur Einschätzung einer falschen Korrelation kommen, da in diesem beschriebenen Falle das GC deutlich kleiner erschien, als es in Wirklichkeit ist. Es ist allerdings sehr wohl bekannt, dass Keimzentren im Verlaufe ihrer zeitlichen Entwicklung stark an Volumen zunehmen (33). Das hier gezeigte Standbild des B1-8hi:YellowCaB-Transfers stammt aus einer Aufnahme an Tag 7 p.i. und zeigt eine Z-Ebene aus einem Stapel mit 100µm Dicke. Es wurde versucht, das Volumen wenigstens näherungsweise zu bestimmen. Das GC besitzt ein genähertes Volumen von ca. $480\mu\text{m} \times 250\mu\text{m} \times 100\mu\text{m} = 12000000\mu\text{m}^3 = 0,012\text{mm}^3$ (Abbildung 40).

3.3.3. B-Zellen regen sich gegenseitig zum Calciumeinstrom an

Für das Verfolgen der Zellmigration, das sog. *Tracking*, stellt die Software Imaris (Bitplane) einen automatischen Trackingalgorithmus segmentierter Zellen zur Verfügung (siehe 2.2.6.). Meist ist es jedoch notwendig, vor allem, wenn die Analyse auf Einzelzellebene erfolgen soll, dass Tracks von Hand nachbearbeitet werden. Für die Auswertung von Zell-Zell-Kontakten wurden in Imaris zunächst dreidimensionale Oberflächen erstellt, welche dann anhand dieser Tracks verfolgt werden konnten. Tracks sind auch Voraussetzung dafür, dass statistische Kennwerte der Oberflächen (also der Zellen) exportiert und als zeitlicher Verlauf dargestellt werden können. Wir waren somit in der Lage, die Fluoreszenzintensitäten von eCFP und Citrine (bzw. des FRET-Signals, welches sich aus diesen ergibt) der jeweiligen Oberfläche und ihre Änderung über die Zeit zu exportieren und mit anderen Werten, wie z.B. der momentanen Geschwindigkeit zu korrelieren. Die momentane Geschwindigkeit ist definiert als:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta s}{\Delta t} = \frac{ds}{dt} = v(t)$$

Da sich die Zellen nicht mit uniformer Geschwindigkeit bewegen, variiert die Geschwindigkeit der Zelle zu jedem Zeitpunkt. Sie ist die Tangente $v(t)$ der Geschwindigkeitsfunktion $s(t)$ zum Zeitpunkt t (Abbildung 41).

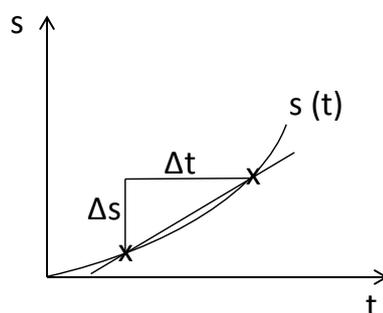


Abbildung 41: Die Momentangeschwindigkeit ist die Tangente der Geschwindigkeitsfunktion (Wegstrecke per Zeiteinheit) zum Zeitpunkt t .

Abbildung 42 zeigt Momentaufnahmen einer YellowCaB-Zelle über einen Zeitverlauf von knapp einer Stunde und ihr jeweiliges FRET-Signal dargestellt als Schattierungen einer Farbskala. Die

rötliche Färbung der Zelle bedeutet hier ein hohes FRET-Signal, hervorgerufen durch Calciumeinstrom, eine blaue Färbung entspricht einer niedrigen intrazellulären Calciumkonzentration. Der Weg der Zelle vorbei an (durch weiße Färbung dargestellten) FDCs kann durch die graue Tracklinie nachverfolgt werden (von links oben nach rechts unten). Ab Minute 37 bildet sich ein Kontakt zwischen der getrackten YellowCaB-Zelle (Zelle 1) und einer zweiten YellowCaB-Zelle (Zelle 2) aus, die ihrerseits stabilen Kontakt zu FDCs hält. Der Kontakt zwischen den beiden YellowCaB-Zellen scheint in einer Erhöhung des FRET-Signals in Zelle 1 zu resultieren. Abbildung 43 zeigt den Zustand dieser Zelle am Ende der Messung nach 51,5 Minuten im Detail.

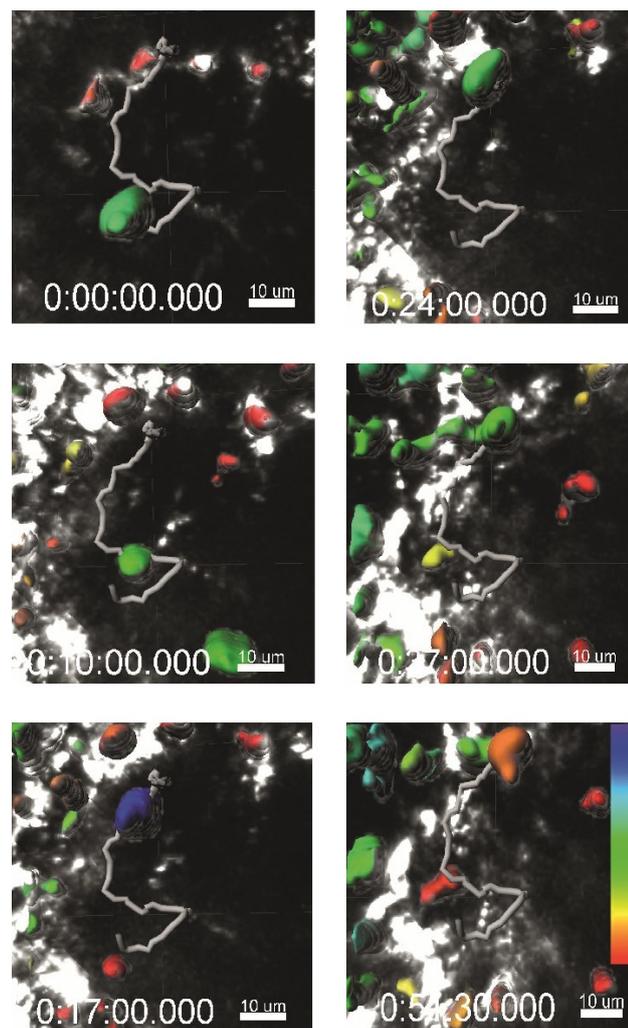


Abbildung 42: Getrackte YellowCaB-Zelle und CD21/35-Atto590-FDC-Signal (weiß). Momentaufnahmen nach null, zehn, 17, 24, 37 und 51,5 Minuten (von oben nach unten, links nach rechts). Die graue zylinderförmige Linie (Track) zeichnet die Zellbewegung nach. Die Färbung der Zelle von blau bis orange kodiert für ihre FRET-Intensität (blau=niedrige FRET-Intensität, d.h. wenig Calcium/ orange=hohe FRET-Intensität, Calciumeinstrom)

Zelle 1 besitzt nun eine orange-rote Färbung, und damit ein erhöhtes FRET-Signal, während Zelle 2 ein niedrigeres Signal besitzt, dargestellt durch grüne Färbung. Die gesamte Zellbewegung sowie die Veränderung des FRET-Signals kann in **Film S02** verfolgt werden, ein weiteres Beispiel für dasselbe Phänomen aus einer anderen Messung ist in **Film S03** zu sehen. Hier ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass Zelle 1 während ihrer Bewegung durch das GC meist ein mittleres

FRET-Signal aufweist, gegen Ende der Messung zum Stillstand kommt, mit Zelle 2 Kontakt aufnimmt und das FRET-Signal schließlich ansteigt.

Da die Momentangeschwindigkeit nie gleich null sein wird sondern durch Schwankungen, die bei der Bildgebung z.B. aufgrund minimaler Druckänderungen (Blut- und Lymphfluss, Temperaturschwankungen) oder solche die bei der Anregung mit Laserlicht entstehen, immer eine gewisse Größe aufweisen wird, ist weiterhin eine Betrachtung der Dislozierungsrate sinnvoll. Dislozierung ist dabei die gerade Entfernung zwischen Anfang und Ende des Tracks ohne Berücksichtigung der Strecke, die dabei zurückgelegt wird. Die Dislozierungsrate teilt diese Größe durch die verstrichene Zeit. Die Änderung der Dislozierungsrate ist mathematisch gesehen die erste Ableitung dieser Funktion. Nimmt sie den Wert null an, kann vom Stillstand der Zelle ausgegangen werden.

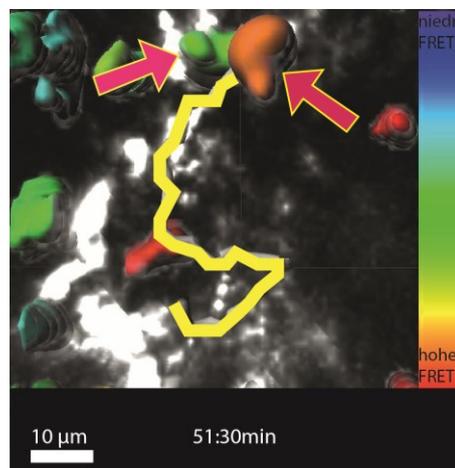


Abbildung 43: Letzter Zeitpunkt der getrackten Zellbewegung (gelb) durch den Lymphknoten. Die Zelle kommt am gezeigten Punkt zum Stillstand (rechter Pfeil) und erhöht ihr FRET-Signal von zuvor blau-gelb nach Orange, was auf einen Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle hindeutet. Die Zelle scheint Kontakt zu einer sessilen Zelle aufzunehmen, die ihrerseits in engem Kontakt mit CD21/35-Atto590⁺ Zellen steht. Das Calciumsignal in dieser Zelle erhöht sich nicht oder schwankt nur unwesentlich (Film S02).

Abbildung 44 zeigt einen deutlichen Zusammenhang der Motilitätsparameter Momentangeschwindigkeit und Dislozierungsratenänderung mit der Änderung des FRET-Signals in Zelle 1. Das auf die Basislinie normalisierte FRET-Signal steigt insgesamt um 15%. Als Basislinie wurde der Median der FRET-Werte innerhalb der ersten 15 Minuten festgelegt. Nach etwa 15 Minuten sinkt die Momentangeschwindigkeit deutlich ab, d.h. die Zelle wird abgebremst, kurz darauf beginnt das FRET-Signal zu steigen. Nach 20 Minuten steigt es deutlich über die Basislinie an um nach weiteren zehn Minuten eine Art Plateau zu erreichen. Die Dislozierungsratenänderung nimmt zu diesem Zeitpunkt den Wert null an.

Die Analyse des Filmes **S02** zeigt, dass Zelle 1 während der Messung transiente Kontakte zu den umliegenden FDCs eingeht. Um herauszufinden, wie der Kontakt zu FDCs zur Änderung der Motilitätsparameter und zur Änderung des FRET-Signals beiträgt, quantifizierten wir die Kolokalisierung zwischen FDC-Signal und TN-XXL-Signal (Citrine), indem wir in Imaris einen Kolokalisierungskanal festlegten. Mithilfe dieses Kanals lässt sich die Überlappung der beiden Signale als Intensität darstellen. Um herauszufinden, wie groß diese Intensität sein muss, damit wir von einer Kolokalisierung sprechen können, beobachteten wir fünf getrackte Zellen in derselben

Messung. Wir konnten die Kolokalisierung entsprechenden Intensitätsspitzen im Kolokalisierungskanal zuordnen (Abbildung 45, oben, Pfeile). Die Sichtung des Videomaterials ergab ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den sich berührenden Zellen und den Intensitätsspitzen. Wir definierten daher eine Intensität von 50 Einheiten als positive Kolokalisierung zwischen dem FDC-Signal und dem TN-XXL-Signal. Wendet man diese Vorgehensweise auf Zelle 1 und 2 an, wird deutlich, dass Zelle 2 im Gegensatz zu Zelle 1 über den gesamten Beobachtungszeitraum mit FDCs kolokalisiert ist (Abbildung 45, unten links). Stellt man die Intensität der Kolokalisierung von Zelle 1 auf einer nicht-logarithmischen Skala dar, zeigen sich Intensitätspeaks bei sechs und 15 Minuten.

Die bewegliche Zelle 1 geht also mehrmals kurze, transiente Bindungen mit den FDCs ein, als würde sie sie „abtasten“. Dieses Verhalten korreliert mit einer Abnahme der Momentangeschwindigkeit bei 15 Minuten (Vgl. Abbildung 44). Nach 20 Minuten beginnt auch das FRET-Signal zu steigen. Schließlich – hier kommt Zelle 1 nach ca. 30 Minuten komplett zum Stehen – erscheint Zelle 2 im Imagingvolumen und nimmt durch Ausstülpung des Zellkörpers Kontakt zu Zelle 1 auf. Zelle 2 hat nachhaltigen Kontakt zu den umgebenden FDCs. Der Calciumspiegel in Zelle 1 erhöht sich weiter.

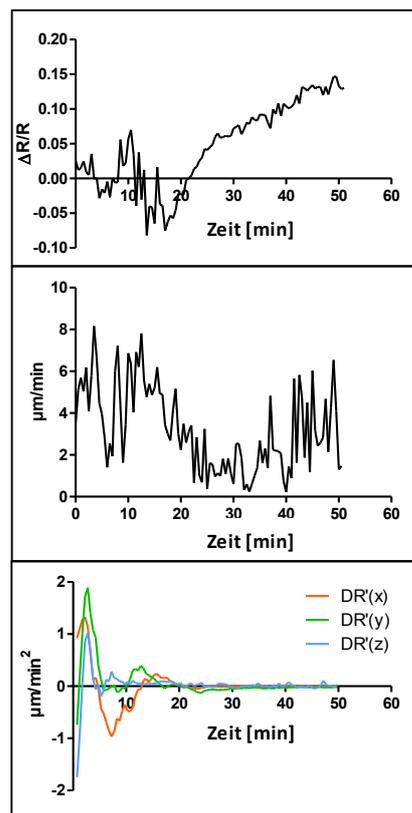


Abbildung 44: Vergleich des FRET-Signals, der Momentangeschwindigkeit sowie der Änderung der Dislozierungsrate in X-, Y-, und Z-Koordinatenrichtung der verfolgten Zelle 1. Die Momentangeschwindigkeit (Mitte) beginnt bereits abzufallen, bevor das FRET-Signal steigt (oben). Die Dislozierungsratenänderung nimmt nach 6 Minuten dramatisch ab und erreicht in alle Richtungen den Wert 0 nach 30 Minuten (unten). Nach 30 Minuten steigt das FRET-Signal noch einmal an, nachdem es zuvor ein Plateau erreicht hatte.

Die Kurve des FRET-Signals zeigt an dieser Stelle eine Stufe, d.h. verlässt ein zuvor erreichtes Plateau – möglicherweise haben also die erhaltenen Signale einen additiven Effekt auf den

Calciumspiegel. Ein ähnliches Verhalten konnte dreimal in drei verschiedenen Messungen beobachtet werden. Damit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass B-Zellen sich gegenseitig durch Zellkontakt zur Signaltransduktion anregen können und entsprechende Signale weitergeben.

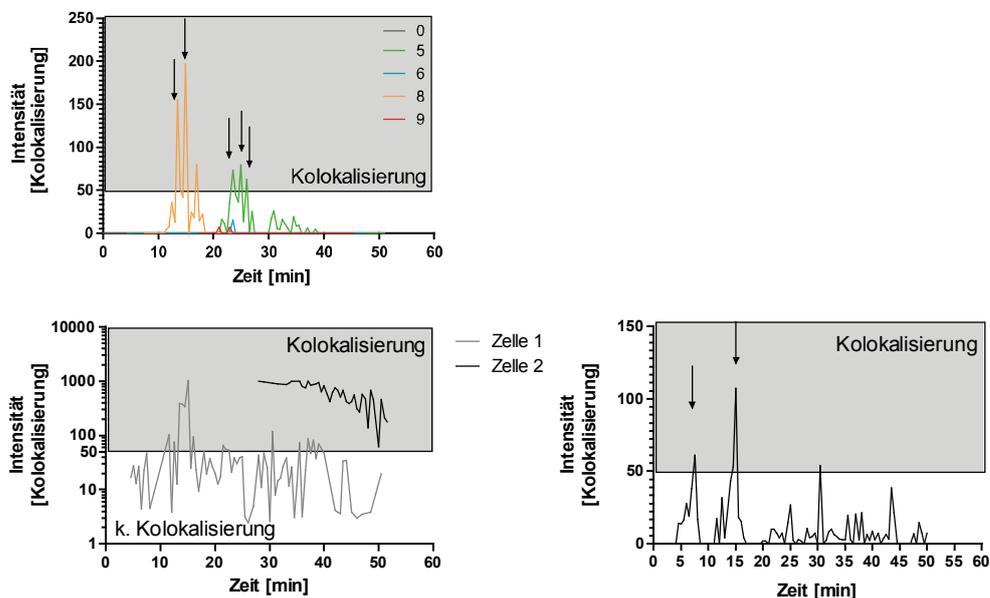


Abbildung 45: Strategie zur Feststellung der Kolokalisierung von FDCs und YellowCaB-Zellen. Oben: Zunächst wurden fünf getrackte Zellen während der Keimzentrumsreaktion beobachtet (Track-Nummern 0, 5, 6, 8 und 9). Die YellowCaB-Zellen der Tracks 5 und 8 konnten mehrmals bei der Kolokalisierung mit FDCs beobachtet werden (siehe Pfeile). Wir definierten somit das Auftauchen dieser Peaks für einen Intensitätswert von 50 als kolokalisiert. Überträgt man diese Vorgehensweise auf die getrackten Zellen 1 (Abbildung 43, rechter Pfeil) und 2 (Abbildung 43, linker Pfeil) wird deutlich, dass Zelle 2 die ganze Beobachtungszeit über mit dem FDC-Signal kolokalisiert (unten links). Betrachtet man das Signal von Zelle 1 auf einer nicht logarithmischen Skala, fällt auf, dass auch diese Zelle auf ihrem Weg durch das Keimzentrum mindestens zwei kurze, transiente Kontakte ausbildet.

3.3.4. Keimzentren besitzen B-Zellpopulationen mit hoher BCR-Aktivität

Stellt man das FRET-Signal der einzelnen B-Zellen zu jedem Zeitpunkt ihrer jeweiligen Momentangeschwindigkeit gegenüber, so erhält man Punktwolkendiagramme, die verdeutlichen, dass die Zustände der Zellen äußerst heterogen verteilt sind. So gibt es „schnelle“ Zellen, die ein niedriges FRET-Signal zeigen, aber auch viele langsame, die ein hohes FRET Signal zeigen, wie man es gemäß der Ergebnisse aus 3.3.3. erwarten würde. Allerdings bestehen daneben auch alle anderen denkbaren Zwischenzustände und es lassen sich, da die Zellen ihr Calciumsignal über die Zeit verändern, keine scharf abgrenzbaren Populationen ausmachen.

Abbildung 46 zeigt das Punktwolkendiagramm aus Daten AG-spezifischer Zellen (B1-8lo, schwarz) und naiver Zellen (rot). Es handelt sich um vereinigte Werte dreier Tiere aus je einer Messung. Der Großteil der Zellen besitzt Momentangeschwindigkeiten von unter $12\mu\text{m}/\text{min}$ und FRET-Werte von 12,5-15. Bei einem Median von 13,88. Die Verteilung ähnelt einer Normalverteilung, weist aber eine Schulter langsamerer Zellen mit höherem FRET-Signal auf. Die gewählten Quadranten bezeichnen Zustände von Zellen, die außerhalb dieses Bereichs liegen. Nur wenige Zellen treten deutlicher hervor. Der Vergleich zwischen antigenspezifischen TN-XXL^+ -Zellen und einen Tag zuvor transferierten, folliculären, naiven B-Zellen zeigt kleine Unterschiede. Es gibt wenige naive Zellen (Abbildung 46, rot), die sich in einem niedrigeren FRET-Bereich bewegen, allerdings reicht die naive Population auch weiter in den höheren FRET-Bereich hinein,

wenn auch nicht so weit wie eine kleine Population an AG-spezifischen, TN-XXL⁺ B-Zellen. Auch gibt es AG-spezifische B-Zellen, die schneller sind als der Großteil und Momentangeschwindigkeiten bis zu 23 $\mu\text{m}/\text{min}$ erreichen.

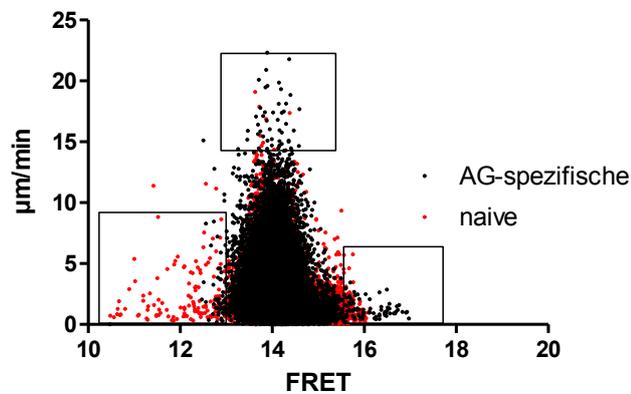


Abbildung 46: Punktwolkendiagramm der Momentangeschwindigkeit versus FRET-Signal. Gezeigt sind B1-8lo-YellowCaB-Zellen (Tag 7 p.i.) (schwarz) sowie einen Tag zuvor transferierte folliculäre YellowCaB-Zellen (rot). Jeder Punkt stellt den Zustand einer Zelle zu einem Zeitpunkt dar. N=3.

Wenn man Einzelzellen über einen Zeitraum von einer Stunde verfolgt, werden Unterschiede im Calcium-Signaling zwischen naiven TN-XXL⁺ und antigenspezifischen TN-XXL⁺ Zellen deutlich. Wir segmentierten zunächst die naiven YellowCaB-Zellen anhand der roten Fluoreszenz im Kanal 655/40nm. Mit dieser Segmentierung konnten mittels Maskierung alle Bereiche festgelegt werden, in welchen ein antigenspezifisches FRET-Signal gemessen werden konnte, d.h. überall dort, wo das Citrine- oder eCFP-Signal nicht mit der roten Fluoreszenz überlagert ist. Mehrere Zellen wurden automatisch über die Zeit getrackt und die Tracks ggf. nachbearbeitet. Stellt man die gemessenen FRET-Signale über die Zeit der Messung dar und vergleicht die zwei Populationen der antigenspezifischen und naiven YellowCaB-Zellen, werden ebenfalls Unterschiede deutlich (Abbildung 47).

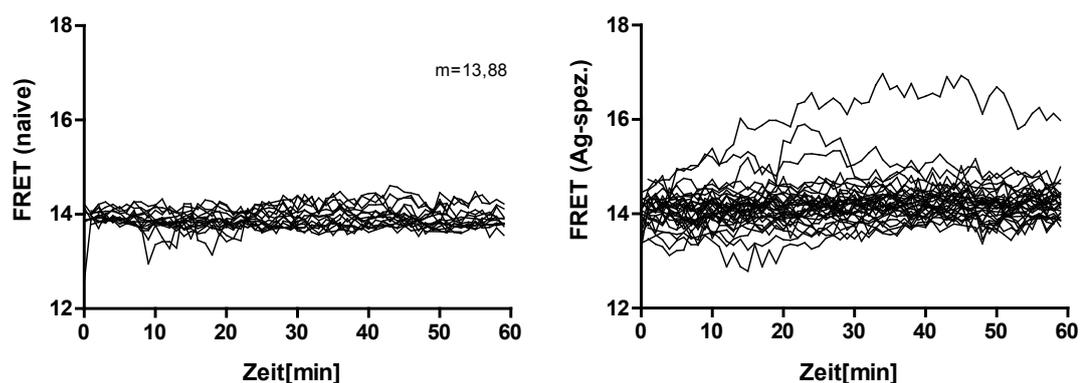


Abbildung 47: FRET-Signaling von B1-8hi:YellowCaB-Zellen innerhalb einer Stunde, intravital aufgenommen auf ihrem Weg durch das Keimzentrum (Tag8 p.i.). Naive YellowCaB-Zellen (links) erreichten im Mittel einen FRET Wert von 13,88 (Median). Das Calciumsignal der antigenspezifischen B-Zellen (rechts) pendelt ebenfalls um diesen Wert, allerdings ist eine größere Streuung der Werte erkennbar. Einige Tracks zeigen einen deutlichen Anstieg im FRET-Signal über den Mittelwert.

Die FRET-Werte der naiven YellowCaB-Zellen schwanken weitaus weniger um den Median von 13,88 als die Werte der AG-spezifischen Zellen. Unter ihnen befinden sich einige, die deutliche

Anstiege des Signals zeigen und auch solche, bei welchen das Signal wieder abfällt, nachdem es zuvor einen höheren Wert angenommen hatte. Da wir nur einen kleinen Ausschnitt der Keimzentrumsreaktion messen, können wir aus den Intravitaldaten des Calciumeinstroms nicht herleiten, welches der Grundzustand der Zellen war, also welche Calciumkonzentration das Basislevel darstellte. Demzufolge ist ein Abfall des FRET-Signals nicht als „negatives“ Signaling zu werten, sondern vermutlich als Rückkehr zum Grundzustand.

Vor allem die antigenspezifischen Zellen weisen also eine große Heterogenität im Signaling auf. Offensichtlich gibt es einige B-Zellen (vor allem antigenspezifische), deren Calciumkonzentration über die Zeit ansteigt und über längere Zeit aufrechterhalten wird. Um auszuschließen, dass es sich dabei um eine zufällige Beobachtung handelte, sammelten wir Daten aus fünf unabhängigen Intravitalmessungen von B1-8hi- und B1-8lo:YellowCaB-Keimzentren (Tag 7 und 8 p.i.). Um die Daten vergleichen zu können, wurde der Mittelwert der naiven Zellen aus allen diesen fünf Messungen von den im Verlauf der Messung maximal erreichten FRET-Werten abgezogen und die erreichten Werte als Häufigkeitsverteilung dargestellt (Abbildung 48).

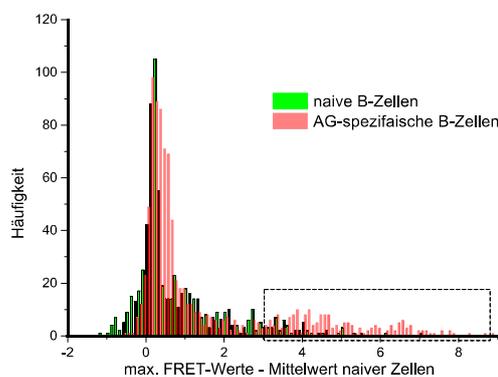


Abbildung 48: Histogramm normierter FRET-Signale, Vergleich AG-spezifischer und naiver YellowCaB-Zellen. Von den jeweiligen maximalen FRET-Signalen wurde, damit mehrere Messungen vergleichbar wurden, der Durchschnittsmaximalwert der FRET-Signale der naiven Zellen aller Messungen abgezogen. Es gibt wenige AG-spezifische B-Zellen (rot), die ein erhöhtes FRET-Signal haben (gestrichelter Kasten). Diese Population fehlt bei den naiven B-Zellen. N=5, Daten verschiedener Tage und Affinitäten gepoolt.

Tatsächlich sehen wir im Histogramm der antigenspezifischen YellowCaB-Zellen eine Population mit FRET-Werten, die im Vergleich zu den naiven YellowCaB-Zellen um 4-8% erhöht sind. Auch innerhalb der naiven Zellen finden sich einige, die verglichen mit der Mehrheit der Zellen ein erhöhtes Signaling aufweisen. Allerdings sind die normierten FRET-Werte der naiven Zellen auf der Skala auch insgesamt weiter nach links verschoben. Ein kleiner Teil der transferierten Zellen ist also jeweils aktiv und ihr Calciumspiegel scheint sich über die Zeit zu erhöhen. Die hier verwendeten Daten sind unabhängig von Affinität der Transferzellen und Tag nach Immunisierung gepoolt. Wir vermuteten aber ebenfalls einen Zusammenhang von steigendem Calciumspiegel mit der Affinität des BCR im Verlauf der Keimzentrumsreaktion, daher untersuchten wir als Nächstes die Entwicklung der FRET-Signale von B1-8hi:- und B1-8lo:YellowCaB-Zellen über einen Zeitverlauf von insgesamt drei Wochen (3.3.5.) getrennt voneinander.

3.3.5. FRET-Signale steigen über die Zeit und mit zunehmender Antigenpezifität an

Wir wollten herausfinden, ob die Zellen möglicherweise einen Schwellenwert der intrazellulären Calciumkonzentration erreichen müssen, um zur terminalen Differenzierung zu gelangen, d.h. damit das Signal erhalten, sich zu Plasma- oder Gedächtniszellen zu entwickeln. Wir haben uns dazu entschieden, die Entwicklung des FRET-Signals von transferierten B1-8hi:YellowCaB-Zellen und B1-8lo:YellowCaB-Zellen innerhalb eines Messzeitraumes von drei Wochen zu verfolgen. Je drei Keimzentren wurden dazu an den Zeitpunkten Tag 7, Tag 10 und Tag 21 p.i. intravitalmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 17). Für die Auswertung dieses Experimentes wurde die unter 2.2.6. beschriebene Analyseverfahren für die Beschreibung von Extremwerten des Quenchings von TN-XXL benutzt, da wir einen langen Zeitraum der GC-Reaktion beobachteten und erwarteten, dass hier höhere Calciumkonzentrationen (und damit ein starkes Quenching des Sensors) erreicht würden.

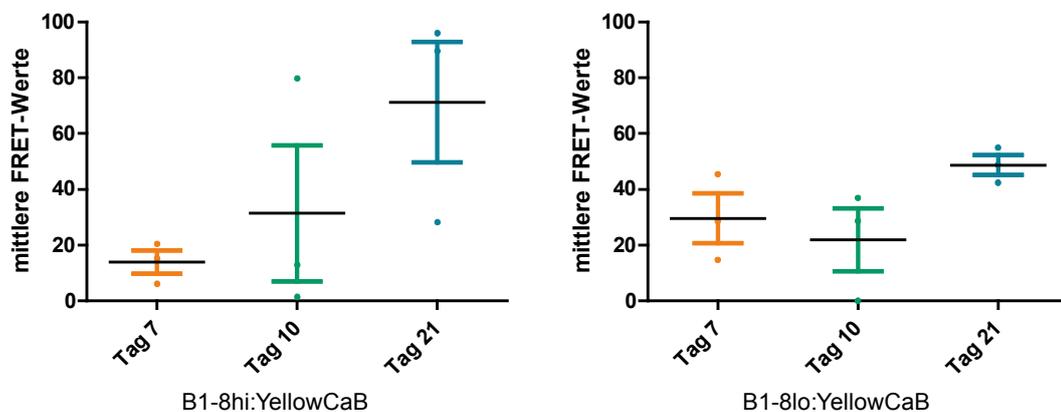


Abbildung 49: Entwicklung der FRET-Werte im Verlaufe der Keimzentrumsreaktion. Für B1-8hi-Keimzentren (links) konnte ein positiver Trend des mittleren FRET-Signals der B-Zellen gezeigt werden. Individuelle Unterschiede der Immunreaktionen einzelner Tiere sorgen für eine große Streuung der Werte. N=3, außer B1-8hi:YellowCaB Tag 21, hier wurden drei GCs aus zwei Tieren zusammengefasst. Ungepaarter Student'scher T-Test, $p > 0,05$, Mittelwert und Standardfehler.

Während B1-8hi:YellowCaB-Zellen den Trend eines Anstiegs der Calciumkonzentration innerhalb der Dauer der Keimzentrumsreaktion vermuten lassen, ist dieser Trend bei Keimzentren, in die B1-8lo:YellowCaB-Zellen eingewandert sind, weniger deutlich (Abbildung 49). Auch deuten die großen Varianzen auf starke individuelle Unterschiede zwischen den Tieren. Wir überprüften die hier getroffene Aussage und werteten die Daten zusätzlich anhand der maximal erreichten FRET-Werte, bezogen auf die mittleren FRET-Werte naiver YellowCaB-Zellen aus (nicht gezeigt). Dies bestätigte, dass das FRET-Signal der B1-8hi:YellowCaB-Zellen innerhalb von drei Wochen ansteigt, das der B1-8lo:YellowCaB-Zellen jedoch nicht. B1-8hi:YellowCaB-Zellen besitzen also im Gegensatz zu B1-8lo:YellowCaB-Zellen scheinbar einen Selektionsvorteil in der Affinitätsreifung. Nicht auszuschließen ist auch ein Selektionsvorteil der endogenen B-Zellen gegenüber den B1-8lo:YellowCaB-Zellen, weswegen die FRET-Werte der Donorzellen hier niedrig bleiben.

B1-8hi:YellowCaB-Zellen bilden in diesem Modell den Zustand ab, in dem der BCR schon weiter in der Affinitätsreifung fortgeschritten ist. Die Untersuchung zeigte, dass sich die Calciumkonzentration und damit das FRET-Signal im Verlaufe von zwei Wochen deutlich

verändert, und zwar vor allem gegen Ende der Keimzentrumsreaktion. Die Affinitätsreifung ist also zum Ende der Keimzentrumsreaktion beschleunigt. Das FRET-Signal steigt umso stärker, je höher die Affinität des BCR zum Antigen ist, vergleicht man die Donorzellstämme mit unterschiedlicher Affinität. Die Tatsache, dass die mittleren FRET-Werte von B1-8hi:YellowCaB-Zellen im Verlauf von mehreren Tagen um bis zu 50% zunehmen, spricht für die Hypothese, dass B-Zellen im Verlaufe ihrer Entwicklung höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen infolge erfolgreicher BCR-Interaktionen mit anderen Zellen ansammeln.

3.3.6. GC-B-Zellpopulationen zeigen differenzierungsabhängige Calciumkonzentration

Einflüsse der Helligkeit des Sensors TN-XXL, Gewebe-verursachte Streuungen und das Überstrahlen mehrerer Fluoreszenzkanäle durch das Donorfluorophor eCFP erschweren die ratiometrische Messung von Intravitaldaten. Daher wollten wir, zur genauen Unterscheidung verschiedener Populationen im Keimzentrum, auf ein System zurückgreifen, welches intensitätsunabhängig ist (siehe 2.2.7.). Diese Möglichkeit bietet FLIM. Der Versuchsaufbau für die Messung der Lebensdauern des Donorfluorophors eCFP entspricht dem der ratiometrischen Messung, mit dem Unterschied, dass im blauen Kanal 466/40nm statt eines PMT das TCSPC verbaut wird und so die Abklingkurve der blauen Fluoreszenz in den B-Zellen gemessen werden kann. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzintensität des Citrine-Restes aufgenommen, sowie die die Fluoreszenz mit Cell Tracker Deep Red gefärbter naiver YellowCaB-Zellen, welche einen Tag vor der Lymphknotenpräparation transferiert wurden.

Abbildung 50 zeigt das gewichtete Summenbild der Fluoreszenzlebensdauer τ vom Donorfluorophor eCFP des Sensors TN-XXL in der Z-Ebene 1 (in diesem Beispiel wurde über 21 Z-Ebenen jede Minute und alle $4\mu\text{m}$ ein Bild aufgenommen, der Stack besitzt also eine Dicke von insgesamt $80\mu\text{m}$) zum angegebenen Zeitpunkt. Gelb markiert ist mittig das Keimzentrum erkennbar, in welchem sich viele YellowCaB-Zellen zusammenballen und am unteren Rand die Markstränge, die etwas größere Zellen mit größerer Fluoreszenzintensität beherbergen (Abbildung 50, A). Gut zu erkennen sind die Markstränge auch an ihrer Autofluoreszenz im roten Fluoreszenzkanal (Abbildung 50, A), während sie im gewichteten FLIM-Bild aufgrund ihrer geringen Intensität blau erscheinen (Abbildung 50, B). Im **Film S04** ist die Bewegung der Zellen deutlich zu erkennen. Das Bild der YellowCaB-Zellen innerhalb des Keimzentrums wird von einer rötlich-orangen Farbgebung dominiert. Dies bedeutet, dass die Mehrheit der eCFP-Moleküle in den Keimzentrums-B-Zellen ungequencht vorliegt. Es kann somit ausgesagt werden kann, dass in jenen Zellen kein aktives BCR-Signaling stattfindet. Einige wenige Zellen jedoch (hier durch blaulila Pfeile gekennzeichnet) erscheinen türkis, dies entspricht laut unserer Skala einer gequenchten Lebensdauer von eCFP von etwa 1,2-1,3ps. Interessanterweise zeigen auch die etwas größeren, hellen Zellen in den Marksträngen, vermutlich weiter ausdifferenzierte B-Zellen oder Plasmablasten, aktives BCR-Signaling. Bisher war fraglich, ob Zellen einer fortgeschrittenen Differenzierungsstufe noch immer aktives Signaling aufweisen.

Die Experimente bestätigen, was wir durch die ratiometrische Auswertung (siehe 3.3.4.) bereits zeigen konnten: Wenige B-Zellen im Keimzentrum haben signalaktive BCRs, deren Aktivierung durch Antigen zum Calciumeinstrom führt.

Wir haben nun die vorliegenden Daten mithilfe der Phasor-Methode (siehe 2.2.7.) ausgewertet und dabei verschiedene Populationen im Imagingvolumen anhand ihrer Lokalisation festgelegt. Dabei wurde zwischen antigenspezifischen B-Zellen (also allen nicht-rot gefärbten YellowCaB-Zellen) innerhalb des Keimzentrums und solchen außerhalb des Keimzentrums unterschieden, sowie zwischen naiven, also rot-gefärbten YellowCaB-Zellen, ebenfalls innerhalb und außerhalb des Keimzentrums.

Wie Abbildung 51 zeigt, haben einige B-Zellen einen Phasor im Bereich des gequenchten eCFP, und zwar zeigt dieser umso weiter in Richtung vollständig gequenchten eCFPs, je fortgeschrittener die Reifung und Antikörperspezifität der B-Zellen ist. So liegen die naiven YellowCaB-Zellen außerhalb des Keimzentrums am weitesten links (aufgrund ihres ungequenchten eCFP-Anteils) und unten (aufgrund ihrer geringeren Helligkeit). Auf der x-Achse des Phasorplots ist der Realteil der FT aufgetragen, auf der y-Achse der Imaginärteil.

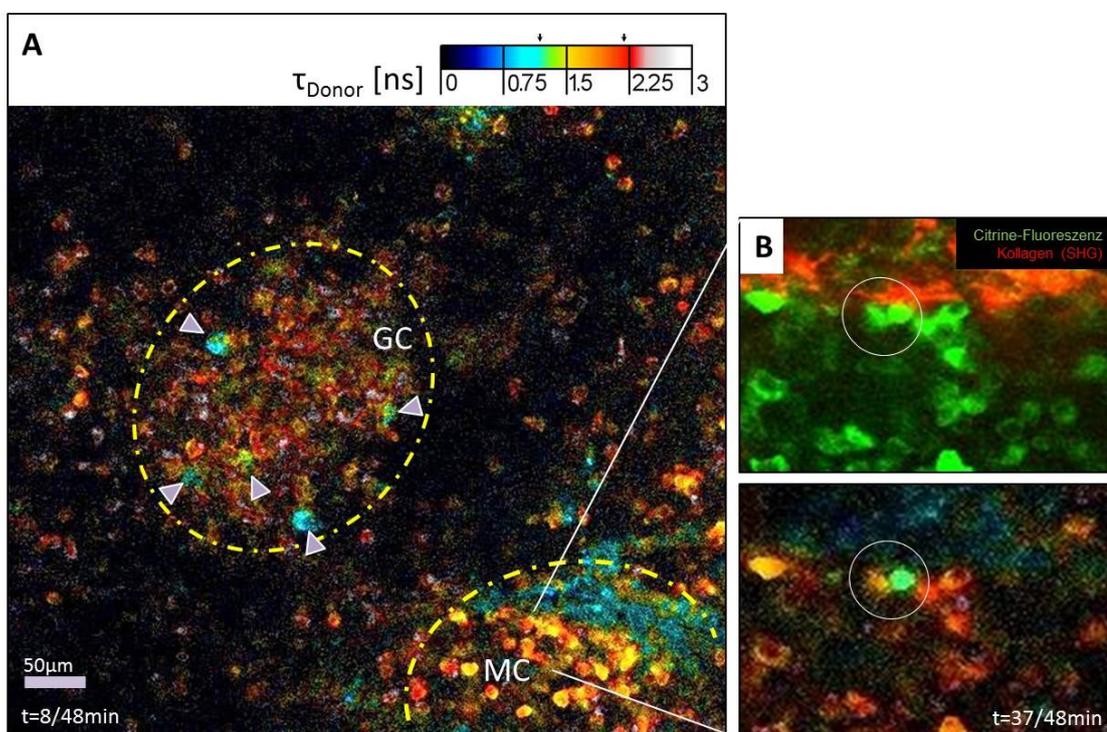


Abbildung 50: Farbodierte Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer τ vom Donor eCFP. A: Intravitale mikroskopische Untersuchung des Keimzentrums (GC) und der Markstränge (MC) nach Transfer von B1-8hi:YellowCaB-Zellen an Tag 7 p.i. Pfeile deuten auf B-Zellen im Keimzentrum die aufgrund ihres BCR-Signaling eine niedrige eCFP-Lebensdauer von ca. 1,26 ns zeigen und blau erscheinen. B: Detailaufnahme der Markstränge. Auch B-Zellen eines höheren Differenzierungsstadiums können sich gegenseitig zum Signaling anregen, es findet Calciumeinstrom in die rechte Zelle statt (weißer Kreis). Oben: Darstellung der Citrine-Fluoreszenz, unten, Fluoreszenzlebensdauermessung von eCFP. Daten repräsentativ für fünf Messungen, $n=3$.

Auch einige der naiven Zellen, die ins Keimzentrum gewandert sind, finden sich weiter rechts im Plot (besitzen einen größeren Realteil), zeigen also aktives BCR-Signaling. Einige antigenspezifische YellowCaB-Zellen, die sich außerhalb des Keimzentrums befinden, zeigen ebenfalls eCFP-Quenching und erhöhte Realwerte der FT. Die Phasoren der Keimzentrums-B-Zellen selbst reichen im Plot am weitesten nach rechts. Diese Zellen scheinen aufgrund ihrer hohen BCR-Affinität ein hohes Calciumlevel vorzuweisen. Für alle untersuchten Zellarten gilt auch hier, dass der Großteil wenig Calcium im Zytosol gespeichert hat und daher nur eine

Unterpopulation BCR-Signaling zeigt. Diese Unterpopulationen befinden sich aber entsprechend ihres Reifegrades und ihrer BCR-Affinität auf der Verbindungslinie zwischen ungequenchem und gequenchem eCFP umso weiter rechts, je höher ihr Reifegrad.

Trägt man den FT-Realwert als Häufigkeitsverteilung auf und vergleicht (hier an Tag 7 p.i.) die Populationen der naiven, folliculären (einen Tag zuvor transferierten) YellowCaB-Zellen innerhalb und außerhalb des GCs mit den antigenspezifischen B1-8hi:YellowCaB-Zellen innerhalb und außerhalb des GCs (entsprechend der Begrenzung des Keimzentrums (siehe gelbe Markierung in Abbildung 50), werden klare Unterschiede deutlich. Mit den verschiedenen Populationen, die wir aufgrund ihrer Lokalisierung im Imagingvolumen festgelegt haben, können wir die Entwicklung der Zellen vom naiven IgM⁺ YellowCaB-Zell-Pool mit polyklonalen und wenig affinen BCRs zum oligoklonalen B-Zell-Pool, in welchem die meisten B-Zellen den Klassenwechsel vollzogen und mehrere Affinitätsreifungsschritte durchlaufen haben, nachahmen.

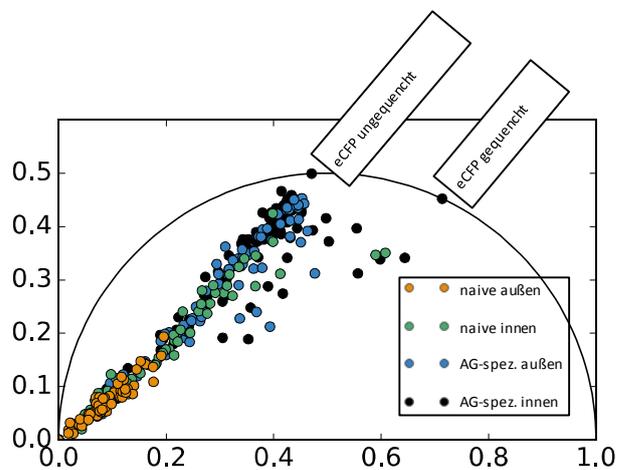


Abbildung 51: Phasorenplot für alle zum Zeitpunkt 8 (vgl. Abbildung 50) getrackten Zellen mit unterschiedlich farbiger Darstellung der untersuchten Zellpopulationen innerhalb und außerhalb des Keimzentrums. Die Zellen ordnen sich entsprechend eines Halbkreises zwischen den Werten für ungequenches und gequenches eCFP an. Die meisten naiven Zellen sind ungequencht bis auf wenige naive, die sich im Inneren des GC befinden und eventuell bereits Signale zur Differenzierung erhalten. Auch einige der antigenspezifischen YellowCaB-Zellen sind gequencht und zwar mehr im Inneren des GCs als außerhalb.

Wenn die Keimzentrumsreaktion beginnt, befinden sich die naiven Zellen zunächst außerhalb des Follikels, werden (z.B. durch T-Zellen) aktiviert, wandern hinein und erhalten weitere, Antigen-abhängige Signale. Sie differenzieren und proliferieren und ihre BCRs sind zunächst noch wenig affin. Wenn sie mehrmals durch SHM ihren Rezeptor editiert haben, steigt ihre Affinität, höher affine B-Zellen überleben bevorzugt (siehe 1.1.2). Dies scheint mit einer schrittweisen Steigerung der Calciumkonzentration in der Zelle zusammenzuhängen, wie unsere FLIM-Daten zeigen. Abbildung 52 stellt die Häufigkeitsverteilung der erreichten Werte des Realteils der FT dar. Das Histogramm einer Messung (links) zeigt beispielhaft die Verteilung der verschiedenen Unterpopulationen. Die mittleren Werte aus fünf Messungen wurden zusammengefasst und die Unterpopulationen verglichen (rechts). Es ist gut zu erkennen, wie eine Entwicklung von geringeren Realwerten hin zu höheren Realwerten und damit höheren Calciumkonzentrationen stattfindet. Zwar können naive Zellen und AG-spezifische nicht direkt verglichen werden, da es sich bei den

naiven um B-Zellen mit natürlichem BCR und bei den antigenspezifischen um Zellen mit transgenem BCR handelt, der von vornherein eine erhöhte Affinität zum Antigen besitzt, aber wir können so immerhin verschiedene Stadien der Affinitätsreifung im Keimzentrum modellieren.

Im Zuge ihrer Entwicklung hin zu antigenspezifischen B-Zellen erhöhen die Zellen vermutlich ihre intrazelluläre Calciumkonzentration, was die durchschnittliche Lebensdauer des Donorfluorophors eCFP verkürzt. Dies spiegelt sich wiederum in einer Verschiebung der Populationen auf der X-Achse nach rechts wider (Abbildung 51 und auch Abbildung 52, links). Bei der Aktivierung naiver Zellen steigt die Calciumkonzentration dabei am stärksten an. Die Unterschiede der mittleren Realwerte zwischen naiven Zellen außerhalb und innerhalb des GC sind signifikant verschieden, gleichzeitig ist die Streuung unter den naiven Zellen innerhalb des GCs größer. Die durchschnittliche Calciumkonzentration scheint sich einem Sättigungsplateau anzunähern, welches (für diesen Modellphänotyp) mit einem normalisierten FRET-Wert von etwa 0,4 korreliert.

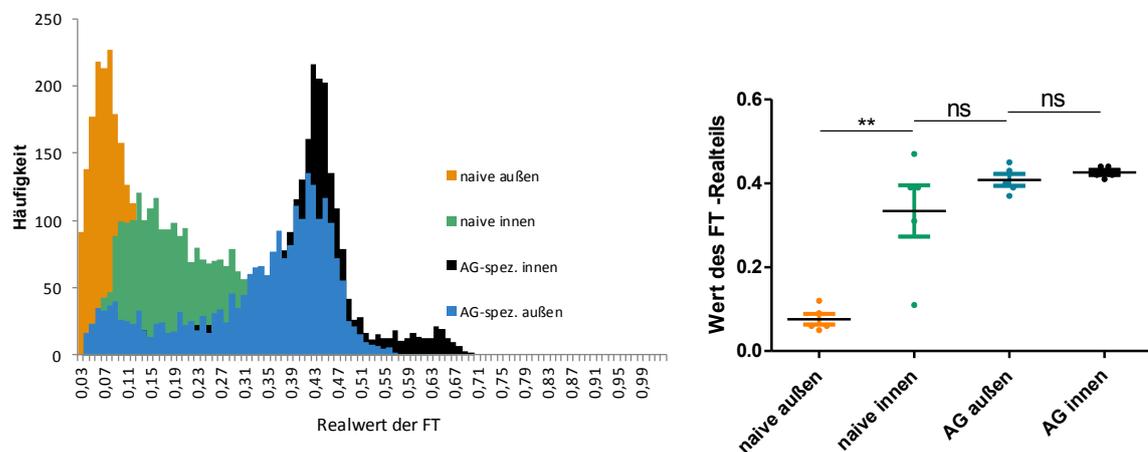


Abbildung 52: Histogramm der Realwerte der diskreten Fourier-Transformation, ermittelt aus den eCFP-Fluoreszenzlebensdauern transferierter antigenspezifischer oder naiver YellowCaB-Zellen (links) sowie Darstellung der entsprechenden maximalen Häufigkeitswerte für fünf Messungen (Mittelwerte, SD) (rechts). Die segmentierten Zellen im Imagingvolumen wurden anhand ihrer Färbung (naive YellowCaB-Zellen wurden mit Cell Tracker Deep Red gefärbt) und Lokalisation (innerhalb oder außerhalb des Keimzentrums entsprechend der Markierung in Abbildung 50) zu Subpopulationen zusammengefasst.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir die Rolle des BCR als signalübertragende Komponente in der Keimzentrumsreaktion näher untersucht. Unter anderem konnte zum ersten Mal *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass B-Zellen wiederholt spezifisch durch ihren BCR stimuliert werden können. Dies bildete, zusammen mit der Beobachtung, dass höher affine B-Zellen einen erhöhten Calciumspiegel haben, die Grundlage für unsere Annahme, dass eine bestimmte Anzahl von Restimulationen eine bestimmte Entwicklung der B-Zelle im Keimzentrum zur Folge hat. Die Calciumkonzentration in den Zellen steigt aufgrund dieses Mechanismus immer weiter, was durch mit der Zeit größer werdende FRET-Signale belegt werden konnte. Unsere Theorie, dass ein gewisser Schwellenwert der Konzentration überschritten werden muss, damit die Zellen sich terminal differenzieren können und als Plasmablasten oder Gedächtnis-B-Zellen die Keimzentrumsreaktion verlassen können, erscheint somit wahrscheinlich. Diese Theorie zu überprüfen, beispielsweise durch eine Kombination unseres Systems mit der artifiziellen Keimzentrumsnische *in vitro* (107, 108), oder mit den Mitteln der FLIM-Mikroskopie *in vivo* wird Gegenstand der sich anschließenden Forschung sein (weitere mögliche Anknüpfungspunkte werden in Abschnitt 4.6. vorgestellt). Zunächst jedoch sollen im Folgenden unsere Ergebnisse weiter interpretiert, auf Schlüssigkeit überprüft und in Beziehung zur gegenwärtigen wissenschaftlichen Forschung gestellt werden. Die Abschnitte 4.1. und 4.2. sollen dabei der Bewertung der Methodik geschuldet sein, die Abschnitte 4.3. bis 4.5. widmen sich den biologischen Fragestellungen.

4.1. Das YellowCaB-Mausmodell zur Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmung in B-Zellen

Es gelang uns, eine Maus zu konstruieren, die ein funktionelles Calcium-sensitives Fluoreszenzprotein ausschließlich in CD19-positiven B-Zellen exprimiert. Wir etablierten ein *in vitro*-Bildgebungsverfahren, welches es uns ermöglichte, Kulturen aus TN-XXL-positiven B-Zellen mithilfe der Technik der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Dabei wurden die Zellen im Perfusionssystem mit calciumhaltiger Ringerlösung überspült und das Verhalten des GECI TN-XXL nach Stimulation mit verschiedenen Reagenzien untersucht. Diese Tests sollten zunächst sicherstellen, dass der Sensor in der Lage ist, durch korrekte Umfaltung auf einströmendes Calcium zu reagieren und FRET zu erzeugen. Dazu wurde eine Änderung der Fluoreszenzintensität in den Detektionskanälen für eCFP und Citrine gemessen, jeweils nach der Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 405nm. Da Citrine nicht direkt durch 405nm Laserlicht angeregt werden kann, ist eine Erhöhung der Helligkeit in diesem Kanal auf Energietransfer vom Donorfluorophor eCFP zurückzuführen und resultiert daher aus einer Erhöhung der Calciumkonzentration in der Zelle.

4.1.1. *in vitro*-Validierung des GECI TN-XXL

TN-XXL reagierte in der Tat auf die unspezifische Stimulation mit Ionomycin, einem Ionophor, welches die Membran der Zellen permeabilisiert und die Ca^{2+} -Ionen bis zur Sättigung in die Zelle transportiert. Es war deutlich erkennbar, dass eCFP seine Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 405nm Laserlicht verringerte – durch Abgabe von Elektronen auf den Akzeptor – während sich

die Citrine-Intensität erhöhte (Abbildung 28). Ratiometrisch ausgedrückt, also gelbe und blaue Fluoreszenz ins Verhältnis R gesetzt, bedeutet dies einen signifikanten Anstieg von R, normalisiert auf den mittleren Wert von R vor der Stimulation.

Um zu ermitteln, ob sich der GECl TN-XXL auch unter naturnahen Modellbedingungen, d.h. im *in vivo*-Kontext, entsprechend verhalten würde und uns verwertbare Daten für die Untersuchung des BCR-Signalfusses liefern würde, verfahren wir ebenso für die spezifische Stimulation mit BCR-, TLR-, und CD40-Agonisten, mit dem Unterschied, dass wir das Perfusionssystem leicht manipulierten, d.h. den Durchfluss anhielten und wieder fortsetzten, um so ein Anstauen und Wieder-Auswaschen des jeweiligen stimulierenden Mittels zu erreichen. Dies hatte positive Auswirkungen auf die detektierbaren Signale, die durch ihren transienten Charakter (im Gegensatz zur anhaltenden Änderung der Fluoreszenzintensität nach Ionomycingabe, welches eine für die B-Zellen tödliche Calciumkonzentration einströmen lässt) andernfalls schlechter messbar gewesen wären.

Die Anregung des BCR führte zu einem geringeren Signalanstieg des FRET-Signals als die Ionomycingabe, was somit einem geringeren, physiologisch wirksamen Anstieg der Calciumkonzentration entspricht. Dieser Signalanstieg war transient, d.h. flachte nach einer Zeit von etwa 3 Minuten (auch ohne Auswaschen durch die Perfusionspumpe) wieder ab. ATPasen (Adenosintriphosphat verbrauchende Enzyme) in der Zell- und ER-Membran, Natrium-Calcium-Austauscher-Proteine, sowie Proteine der Mitochondrien setzen die intrazelluläre Ionenkonzentration durch ihre Pumpenaktivität unter Energieaufwand herab und stellen den ursprünglichen Gradienten zwischen Zelläußerem und Zellinneren damit wieder her (109–111). Als Resultat dessen sehen wir den beschriebenen Abfall des FRET-Signalverhältnisses. Überraschenderweise gelang es uns, diesen Effekt mehrmals hintereinander in derselben Zelle hervorzurufen. Wir konnten Zellen bis zu fünf Mal nacheinander mit anti-IgM-F(ab)₂-Antikörperfragment bzw. anti-kappa-Antikörper stimulieren, ohne eine Abschwächung des Effektes festzustellen (Abbildung 32). Längere Stimulationsversuche wurden aufgrund des starken Ausbleichens der Fluorophore nach dieser Zeit nicht unternommen. Wir konnten somit zeigen, dass auch die physiologische Stimulation des BCR mit Antigen zu einem genügend großen Calciumeinstrom führt, so dass dieser Effekt durch den FRET-Sensor TN-XXL sichtbar gemacht werden kann. Bisher wurden derartige Experimente mit wiederholter Stimulation nach unserem Kenntnisstand nicht durchgeführt. Wie bekannt ist, führt chronische BCR-Stimulation zu Anergie der B-Zellen. Allerdings muss dafür der Stimulus sehr hoch sein und über längere Zeit stattfinden, so dass eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration erreicht wird (112, 113). Wir können über den Zustand der von uns *in vitro* untersuchten Zellen keine Aussage machen, da wir nur Calciumeinstrom, also den Vermittler von potentieller Anergie, gemessen haben, nicht jedoch die Ausschüttung von Zytokinen oder die Transkription bestimmter Gene (welche beide im Falle der Anergie ausgeschaltet sind). Allerdings darf die Zugabe von anti-IgM-F(ab)₂-Antikörpern als eher schwacher Stimulus angesehen werden, bedenkt man, dass naive B-Zellen eingesetzt wurden.

Neben der Inanspruchnahme des BCR für die Antigenaufnahme und -präsentation über MHC-II an den TCR der T-Helferzellen ist auch die Kostimulation des CD40-Oberflächenrezeptors durch

CD40L, welches ebenfalls auf T-Zellen exprimiert wird, von essentieller Bedeutung. Diese Verbindung ist sowohl für die Initiation der Keimzentrumsreaktion, wenn B-Zellen im folliculären Mantel auf aktivierte T-Zellen treffen und das Signal zur initialen Proliferation erhalten, wichtig, als auch für die positive Selektion durch T_H-Zellen in der LZ. B-Zellen erhalten Überlebenssignale, welche sie weitere Proliferations- und Mutationsrunden zu passieren lassen (114–117). Die Stimulation von CD40 durch anti-CD40, womit wir die T-Zell-Hilfe *in vitro* simulieren konnten, bewirkt allein noch nicht die Mobilisation von Calcium. Allerdings verhalten sich die nachfolgenden BCR-abhängigen Signale anders, wenn zuvor anti-CD40 gegeben wurde. Viele Peaks fallen kleiner aus, oder sind transienter, d.h. bestehen über einen kürzeren Zeitraum als ohne CD40-Prästimulation. Dieses Verhalten macht Sinn im Hinblick auf unsere Theorie, dass Calciumsignale gewissermaßen „gesammelt“ werden müssen, um die terminale Differenzierung zu erreichen. Eine B-Zelle, welche bereits einige Runden SHM und Proliferation durchlaufen hat und daher für das Antigen affiner ist, wird von T-Zellen andere Signale erhalten, als weniger affine B-Zellen. Dies stimmt auch überein mit der Tatsache, dass wir zeigen konnten, dass in affinen B-Zellen mehr Calcium einströmt (höhere FRET-Signale) als in weniger affine (niedrigere FRET-Signale). Somit können wir vermuten, dass die CD40-CD40L Interaktion die BCR-Antwort reguliert, indem es die Dauer des Calciumeinstroms kontrolliert (siehe 4.3.2.)

Bevor wir die Transferexperimente im *in-vivo*-Setup begannen, wollten wir des Weiteren überprüfen, ob mögliche Signalevents von BCR-unabhängigen Calciumquellen stammen könnten, welche es erschweren würden, die Rolle des eigentlichen BCR-Signalweges im Keimzentrum von diesen zu unterscheiden. Daher untersuchten wir eine mögliche Anregung der B-Zellen mit Stimulatoren der Toll-like-Rezeptoren. Es ergab sich, dass die Stimulation von TLR4 einen bestimmten Einfluss auf den Calciumeinstrom in die Zellen haben kann, dieser allerdings ein so geringes FRET-Signal erzeugt, dass der Effekt in unserem System zur *in-vivo* Analyse der BCR-Signaltransduktion vernachlässigt werden kann. Nicht außer Acht zu lassen ist hingegen die Rolle der TLRs als synergistische Komponente der B-Zell-Aktivierung (siehe 4.3.3.).

4.1.2. Intravitalmikroskopie

Die sich anschließenden Intravitalexperimente konnten einen direkten Zusammenhang zwischen einem Anstieg des FRET-Signals und der Veränderung der Motilität herstellen. Wir konnten beobachten, wie Zellen abstoppen müssen, um stabile Interaktionen mit anderen Zellen einzugehen und dabei ihre Momentangeschwindigkeit verringern, während Calciumeinstrom stattfindet. Für T-Zellen hingegen wurde unter Zuhilfenahme eines Einzelfluorophor-basierten Calciumreportersystems gezeigt, dass diese auch bei aktivem Signaling motil bleiben und ihre Durchschnittsmomentangeschwindigkeit von 8,76µm/min beibehalten (32). Für nicht-stationäre B-Zellen sind geringere Durchschnittsmomentangeschwindigkeiten von 6,6µm/min veröffentlicht, ein großer Teil der GC-B-Zellen ist aber in der Tat stationär (d.h. besitzt Dislozierungsrate von unter 1µm/min) (118). Dies können wir anhand der vorliegenden Daten bestätigen (Abbildung 46). B-Zellen könnten somit in Bezug auf ihre Motilität als der eher statische Arm der Keimzentrumsreaktion, T-Zellen als der dynamischere angesehen werden.

Ein Grund, warum sich B-Zellen im Keimzentrum etwas langsamer bewegen, bzw. komplett stillstehen, können, wie unsere Daten zeigen, Kontakte mit anderen B-Zellen sowie mit FDCs sein. Die Kontakte sind dabei von unterschiedlicher Stabilität, führen aber im Schnitt zum Abbremsen der Momentangeschwindigkeiten. Wir konnten mittels intravitale Bildgebung sowohl kurzlebige als auch langanhaltende Kontakte von B-Zellen mit FDCs beobachten (Abbildung 42). Diese Kontakte wiederum haben einen Einfluss auf den Calciumspiegel der Zellen. Es kam sowohl nach B-Zell-zu-B-Zell-Kontakten zu einer Erhöhung des FRET-Signals als auch nach (transienten) Kontakten zu FDCs. Das Calciumsignal in der getrackten Zelle (Abbildung 43, Abbildung 44) erhöhte sich dabei stufenweise. Stationäre Zellen, die sich in Kontakt zu FDCs befanden, hatten aber nicht zwangsläufig erhöhte zytosolische Calciumwerte. Dieses Erkenntnis spricht dafür, dass der Kontakt mit den Stromazellen sowohl einen strukturellen Sinn hat (nämlich die B-Zelle festzuhalten) als auch einen funktionellen. Die von FDCs dargebotenen Immunkomplexe können von B-Zellen aufgenommen werden, oder stimulieren das Calciumsignal.

Antigenvermittelte Signale führen also in einem Teil der GC-B-Zellen zum Calciumeinstrom nach Stimulation des BCR, einem oft in Frage gestellten Mechanismus. In der Tat konnten wir mittels unseres YellowCaB-Reportersystems sowohl nach ratiometrischer Messung als auch nach Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluorophors eine kleine Population von YellowCaB-Zellen ausmachen, die höhere FRET-Werte (Abbildung 48) bzw. niedrigere eCFP-Fluoreszenzlebensdauern besitzt (Abbildung 50) als der Großteil der anderen Keimzentrums-B-Zellen. Um diese Subpopulation näher zu beschreiben, verglichen wir die B-Zellen in vier verschiedenen Kategorien. Zum einen verglichen wir hochaffine YellowCaB-Zellen mit niedrigaffinen. Zum anderen führten wir zeitabhängige Experimente durch. Außerdem legten wir eine räumliche Unterteilung in B-Zellen innerhalb und außerhalb des Keimzentrums fest. Des Weiteren verglichen wir naive und AG-spezifische Zellen. Diese Herangehensweise führte uns zu dem Schluss, dass der Calciumgehalt in der Zelle umso weiter steigt, je affiner die B-Zelle zum Antigen ist bzw. mit der Zeit durch SHM wird. Aus diesem Grund enthalten ältere GCs YellowCaB-Zellen mit höherer Calciumkonzentration, und AG-spezifische YellowCaB-Zellen zeigen höhere Durchschnitts-FRET-Werte als naive. Auch Zellen, die sich innerhalb des GC befinden haben höhere FRET-Werte als Zellen, die sich außerhalb befinden. Wie vor allem durch die FLIM-Experimente gezeigt werden konnte, nähern sich positiv selektionierte Keimzentrums-B-Zellen also immer weiter einem bestimmten Ca^{2+} -Sättigungslevel an, je länger die Reaktion fortschreitet. Wir konnten damit erstmals *in vivo* eine quantitative Analyse der B-zellulären Calciumkonzentration im Keimzentrum durchführen. Alle hier aufgeführten Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese eines allgemeingültigen Schwellenwertes der Calciumkonzentration, der über das Schicksal der B-Zellen entscheidet. Es ist davon auszugehen, dass der Anteil an B-Zellen mit einer hohen Calciumkonzentration anfänglich steigt, um dann, infolge eines Gleichgewichts aus der Emigration der Zellen aus dem GC und voranschreitender Differenzierung, weitestgehend konstant zu bleiben, bis die GC-Reaktion abklingt. Die absolute Bestimmung dieser Calciumkonzentration ist zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit bereits Gegenstand unserer Forschung (siehe 4.4 und 4.6.).

4.2. Grenzen des Systems

Die hier verwendeten Systeme sind wie alle Modellsysteme durch gewisse Limitationen anfällig für Fehler oder Messungenauigkeiten, die jedoch umgangen, vernachlässigt oder korrigiert werden können.

4.2.1. Limitationen des GECl TN-XXL

Ratiometrische Calciumsensoren haben im Allgemeinen den Nachteil, dass sie sich zweier Fluorophore bedienen, die in der Regel spektral stark überlappend sein müssen, um Elektronentransfer zwischen ihren fluoreszierenden Domänen stattfinden zu lassen. Dadurch kommt es bei der Detektion der Fluoreszenz zu kalkulierbaren Hindernissen: Die Fluoreszenzsignale müssen je nach bildgebendem System verschieden stark gewichtet werden, wie wir es mithilfe der Gleichungen 2 und 3 verwirklicht haben. In der Konfokalmikroskopie vergünstigt zusätzlich der Umstand, dass wir durch eine sehr definierte Wellenlänge von 405nm nur eCFP anregen können und die Breite der Detektoren so abriegeln können, dass in beiden aufgenommenen Kanälen nur das Referenzfluorophor gemessen wird, die Messungen und Auswertungen. Diese Vorgehensweise geht auf Kosten der Signalhelligkeit, da bei einem Beschneiden der detektierten Wellenlänge natürlicherweise Signal verloren geht. Für die Konfokalmikroskopie funktionierte letzteres System für uns gut. Bei der intravitalem Bildgebung gibt es einzig die Möglichkeit der Rückrechnung (vgl. Gleichung 2). Ein Vorteil des Vorhandenseins zweier Fluorophore ist allerdings, dass hier eine quantitative Analyse stattfinden kann, und dass die Beobachtung des Helligkeitsabfalls im Donor bei gleichzeitiger Helligkeitszunahme des Akzeptors eine falschpositive Reaktion quasi ausschließt.

Das Donorfluorophor eCFP und der Akzeptor Citrine sind nach Expression in den Zellen nicht sehr hell, und bei naiven B-Zellen geht das Signal teilweise im Hintergrundrauschen unter, weshalb hier bei der Bildbearbeitung besondere Sorgfalt an den Tag gelegt werden muss. Je weiter die Zellen ausdifferenziert sind, desto mehr TN-XXL exprimieren sie aufgrund ihres Größenwachstums (und ihrer gesteigerten Proteinproduktion), dementsprechend nimmt ihre Helligkeit in Verlaufe ihrer Entwicklung zu. Auch diese Helligkeitsunterschiede sind aufgrund der ratiometrischen Messung, welche immer nur das Verhältnis der Helligkeiten in Betracht zieht, von geringer Bedeutung; sie sind sogar von Vorteil, da sie bei der visuellen Unterscheidung der Zellen im und um das Keimzentrum helfen.

Eine weitere Limitation ist die unterschiedliche Expressionsrate des Sensors in YellowCaB-Donortieren. Sie liegt bei heterozygoten Tieren bei ca. 30% und bei homozygoten bei etwa 50% bis maximal 70% (Abbildung 27) aller CD19⁺ B-Zellen der Milz. Für die Intravitaexperimente wurden für antigenspezifische Donoren nur heterozygote Tiere eingesetzt. Dies erschwert, vor allem wenn B1-8lo:YellowCaB Tiere als Donor eingesetzt werden, z.T. das Auffinden von Keimzentren mit funktionellen TN-XXL⁺ B-Zellen, da dort weniger Zellen in die GCs einwandern als nach Transfer von B1-8hi:YellowCaB-Zellen. Weiterhin muss erwähnt werden, dass die Überexpression von GECl wie TN-XXL z.T. Nebenwirkungen für die Zellen bedeuten (z.B. verringerte Neuroplastizität in Nervenzellen, Cardiomegalie in Herzmuskelzellen), und endogene Kreuzreaktionen mit den

Reportern (vor allem CaM-basierte Sensoren) oder Aggregatbildung zu Missfaltung führen, sodass nicht alle Proteine die gleiche Funktionalität besitzen (85, 119–121).

Der GECI TN-XXL gehört eher zu den langsamen Calciumindikatoren. Unsere Gruppe ist die einzige, welche TN-XXL exklusiv in B-Zellen zur Expression gebracht hat, obwohl die Gruppe um Takahiro Adachi und Kollegen bereits ähnliche Experimente mit einem ubiquitär exprimierten GECI veröffentlichten konnte (95). Klassischerweise wurden GECI, wie z.B. CerTN-L15 für die Bildgebung im Zentralnervensystem von Modellorganismen verwendet (97, 122). Dort sind für das Aufzeichnen sehr kurzer Calciumpeaks kurze Reaktionszeiten essentiell. Für das Beobachten transienter und anhaltender Erhöhungen der Calciumkonzentration in Zellen sind sowohl die Reaktionszeit von TN-XXL als auch die Empfindlichkeit ($K_d = 453\text{nM}$) allerdings genügend (98). Reaktionsgeschwindigkeit und Affinität des GECI für Calcium sind jedoch auch abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums sowie der Temperatur. Für unsere Zellkulturexperimente wurde stets darauf geachtet, einen pH von 7,2 zu gewährleisten und für alle Experimente wurde die Umgebungstemperatur auf 37°C reguliert. Für diese Kennzahlen liegt die Affinität beim o.g. Wert; für geringere Temperaturen sinkt sie ($K_{d_{23^\circ\text{C};\text{pH}7,2}} = 1210\text{mM}$), genau wie für geringere pH-Werte ($K_{d_{23^\circ\text{C};\text{pH}6,5}} = 1030\text{mM}$). Die Dissoziationszeit von Calcium ist im Optimum kürzer als bei geringeren pH-Werten und Temperaturen (620ms bei 23°C und pH6,5 bis 132ms bei pH8,0 und 37°C). Der Sensor reagiert empfindlicher auf pH-Wert-Schwankungen als auf Temperaturschwankungen und die Abweichungen sind bei der Reaktionszeit größer als bei der Affinität (98).

Ein nicht unwesentlicher Faktor, der bei der Auswertung von Fluoreszenzexperimenten im Allgemeinen, und ratiometrischer FRET-Messungen im Besonderen, berücksichtigt werden muss, ist das Ausbleichen der Fluorophore durch Laserlicht-Exposition. Sowohl in den Zellkulturexperimenten als auch bei der Intravitalmikroskopie wurde versucht, diese Effekte zu minimieren, indem die Laserspannung so gering wie möglich gehalten wurde und so hoch wie nötig für eine ausreichende Detektionshelligkeit und –tiefe (beim Aufnehmen von z-Stapeln in Gewebe). Gleichzeitig wurde die Expositionszeit durch kurze Scanzeiten und diskontinuierliche Aufnahme (Bildgebung alle drei Sekunden in Zellkultur bzw. alle 60 Sekunden bei *in vivo*-Messungen) gering gehalten. Ein gewisses Ausbleichen ist dennoch nicht immer zu vermeiden. Erschwert wird die Tatsache durch den Umstand, dass manche Fluorophore fotostabiler sind als andere und somit unterschiedlich schnell ausbleichen. Es existiert die Möglichkeit, bei der Bildbearbeitung einen Algorithmus zu verwenden, der Bleicheffekte rückgängig macht (z.B. ImageJ Bleach Correction). Diese Methode sollte allerdings mit Vorsicht angewendet werden, da sie die ohnehin schon geringen Signalunterschiede zusätzlich künstlich beschneidet und so eventuell wertvolle Information verloren geht. Wir haben aufgrund der geringen Dynamik der Helligkeitsunterschiede der Fluorophore darauf verzichtet, die Werte mathematisch anzupassen und stattdessen die Anregung optimiert. Um langfristig diesen Nachteil zu überwinden, haben wir in unserer Gruppe auch aus diesem Grund *in vivo*-FLIM etabliert.

4.2.2. Limitationen durch das experimentelle Set-up

Nicht nur durch den GECI TN-XXL selbst sondern auch durch das experimentelle Set-up kann es zu technischen Beeinflussungen des Versuchsablaufs kommen. Die Zellkulturexperimente sind

durch das Einsetzen des Durchflusssystemes anfällig für Artefakte, welche durch das Pumpensystem zustande kommen. Da die Pumpe bei der spezifischen Stimulation ausgeschaltet werden musste, um eine genügend hohe Konzentration an Antikörper oder anderem Stimulanz im Medium zu erreichen, damit die Rezeptoren angesprochen werden konnten, zeigen die Zellkulturmessungen oftmals unspezifische, periodische Schwankungen der Signalintensität, welche darauf zurückzuführen sind, dass sich bei ausgeschalteter Pumpe zum einen die Temperatur im Medium verändert, zum anderen aber auch die Flüssigkeitssäule über den Zellen vergrößert. Dies hat zur Folge, dass das Rauschen stark zunimmt und schwache Signale darin zu verschwinden drohen. Wir haben die Größenordnung dieses Effektes getestet, in dem wir bei ausgeschalteter Pumpe mit PBS stimulierten. Es zeigte sich, dass der Effekt gegenüber Stimulation mit BCR-Agonisten bzw. Ionomycin vernachlässigt werden konnte (Abbildung 36). Um eine größere Chance zu haben, FRET beobachten zu können, wurden die Zellen außerdem in Ringerlösung mit einer erhöhten Calciumkonzentration (6mM) kultiviert. Dadurch fielen die Reaktionen der Zellen auf Stimulation höchstwahrscheinlich deutlicher aus, als dies z.B. im Medium RPMI (unter 2mM Ca^{2+} als physiologische Konzentration) der Fall gewesen wäre. Da der Ca^{2+} -Gradient zwischen Zellinnerem und Zelläußeren dann größer ist, besitzen B-Zellen in unserem *in vitro*-System ein erhöhtes Membranpotential. Dieses zu regulieren ist die Aufgabe von Kaliumkanälen sowie TRPM4 und 5, von welchen gezeigt werden konnte, dass sie durch Ionenaustausch den Calciumeinstrom hemmen können (123, 124)

Bei der Präparation der Mäuse für die Intravitalmikroskopie kann es ebenfalls zu Fehlerquellen kommen. Hier ist beim Freilegen des poplitealen Lymphknotens vor allem im Bereich der kleinen Gefäße und Lymphgefäße äußerste Vorsicht geboten. Es wurde stets versucht, so wenig Gewebe wie möglich zu zerstören oder zu schneiden; im Idealfall genügte es, die Fettschichten über dem Lymphknoten vorsichtig zu durchtrennen und sie dann nach und nach von der Kapsel des Lymphknotens abzulösen. Da Fettzellen eine enorme Streuung des Lichts verursachen, musste hier besonders darauf geachtet werden, dass diese nicht die Bildgebung beeinträchtigten. Weiterhin kann es, bedingt durch die Narkose der Tiere, zu blutdruckbedingten Schwankungen des Blutflusses kommen, welche die Zellbewegungen beeinflussen. Die Narkosetiefe über den gesamten Mikroskopiezeitraum stabil zu halten ist kritisch für die Geschwindigkeit und Lebendigkeit der Zellen. Die Tiere wurden daher alle 15min auf ihre Reflexe der Vordergliedmaßen überprüft und bei Bedarf mit etwa einem Drittel der Initialdosis nachdosiert.

4.2.3. Modellbedingungen

Bei dem hier verwendeten System handelt es sich, wie erwähnt, um ein Tiermodell zur Untersuchung der Affinitätsreifung von B-Zellen im GC. Es werden dafür Gegebenheiten geschaffen, die in der Natur so nicht vorkommen würden. Zum einen ist bereits das Immunisieren mit einem Modellantigen eine künstlich erzeugte Situation; andere Antigene könnten zu anderen GC-Strukturen oder Architekturen führen (125). Wir haben uns allerdings für das System mit NP-CGG entschieden, weil es ein etabliertes Modell der immunologischen Grundlagenforschung darstellt, gut untersucht ist und die entsprechenden transgenen Mausstämme wie B1-8 zur Verfügung stehen.

Weiterhin ist die GC-Reaktion durch die erzwungene Antigen-spezifität der transferierten Zellen beschleunigt, da die Zellen weniger stark mutieren müssen um eine höhere Affinität zu erreichen. Dieser Umstand wird durch unsere Experimente verdeutlicht: Wie Abbildung 49 zeigt, erreichen höher affine, antigenspezifische YellowCaB-Zellen im selben Beobachtungszeitraum schneller einen höheren Calciumspiegel, ausgedrückt durch die größere Steigung des normierten FRET-Signals von Tag 10 p.i bis Tag 21 p.i. Ebenso ist weiterhin nicht sichergestellt, wie viele körpereigene Zellen des Empfängertieres an der Immunreaktion teilnehmen und so eventuell die transferierten Zellen übervorteilen. Nicht auszuschließen ist auch, dass die Faltung des Proteins TN-XXL im Zytoplasma der B-Zellen einen negativen Effekt z.B. auf deren Stoffwechsel und ihr Überleben hat. Wir haben zumindest die Zellzahlen von Milz-YellowCaB-Zellen überprüft und haben gefunden, dass diese im Vergleich zu Splenozyten von Wildtyp-Tieren nicht verringert sind (Daten nicht gezeigt). Wissenschaftler, die einen ähnlichen Sensor in B-Zellen zur Expression brachten, kamen zu demselben Ergebnis (95).

4.3. BCR-Signaling im Keimzentrum

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass B-Zellen aufgrund ihrer Rezeptoraffinität zum Antigen im GC unterschiedlich starkes BCR-Signaling aufweisen und dass eine große Anzahl von Signalingereignissen beispielsweise durch hohe Aktivität der Phosphatase Shp-1 abgeschaltet oder kurzgeschlossen wird (90). Dennoch gibt es B-Zellen, die letztlich, als direkte Folge der Aktivierung ihres BCR, proliferieren und ausdifferenzieren, so dass Signalereignisse innerhalb der GC-B-Zellpopulationen zumindest heterogen sein müssen. Mueller und Kollegen berichteten über einen kleinen Anteil von B-Zellen, die durch eine Population größerer Helligkeit in Nur (*nuclear receptor*, Kernrezeptor) 77-GFP-Durchflusszytometriedarstellungen sichtbar gemacht wurden, die zeigen, dass tatsächlich B-Zellen mit hoher Signalaktivität im GC vorhanden sind. Bei Nur77 handelt es sich um ein direktes Ziel-Molekül, das dem BCR-Signaling nachgeschaltet ist (*downstream*). Somit ist die Expression dieses Proteins ein direkter Nachweis von BCR-Signaling im GC (89). Eine weitere funktionelle Analyse der Signalereignisse in GCs wurde durch die Tatsache erschwert, dass diese seltenen und wenigen, zum Teil transienten Vorkommnisse durch die Massenanalyse von Zellen maskiert wurde. Mit unserem YellowCaB-Calcium-Reportersystem konnten wir nicht nur die BCR-Signalübertragung *in vitro* messen, sondern auch diese Zellen und ihr Verhalten für Zeiträume von einer Stunde oder mehr *in vivo* verfolgen.

4.3.1. Dissoziationsaktivierungsmodell unterstützt Ergebnisse

Wir haben eingangs die verschiedenen Modelle der BCR-abhängigen B-Zell-Aktivierung erklärt (siehe 1.3.). Das DAM hilft zu verstehen, wie es sein kann, dass eine B-Zelle mehr als einmal stimuliert werden kann und somit Calciumionen im Zellinneren ansammelt. Gehen wir davon aus, dass BCRs als Oligomere in inselförmigen Membrankompartimenten in der Plasmamembran der B-Zellen vorliegen, ist es vorstellbar, dass unterschiedliche BCRs nacheinander durch Antigen stimuliert werden können, und dass diese Stimulation nicht zur Internalisierung der Rezeptoren führt und sie für weitere Stimulationen unzugänglich macht, sondern, im Gegenteil, in einer Art Kettenreaktion, die reaktiven Domänen der Oligomere vereinzelt und so mehr und mehr Rezeptoren erst für Stimulation zugänglich macht. Unterschiedliche FRET-Signalstärken sowie

wiederholte Aktivierung von BCRs könnten so erklärt werden. Die wiederholte BCR-Aktivierung ist außerdem Grundvoraussetzung für unsere Hypothese, dass B-Zellen mehrere Signale sammeln müssen, um einen bestimmten Ca^{2+} -Schwellenwert zur terminalen Differenzierung zu erreichen.

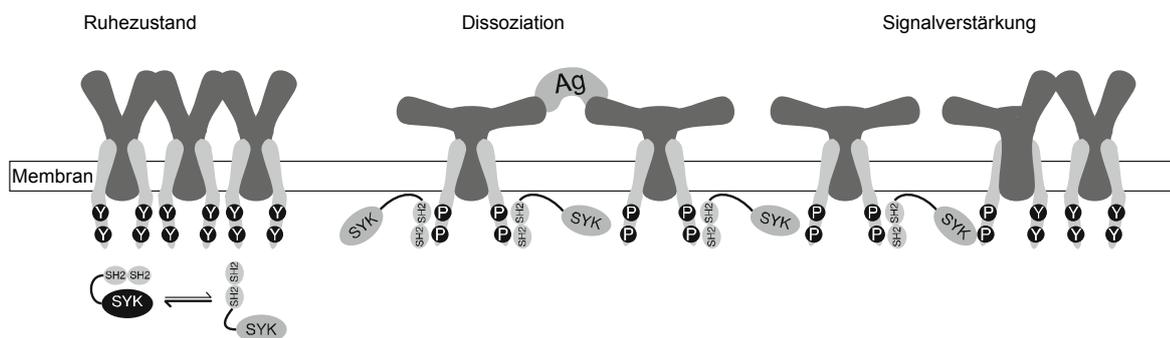


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Dissoziationsaktivierungsmodells. Im ruhenden Zustand (links), bilden BCRs Oligomere, die durch die Bindung von multimeren Antigenen (Mitte) in eine offene Konformation gelangen. Diese Anordnung veranlasst weitere Rezeptoren in der Nähe dazu, ihre Struktur ebenfalls zu öffnen (rechts) und das Signal verstärkt sich so (71), adaptiert.

4.3.2. CD40-Ligation moduliert die BCR-abhängige Calciumantwort

Die Hilfe der T_H-Zellen für B-Zellen ist abhängig von der Ligation des CD40-Rezeptors auf B-Zellen mit dem CD40-Liganden der T-Zellen. Erst diese Verbindung sorgt dafür, dass Signale übertragen werden, die für die Ausbildung stabiler T-B-Interaktionen verantwortlich sind und damit die Keimzentrumsreaktion anschieben, aufrechterhalten und schließlich, durch die T-Zell-seitige Ausschüttung bestimmter Zytokine zur positiven Selektion und zum Klassenwechsel, beenden (85, 119, 120). Wie gut die B-Zellen dabei die T-Zell-Hilfe erfahren, hängt dabei auch von der Affinität des BCRs ab und, damit zusammenhängend, mit der Menge des aufgenommenen Antigens. Wir konnten sehen, dass in B1-8hi:YellowCaB-Keimzentren die TN-XXL⁺-Zellen dichter gepackt vorliegen als in B1-8lo:YellowCaB-Keimzentren (Vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40). Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass B-Zellen, die mehr Antigen aufgenommen haben, bessere T-B-Kontakte ausbilden und zu erhöhtem Signaling in T-Zellen führen (32). Dieser Umstand verdeutlicht bereits die enorme Bedeutung, die T-Zellen für die Entstehung langanhaltender Immunität gegen Pathogene haben. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wollen wir diskutieren, ob T-B-Kontakte auch Signaling in B-Zellen erzeugen bzw. modulieren.

T-follikuläre Helferzellen

Ohne die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen wären B-Zellen nicht in der Lage, die adaptive Immunantwort zu vollenden und den hochspezifischen und –affinen Antikörper-sezernierenden Zellpool zu bilden. Verschiedene Unterpopulationen wurden unter den CD4⁺ T-Zellen identifiziert: Neben Th1 und Th2-Zellen wurde 2009 die Gruppe der T_{fh}-Zellen identifiziert, welche aufgrund besonderer Merkmale ihres Transkriptom, vor allem durch die Expression von B-Zell-Lymphomprotein (BCL) 6 von den erstgenannten zu unterscheiden sind (126–128). Es existieren weiterhin regulatorische T-Zellen (Tregs) und Th17-Zellen, auf die hier nicht eingegangen werden soll. Klassisch wurden Th1 und Th2-Zellen aufgrund ihres Zytokinprofils unterschieden. Th1-Zellen sekretieren vor allem Interferon gamma (IFN- γ), Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-6. Alle diese befähigen die B-Zellen zum Wechsel in eine bestimmte Klasse. T_{fh}-Zellen sind ein Sonderfall: Neben der Interaktion mit B-

Zellen über CD40-CD40L schütten T_H-Zellen sowohl IFN- γ als auch, neben den genannten Interleukinen, IL-21 aus – geringere Mengen IFN- γ sorgen in Mäusen für die Entwicklung von IgG2a-Antikörpern, IL-4-6 zur Ausbildung von IgG1. IL-21 spielt eine zentrale Rolle beim Überleben der B-Zellen und ihrer Proliferation (129). Die T-Helferzellen des Keimzentrums konnten demnach weder dem Th1- noch dem Th2-Phänotyp zugeordnet werden, sondern bilden eine eigene Klasse (130, 131).

T_H-Vorläufer wandern aufgrund ihrer CXCR5 Expression in Richtung CXCL13 und ordnen sich an B-Zell-reichen Regionen in den SLO an, wo sie das erste Mal mit B-Zellen in Kontakt treten, die ihrerseits Antigen erfahren haben. Der Mastertranskriptionsfaktor BCL-6, der unter anderem als Repressor der Transkription migratorischer Moleküle die Bildung von GC-Strukturen sowie die korrekte Anordnung der T-Zellen an der T-B-Grenze sicherstellt, wird vermehrt exprimiert (132). Mehrere Signale sind nun notwendig, um das GC vollständig zu etablieren: Zum einen müssen die T-Zellen über ihren TCR das ihnen von B-Zellen als MHCII:Peptid-Komplex dargebotene Antigen erkennen können, zum anderen muss bereits hier die Ligation von CD40 und CD40L stattfinden, um die Interaktion zu festigen. Dieser Umstand ist seit längerem bekannt und es konnte bereits vor Jahrzehnten gezeigt werden, dass im System vorhandene T-Zellen, welche für ein (viel größeres) immunogenes *Carrier*-Protein wie CGG spezifisch sind, zur positiven Selektion von B-Zellen, welche einen gegen ein Hapten wie NP gerichteten BCR besitzen, beitragen (26). Die B-Zelle nimmt nach BCR-Hapten-Interaktion den gesamten Hapten-Carrier-Komplex auf um ihn zu Hapten-Carrier-Peptiden zu degradieren. Th-Zellen, welche einen für ein Epitop auf dem Carrierprotein spezifischen TCR besitzen, werden durch Kontakt mit dem Antigen aktiviert und können so B-Zellen mit Hapten-Carrier-Peptid-MHCII Hilfe leisten. Diese Strategie ist sinnvoll, um T-abhängige Immunantworten gegen kleine Moleküle wie NP zu erzeugen, was anderweitig nicht möglich wäre.

Vom ersten Treffen mit der T_H-Vorläuferzelle bis zum Plasmablasten durchläuft die B-Zelle unterschiedlichste Aktivierungsstadien, welche unserer Hypothese nach unter anderem durch eine sensible Regulation des zyttoplasmatischen Calciumspiegels charakterisiert sind. Da, wie wir zeigen konnten, CD40 allein nicht in der Lage ist, Calciumeinstrom zu triggern, wird die Rolle der Koligation eher in einer Modulation des Calciumeinstroms liegen. Je nachdem, in welchem Zustand der Ausdifferenzierung sich die Zelle befindet bzw. wie viele Runden der Keimzentrumsreaktion sie bereits zurückgelegt hat, werden mehr oder weniger Ionen einströmen dürfen. Es ist denkbar, dass eine ausdifferenziertere Zelle, welche durch T-Zellhilfe einerseits schon Überlebenssignale in Form von Zytokinen und dem damit einhergehenden veränderten Transkriptionsprofil, erhalten hat, nun weniger Calcium aufnehmen darf um eine Überaktivierung oder gar Intoxikation zu verhindern. Auf diese Weise ließe sich auch erklären, wie der relativ kleine Zellpool mit erhöhtem BCR-Signaling kontrolliert wird.

CD40 als signalübertragender Rezeptor

In der Tat konnten Nguyen und Kollegen bereits 2011 zeigen, dass CD40 sehr wohl die durch BCR-Ligation hervorgerufene Signalkaskade beeinflusst und die Art der Modulation sich nach dem Reifestadium der B-Zellen richtet. CD40-Stimulation ist dabei laut dieser Quelle in der Lage, unreife

B-Zellen bei Langzeit-Stimulation mit Antigen vor der Apoptose zu bewahren, indem es den nachhaltigen Calciumeinstrom durch Unterdrückung der Wiederherstellung von PLC- γ 2 und IP₃ verhindert. Auf reife B-Zellen hingegen hat CD40 diesen Effekt nicht. CD40 ist also vor allem dazu da, den nachhaltigen und verlängerten Calciumeinstrom in unreife Zellen zu limitieren. Der vorgeschlagene Wirkmechanismus ist die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies, welche wiederum Komplexbildung, Membrantranslokation und Phosphorylierung von Effektorproteinen begünstigen (133, 134). In unseren Zellkulturexperimenten haben wir einen gewissen regulierenden Effekt von CD40-Stimulation beobachten können; da wir die Gesamtzahl der vorhandenen B-Zellen aus der Milz der YellowCaB Tiere isoliert haben, wird der Reifegrad der B-Zellen und auch die Stärke der BCRs im Zellpool vermutlich heterogen sein. Der transiente, kurze Calciumpeak wird daher von einer unreiferen Zelle stammen als jene, welche eine nachhaltige Erhöhung des FRET-Signals zeigt. Ob dieses Verhalten auch bezüglich der Antigen-spezifität beobachtbar wäre, wurde nicht gezeigt, wird aber aufgrund der Quellenlage vermutet. Zur Klärung könnten Zellkulturexperimente mit B1-8lo:YellowCaB-Zellen und B1-8hi:YellowCaB-Zellen mit AG-Stimulation durchgeführt werden (siehe 4.6.) und die Reaktionen hinsichtlich des FRET-Signals verglichen werden.

CD40 kann damit eine Doppelfunktion zugeschrieben werden. Seine Ligation mit CD40L auf T-Zellen⁶ bewirkt auf der einen Seite, dass B-Zellen von T-Zellen ausgeschüttete Zytokine empfangen können, die das Überleben sicherstellen (135). Auf der anderen Seite hat es als Signalüberträger eine Regulation des Calciumhaushaltes nach BCR-Aktivierung zur Folge. Wenn nun beide Faktoren dafür sorgen, das Gleichgewicht zwischen Zellsterben und Ausdifferenzierung im Keimzentrum zu erhalten, wie werden CD40-Signaling und BCR-Signaling orchestriert?

Neuste Erkenntnisse können das Zusammenspiel T-Zell- und AG-vermittelter Signaltransduktion nun noch genauer beschreiben. In Rahmen dieser Arbeit wurden nur naive, frisch aus der Milz isolierte B-Zellen auf eine Reaktion nach Quervernetzung der CD40-Oberflächenrezeptoren untersucht. Bei der Beobachtung der Downstream-Reaktionen ist der Differenzierungszustand jedoch ausschlaggebend, da naive und GC-B-Zellen sich unterschiedlich verhalten (92). Naive B-Zellen können sowohl nach alleinigen CD40- als auch BCR-Signalen den PI3K- oder NF- κ B-vermittelten Stoffwechselweg aktivieren. GC B-Zellen benötigen jedoch zwingend die Vermittlung von Signalen der CD40-CD40L abhängigen T-Zell-Hilfe *und* der Antigen-abhängigen BCR-Aktivierung zusammen. Die Weiterleitung der BCR-Signale erfolgt in diesem Fall nur über die Wechselwirkung von PI3K mit der Kinase AKT („AK strain transforming“), nicht aber über NF- κ B. Als Folge dieser zwei Signale wird c-Myc hochreguliert und damit die Affinitätsreifung induziert bzw. aufrechterhalten. C-Myc spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und Stoffwechsels der B-Zellen. Es ist dabei egal, ob sich die B-Zellen in der LZ oder in der DZ befinden.

⁶ Auch T-Zellen erhalten lösliche Proteine als Signale von B-Zellen, z.B. ICOSL (*inducible costimulator ligand*, induzierbarer kostimulatorischer Ligand) wenn CD40L gebunden wird. Dies wiederum veranlasst die T-Zellen, mehr CD40L zu exprimieren. Hierbei handelt es sich also um einen Feed-Forward-Loop als direkte Folge der T-B-Interaktion (171).

Für die Akkumulation der B-Zellen in der DZ ist das Gen FOXO1 mitverantwortlich (136). FOXO1 kann durch die phosphorylierte (aktivierte) Version von AKT (p-AKT) inaktiviert werden. Die Entstehung von p-AKT ist eine direkte Folge des BCR-Signalings und muss, um das Zurückwandern der B-Zellen in die LZ zu gewährleisten, reguliert werden. In der LZ wiederum wird CD40-vermittelt der Eintritt der Zellen in die DZ induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, das aktives BCR-Signaling (Syk-vermittelt) in GC-B-Zellen zur Inaktivierung von FOXO1 führt, was DZ-B-Zellen somit veranlasst, wieder in die LZ einzutreten und dort von T-Zellen CD40-vermittelte Signale zur positiven Selektion zu empfangen. CD40 wiederum stimuliert über NF- κ B die Expression von c-Myc und anderer Proteine (S6, mTOR) als Vermittler des Eintritts in den Zellzyklus und führt damit zur Teilung in der DZ, die aber eben nur stattfinden kann, wenn vorher ein BCR-Signal erfolgt ist. Dieses Modell könnte somit erklären, wie die Rezirkulation der B-Zellen von Zone zu Zone in Gang gehalten wird. Das Zusammenspiel und die Stärke von BCR- und CD40-Signalen scheinen außerdem auch die Emigration der B-Zellen aus dem GC zu triggern, sowie die Entwicklung zu Plasmazellen zu favorisieren (siehe 4.4.1.).

In dieser Arbeit wurden Downstream-Moleküle der BCR-Aktivierung wie AKT außer Acht gelassen, stattdessen konzentrierten wir uns auf die reine Calciumantwort der B-Zellen. Calcium ist jedoch als Second Messenger nur der Vermittler der Signale, diese wiederum können aber ganz unterschiedliche Empfänger haben. Wir können mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigen, dass die Calciumkonzentration in den Zellen mit dem Grad der Ausdifferenzierung steigt. Zellkulturexperimente bestätigten, dass Signale angeborener Rezeptoren (TLR) sowie T-Zellhilfe und BCR-Signaltransduktion engmaschig vernetzt sind, um zu einer effektiven Auswahl der höchst affinen BCRs und damit zu einer verlässlichen Antikörperproduktion zu führen. Durch dieses System werden auch die Risiken der Autoimmunität minimiert. Weiterführende Experimente zur Untersuchung der nachgeschalteten Proteinexpression wären beispielsweise die Zellisolation aus immunisierten Lymphknoten und durchflusszytometrische Untersuchung oder Western Blots. Um Zellen mit hohem und niedrigem BCR-Signaling diesbezüglich zu vergleichen, müssten die B-Zellen mit hohem FRET dazu ex-vivo unterscheidbar gemacht werden, was zurzeit noch eine Hürde darstellt.

4.3.3. TLR und BCR werden synergistisch aktiviert

Im Zusammenhang mit T-unabhängigen Immunreaktionen wurde beschrieben, dass die Bindung mikrobieller molekularer Strukturen an TLRs ebenfalls in der Lage ist, SHM und CSR auszulösen. So wird durch Mutation der variablen und konstanten Regionen der schweren Ketten zu einer funktionellen Verbreiterung des Antikörperspektrums beigetragen, auch wenn keine T-Zell-gesteuerte Aktivierung des mutierenden Enzyms AID (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase), welches sowohl SHM als auch CSR steuert, erfolgt (137, 138). Signalwege, welche AID aktivieren, involvieren den kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B Signalweg. NF- κ B bindet an Promotoren bzw. *Enhancer*-Regionen auf den für die Transkription von AID verantwortlichen DNA-Abschnitten (139, 140). Weiterhin kann durch die Kostimulation von BCR und TLR7 (erkennt Einzelstrang-Ribonukleinsäure) die sekundäre Immunantwort durch Gedächtnis-B-Zellen deutlich erhöht werden (141).

Pone und Kollegen fanden heraus, dass TLR4 und TLR9 zusammen mit einer vorausgehenden Stimulation des BCR synergistisch zu Induktion des Klassenwechsels von IgM nach IgG führen (142). Wir konnten ebenfalls beobachten, dass TLR Stimulation allein nicht oder nur zu einem geringen FRET-Signalanstieg führt, sehr wohl aber ein – wenn auch geringer – Signalanstieg zu beobachten ist, wenn wir zuvor mit anti-IgM-F(ab)₂ den BCR stimulierten (Abbildung 36 und Abbildung 37). Für CpG konnte auch von anderen Gruppen nicht nachgewiesen werden, dass es als alleiniger Stimulus CSR induziert (138, 143). Unsere Ergebnisse bestätigen dies entsprechend, da auch wir keine Calciummobilisation nach CpG-Gabe in die Zellkultur detektieren konnten.

Die alleinige Bindung an TLRs ist demnach ungenügend für eine erfolgreiche T-unabhängige Immunantwort. Wird allerdings auch der BCR stimuliert, sorgt CpG sogar für einen Boost des Signals und der Antikörperproduktion (weshalb es auch als gängiges Adjuvanz eingesetzt wird) (144). Wir konnten nach CpG-Gabe ebenfalls ein sehr deutliches, allerdings verzögert auftretendes Signal durch IgM-F(ab)₂ detektieren. Neueste Forschungsergebnisse erklären nun, dass die Stimulation von TLR9 sehr wohl die Immunantwort auf Proteinantigene verstärkt, in dem es die Menge des ausgeschütteten Antikörpers reguliert, die Affinitätsreifung aber nach Gabe von CpG (*in vitro*, im Mausmodell sowie in klinischen Vorstudien) stillsteht (145). Weiterhin wurde auch ein Zusammenhang von synergistischer TLR9- CD40- und TACI (Transmembranaktivator und Calcium-modulierender Cyclophilin-Ligand-Interaktor)-Stimulation zur effektiven Aktivierung von B-Zellen hergestellt (146). Dieser Umstand könnte ein Hinweis darauf sein, dass TLR-Signaling als Teilsignal involviert ist in die Feinregulation der Keimzentrumsreaktion und durch Formung der Calciumantwort, wie wir sie *in vitro* beobachten konnten, zur Entscheidung über das Zellschicksal (mit entsprechender Beendigung der Affinitätsreifung) beitragen könnte.

Es ist bekannt, dass TLR-Signaling nicht nur in der angeborenen sondern auch in der erworbenen Immunantwort eine Rolle spielt und dass TLR-Signaling neben Antigen-Stimulation und T-Zell-Hilfe ein wichtiges drittes Signal zur Ausbildung hochspezifischer und affiner Antikörpersezernierender Zellen ist. Vor allem humane, naive B-Zellen können ohne zusätzliche TLR-Stimulation nicht aktiviert werden (143). Für diese B-Zellen ist bekannt, dass sie über keine konstitutive Expression von TLRs verfügen, sondern diese erst nach Kontakt mit Antigen heraufregulieren. Im Gegensatz zum Mausmodell ist damit die B-Zell-Aktivierung beim Menschen weitaus enghmaschiger kontrolliert, da nur Antigen-erfahrene B-Zellen einen zusätzlichen Stimulus erhalten können. Ruprecht und Kollegen zeigten außerdem, dass TLR-Aktivierung nachhaltig erfolgen muss, BCR-Stimulierung aber transient sein kann (143). Wir haben die Kombination aus BCR- und TLR-Stimulation getestet, jedoch keine zusätzlich Gabe von CD40L bzw. anti-CD40 vorgenommen. Allerdings ist im Mausmodell eine zweifache Stimulation ausreichend und belegt (s.o.).

Weiterhin sei erwähnt, dass humane Gedächtnis-B-Zellen, um über einen langen Zeitraum in Abwesenheit von Antigen erneut proliferieren zu können, polyklonale Signale, wie die aus TLR-Stimulation benötigen (147). Dieser Umstand ist ein zusätzliches Beispiel dafür, welche Komplexität der Aktivierung der B-Zellen im Dreieck aus BCR-Ligation, T-Zellhilfe und TLR-Bindung zugrunde liegt (1). Unsere Ergebnisse verdeutlichen, wie die Responsivität der B-Zellen

durch die TLR-Aktivierung moduliert werden kann. Ähnlich wie CD40 vermindert sie dabei die Reaktion auf BCR-Ligation. Die Stimulation des TLR kann demnach als ein wichtiges zusätzliches Signal zur Regulation der Keimzentrumsreaktion angesehen werden.

4.3.4. B-Zellen präsentieren sich gegenseitig Antigen im Keimzentrum

In unseren intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnten wir zum ersten Mal *in vivo* zeigen, dass B-Zellen im Keimzentrum miteinander Wechselwirkungen eingehen und sich gegenseitig zum Calcium-Signaling stimulieren. Wir möchten die Hypothese aufstellen, dass antigenerfahrene B-Zellen auch in trans auf der Zelloberfläche dargebotene Antigene bzw. Antigen-Antikörperkomplexe, also Immunkomplexe, erkennen können. Über den Sinn dieses Mechanismus lässt sich bislang nur spekulieren. Es ist allerdings anzunehmen, dass auf diese Art und Weise die B-Zellen dazu angeregt werden, die GC-Reaktion durch Vergrößerung des reaktiven Zellpools voranzutreiben. Die vermehrte Konkurrenz um T-Zellhilfe würde demzufolge die Stringenz der Reaktion erhöhen (148).

Antikörper-unabhängige Antigenpräsentation an B-Zellen

Es ist bekannt, dass Antigen, welches zuvor mit den Komplementfaktoren C3/C4 markiert wurde, durch CR1 (CD35) und CR2 (CD21) auf B-Zellen gebunden werden kann, während es gleichzeitig den BCR aktiviert (149). Mäuse, welche keine CRs besitzen, bilden defekte Keimzentren aus und haben geringere Antikörpertiter als ihre Wildtyp-Verwandten, da ihr Pool langlebiger Plasmazellen kleiner ist (150–152). Ein Zusammenhang zwischen der Komplement-abhängigen Aktivierung des BCR in cis und einer normal funktionierenden GC-Reaktion ist also nicht auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass Komplementaktivierung das Signaling durch den BCR via CD19-CD21-Wechselwirkung (Abbildung 54) verstärkt (149).

Auch auf den FDCs befinden sich Komplementrezeptoren (welche wir als Target zum *in vivo*-Anfärben der LZ in Keimzentren in der Intravitalmikroskopie nutzten), und auch über diese kann Antigen gebunden werden. Wie eingangs erwähnt (siehe 1.1.3), wurden die FDCs mit einer unterstützenden Funktion für die GC-Reaktion in Verbindung gebracht, diese Unterstützung wurde aber lange nicht genauer beschrieben. Die Shlomchik-Gruppe demonstrierte schließlich, dass auch Mäuse, die kein Immunglobulin sekretieren können (allerdings membrangebundenes IgM besitzen), also auch keine Immunkomplexe auf FDCs speichern können, ebenfalls intakte GCs ausbilden (149). Obwohl also den Komplementrezeptoren auf den Stromal-Zellen eine wichtige Funktion zugeschrieben wird, scheint hier noch ein anderer Mechanismus als die Bindung von Immunkomplexen eine Rolle zu spielen, der Komplement-markiertes Antigen Antikörper-unabhängig erkennt. Fast alle Immunzellen produzieren die Komplement-Liganden, welche die Kolligation zwischen BCR und CRs bewerkstelligen könnten (153). Da alle B-Zellen Komplementrezeptoren besitzen, ist es nicht auszuschließen, dass eine B-Zelle über den BCR gebundenes und C3b-markiertes AG mit einer zweiten B-Zelle in Wechselwirkung tritt, indem sie deren CR vernetzt.

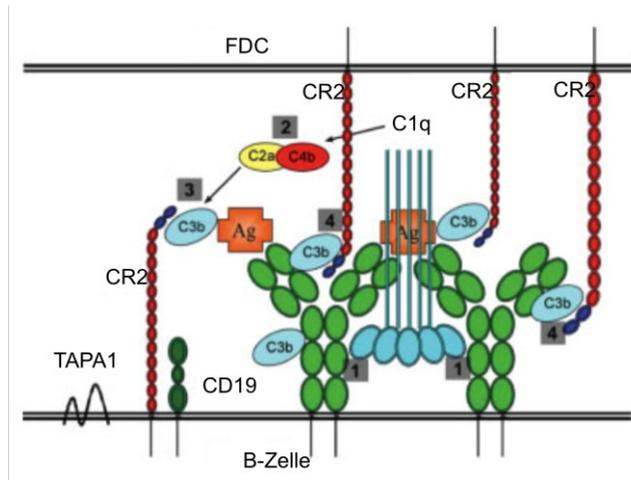


Abbildung 54: Möglicher Kontakt zwischen FDC und B-Zelle über C3-markiertes Antigen sowie BCR-CR-Quervernetzung in cis. BCRs, die durch Antigen quervernetzt wurden, können C1q auf der Zelloberfläche binden. Dies aktiviert die Komplementkaskade mit Generierung von C4b und C2a. Diese bilden zusammen den C3-Komplex, welcher C3b generiert, welches sowohl AG-seitig als auch rezeptorseitig an den AG-BCR-Immunkomplex binden kann. Dieser Mechanismus könnte die Quervernetzung des BCRs mit Komplementrezeptoren (CR2) sowohl auf FDCs, auf derselben Zelloberfläche sowie, wie wir vorschlagen möchten, auf anderen B-Zellen bewirken (149), adaptiert.

Antikörper-abhängige Antigenpräsentation an B-Zellen

Vor Initiation der GC-Reaktion, also wenn die B-Zelle das erste Mal in Kontakt mit Antigen tritt, welches ihr in der Form eines C3b-markierten Immunkomplexes (mit IgM) durch z.B. FDCs, dendritische Zellen oder Makrophagen dargeboten wird, ist bereits BCR-Signaling notwendig, damit das sogenannte Spreizen (*Spreading*, durch Umorganisation des Zytoskeletts maximiert die B-Zelle dabei die Kontaktfläche zum Antigen) und die korrekte Ausbildung der immunologischen Synapse stattfinden kann (34). Die immunologische Synapse zwischen B-Zelle und Zielzelle gliedert sich in zentrale, supramolekulare Aktivierungscluster (*central supramolecular activation cluster*, cSMAC) und periphere SMACs, welche durch mit der Zielzelle wechselwirkende Integrine gekennzeichnet sind (154, 155). Abbildung 55 zeigt schematisch die Ligationspartner in der cSMAC-Immunsynapse. Die Bindung von Zielzelle und B-Zelle wird hier durch Komplement-markierte Immunkomplexe bewerkstelligt. Dabei hat die Zielzelle einerseits mit FcR und CR Kontakt zum AG-Immunkomplex und die B-Zelle andererseits über das gebundene Antigen. Naive B-Zellen transportieren auf diesem Weg Antigen-IgM-Immunkomplexe in die Follikel der SLO. Zusammen mit der Tatsache, dass durch Komplement-markiertes Antigen sowohl zwischen BCR und cis-CR Wechselwirkungen bestehen als auch zwischen BCR und FDC-CR (Abbildung 54), ist die Zusammensetzung der B-Zell-Immunsynapse eine starke Unterstützung für die Hypothese, dass B-Zellen auch in trans mit anderen B-Zellen über diesen Mechanismus Interaktionen eingehen. Wir konnten mehrmals im lebenden Tier beobachten, wie B-Zellen sich gegenseitig zum Calciumeinstrom anregen und konnten dies mit unterschiedlichen Methoden (FLIM, ratiometrische Messung) bestätigen.

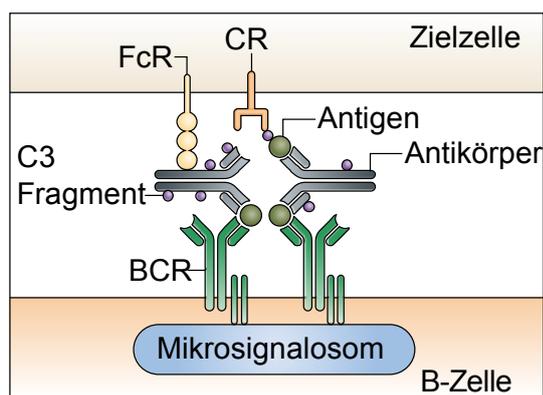


Abbildung 55: Antikörper-abhängige AG-Präsentation zwischen B-Zelle und präsentierender Zielzelle. Der zentrale Aktivierungscluster cSMAC bildet sich aus, nachdem die B-Zelle nach Spreading Kontakt zum Antigen herstellen konnte. Antigene werden als Komplement-markierte Immunkomplexe auf FcR und CR dargeboten und vom BCR der B-Zellen erkannt. Das nachgeschaltete Mikrosignalosom beinhaltet die Aktivierung der zu Calciumeinstrom führenden Signalkaskade (siehe 1.2.1.) (34), adaptiert.

Vor ein paar Jahren konnte gezeigt werden, dass auch der Transport von Antigen zu den Follikeln der SLO durch B-Zellen stattfindet. Die B-Zellen erhalten das Antigen in Form von Immunkomplexen und binden es über ihre CRs (19, 156). Somit erscheint mehr als wahrscheinlich, dass wir in unseren Experimenten eine neue Art der Signaltransduktion zwischen B-Zellen und damit eine weitere treibende Kraft der GC-Reaktion beobachten konnten.

4.4. Hypothese des Calcium-Schwellenwertes

Die Experimente, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass die Feinregulation der Zelldifferenzierung im Keimzentrum von einem bestimmten Calciumspiegel abhängig ist. Zunächst konnten wir dafür bestätigen, dass B-Zellen in der Lage sind, innerhalb kurzer Zeit mehrmals hintereinander Signale durch BCR-Stimulation zu verarbeiten. Diese Fähigkeit muss gegeben sein, um es den Zellen zu ermöglichen, Calciumionen zu „sammeln“. Mit dem DAM-Modell der BCR-Aktivierung (siehe 1.3.) ließe sich auch erklären, wie dies praktisch möglich ist, da die BCRs nicht einfach internalisiert und damit unreaktiv werden, sondern die Bindungsstellen erst für das Antigen zugänglich gemacht werden (ein Prozess der sich überdies selbst verstärkt). *In vivo* tasten die B-Zellen die FDCs nach Immunkomplexen ab und erhalten so vermutlich diese wiederkehrende Stimulation. Neben der Antigenaufnahme hat damit der BCR unseren Erkenntnissen zufolge im GC die Möglichkeit, kurze, transiente Ca^{2+} -Signale zu vermitteln. Doch nicht nur die FDCs wirken offenbar als Signalvermittler, sondern auch die B-Zellen selbst: Wir konnten beobachten, wie der Calciumspiegel in B-Zellen, die längerfristige Kontakte zu anderen B-Zellen eingingen, weiter stieg. Es lässt sich spekulieren, ob ein derartiges zweistufiges Signal die B-Zelle dazu lizenziert, T-Zellhilfe zu erhalten. Dafür spricht, dass BCR-Signaling der erfolgreichen T-B-Interaktion scheinbar vorausgehen muss (92). B-Zellen erhalten T-Zell-Hilfe affinitätsabhängig, und die Affinität des BCR zum Antigen wiederum beeinflusst die Höhe des Calciumeinstroms in die Zelle, auch dies konnten wir in unseren Experimenten bestätigen. Die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle steigt dabei mit zunehmender Affinität weiter an. Die Affinität wiederum steigt natürlicherweise durch die Affinitätsreifung im Verlaufe der Zeit und mit der Ausdifferenzierung der B-Zellen an. An einer bestimmten Stelle der Keimzentrumsreaktion

muss der Calciumspiegel demnach durch zusätzliche Faktoren kontrolliert werden, damit die B-Zelle ihre terminale Differenzierung antreten kann und um eine Überaktivierung und damit mögliche Autoreaktivität und Pathogenese zu vermeiden. Tatsächlich konnten wir in unseren FLIM-Experimenten nachweisen, dass die FRET-Signale in den Reporter-B-Zellen und damit die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der ersten Tage, im Verlaufe der Reifung von der naiven B-Zelle hin zur antigenspezifischen, am stärksten ansteigt, jedoch der Unterschied innerhalb der Gruppe der AG-spezifischen B-Zellen abflacht (Abbildung 50). Kostimulatorische Signale, welche zur Abriegelung des Calciumeinstroms in die Zellen führen, können z.B. CD40-vermittelt von T-Zellen stammen, sowie durch TLR-abhängige Stimulation übertragen werden. Hinweise aus der Literatur lassen diese Annahme wahrscheinlich anmuten (siehe 4.3.3. und 4.3.4.).

Der sich verändernde Calciumspiegel in der Zelle hat je nach Höhe vermutlich verschiedene Einflüsse auf die Zelle. Es wäre z.B. denkbar, dass ein geringer Calciumeinstrom die Zelle aktiviert (AG-Aufnahme), eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration (FDC-vermitteltes Signaling durch Immunkomplexe) dem Ansteuern der T_H-Zellen dient (durch Verlagerung in die LZ). Diese senden Überlebenssignale aus. Die Zelle wird dazu veranlasst, eine erneute Runde an der Affinitätsreifung teilzunehmen und so weitere Calciumsignale zu sammeln. Dabei erhält sie auch zusätzliche Stimuli durch andere B-Zellen, was den Prozess beschleunigt. Ist ein kritischer Wert in der Zelle erreicht, sorgt dies entweder zum Ablesen bestimmter Gene zur Differenzierung, zur Emigration aus dem Keimzentrum, oder, ebenfalls denkbar, wenn die Affinität des BCR am Checkpoint für zu groß befunden wird, für den Erhalt negativer Signale, die zum Absterben der Zellen oder Stilllegen der Reaktivität führen.

4.4.1. Auflösung der Keimzentrumsreaktion und Zellschicksal

Noch bevor sich die Keimzentrumsreaktion auflöst, exprimieren einige B-Zellen im GC BLIMP-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*, B-Lymphozyten-induziertes Reifeprotein 1), einen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren, der die Zellen für die Entwicklung zur Plasmazelle programmiert. Außerdem scheinen nur die B-Zellen mit BCRs höchster Affinität für den Plasmazellpool ausgesucht zu werden. Der Pool der Gedächtnis-B-Zellen hingegen beinhaltet auch Klone geringerer Affinität (157).

Zur Beendigung der GC-Reaktion ist u.a. das Herunterregulieren des Transkriptionsfaktors BCL-6 notwendig. Nach neuesten Erkenntnissen müssen auch hierfür BCR-Signale und CD40-abgeleitete Signale zusammenwirken, damit dies eintritt, was die Beendigung der Keimzentrumsreaktion ein weiteres Mal an den von uns vorgeschlagenen Schwellenwert des Calciumspiegels linkt, der unserem Modell zufolge durch diese Faktoren kontrolliert wird. In einer zum Zeitpunkt dieser Arbeit aktuellen Studie von Feng et al. wird gezeigt, wie BCR-Signaling einer bestimmten Stärke die BCL-6-Degradation anschiebt und die Expression von BCL-6 mRNA verringert (158). Weiterhin führte CD40L-Stimulation von B-Zellen in Kultur zur (vermutlich post-transkriptionalen) Verringerung von BCL-6.

Starke gleichzeitige BCR- und CD40-Signale triggern außerdem die Expression von Cbl-Ubiquitinasen in der LZ des Keimzentrums (159). Cbls sind für den Abbau des Transkriptionsfaktors IRF4 (*interferon regulatory factor 4*, Interferon-regulierender Faktor 4)

zuständig. Durch die Regulation der Expression dieses Transkriptionsfaktors wird der vorzeitige Austritt der B-Zellen aus dem Keimzentrum verhindert. Erst die vermehrte Expression von IFR4 führt zur Plasmablastenreifung und zum Verlassen des GC. BCR- und CD40-Signaling sorgen für die Degradation von Cbl und damit für die Hochregulation von IFR4. Weitere Studien belegen, dass die Stärke des CD40-Signals auch die Stabilität der T-B-Kontakte über die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflusst (160). Diese besonders starken Kontakte bringen vor allem Plasmazellvorläufer hervor. Ein Zusammenhang zwischen der Beendigung der Keimzentrumsreaktion und starken BCR- und gleichzeitigen CD40-Signalen, auf welchen auch diese Arbeit hinweist, ist also durchaus gegeben.

Zwar stammen die oben genannten Resultate aus *ex-vivo*-Daten und es ist nicht sichergestellt, ob wir im Tiermodell z.B. anhand intravitalmikroskopischer Daten ähnliche Aussagen treffen könnten. Sie sind aber ein interessanter Ansatzpunkt für die weitergehende Erforschung später Keimzentren und deren Auflösung. Eventuell böte das künstliche Abfangen von Antigen in der GC-Reaktion durch Antikörper die Möglichkeit, die Beendigung der GC-Reaktion zu simulieren (siehe 4.6.) (161).

4.5. Erkenntnisse dieser Arbeit

Unsere Daten zeigen, dass die Rolle des BCRs in GC-B-Zellen nicht ausschließlich ist, durch die Antigenaufnahme für das bessere Anlocken von T-Zell-Hilfe zu sorgen. Seine Signalwirkung ist nicht stummgeschaltet. Dass BCR-Signaltransduktion in GC-B-Zellen aktiv ist, konnten wir in dieser Arbeit zeigen. Es sind nun vor allem Prozesse, welche sich nachfolgend an eine Aktivierung anschließen, die in B-Zellen des Keimzentrums im Vergleich zu naiven B-Zellen gesondert ablaufen. Ebenso ist es nicht die alleinige Aufgabe der CD40-CD40L-Interaktion mit T-Zellen, Überlebenssignale in Form von Zytokinen auszuschütten. Auch hier verursacht die Ligation, anstatt des bloßen Schutzes vor Apoptose, B-Zell-intrinsische Effekte, welche aktiv die positive Selektion begünstigen.

Diese Arbeit beleuchtet nur einen kleinen Teil der Ereignisse innerhalb der Keimzentrumsreaktion, im Besonderen die Rolle der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion. Wir müssen davon ausgehen, dass die Entscheidung über das Zellschicksal noch von vielen weiteren Faktoren abhängig ist, und dass die Wechselwirkungen von Zellarten, Rezeptoren, Downstream-Molekülen und abgelesenen Genen hier hochgradig quervernetzt sind und/oder differentiell reguliert im Vergleich zu anderen körpereigenen Zellentwicklungsszenarien.

Es ist uns im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die BCR-Signaltransduktion in der Affinitätsreifung im Keimzentrum *in vivo* näher zu beschreiben und damit zu bestätigen, dass B-Zell-vermittelte Signaltransduktion im Keimzentrum eine Rolle spielt. Außerdem sind wir mit unserem System sogar in der Lage, eine Quantifizierung dieser Signaltransduktion durchzuführen, indem wir einen direkten Zusammenhang der Ausdifferenzierung der Zellen mit der zellulären Calciumkonzentration herstellen. Diese Methodik ist so bisher nicht angewandt worden und bedeutet einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur endgültigen Aufklärung der Frage, wie das Immunsystem in der Lage ist, uns über die Dauer eines langen Lebens hinweg vor pathogenen Einflüssen des Inneren und

Äußeren zu schützen und lässt langfristig auch die Hoffnung zu, Krankheiten des Immunsystems bald besser verstehen und therapieren zu können.

4.6. Ausblick

Da wir aufgrund der Erkenntnisse dieser Arbeit davon ausgehen können, dass ein bestimmter Calciumspiegel in der B-Zelle kritisch für den Übergang zwischen einzelnen Stufen bzw. für das Verlassen der Keimzentrumsreaktion ist, liegt die Frage nach dem absoluten Wert nahe. Mit FRET-basierten Calciumindikatoren absolute Calciumwerte zu messen ist möglich und setzt die Titration des isolierten Sensors innerhalb Grenzen bestimmter Calciumkonzentrationen voraus. Für den GECI CerTNL15 wurden solche Messungen, basierend auf FLIM, bereits durchgeführt und verifiziert, dass in einem Mausmodell für Multiple Sklerose die Interaktion zwischen Immunzellen und Neuronen, wenn sie länger als 5 Minuten dauert, zu einer toxischen neuronalen Calciumkonzentration von etwa $1\mu\text{M}$ führt und dieser Wert mit zellulären Veränderungen und neuronaler Degeneration in Zusammenhang steht (122). Wir arbeiten daran, dieses System für unseren Sensor TN-XXL ebenfalls nutzbar zu machen.

Eine weitere interessante Anschlussfragestellung ergibt sich aus der Tatsache, dass wir während unserer intravitalem Aufnahmen Zellen in den Marksträngen beobachten konnten, die eindeutig noch zum Calciumsignaling befähigt sind (gequenchte Donor-Fluoreszenz, Abbildung 50). Es könnte sich bei diesen Zellen z.B. um Plasmablasten oder Vorläuferzellen handeln. Die Aufklärung darüber, ob in diesem Zelltyp noch aktives Signaling stattfindet, würde viel zum Verständnis langlebiger Immunantworten beitragen. Wir möchten uns dieser Frage widmen indem wir späte Zeitpunkte der Keimzentrumsreaktion verfolgen. Des Weiteren wurde in unserer Gruppe ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe wir über die Dauer vieler Wochen im Knochenmark lebender Mäuse mikroskopieren können. Die Mäuse erhalten zu diesem Zweck ein Oberschenkel-Implantat, welches ein mit einer Linse versehenes Sichtfenster zum Knochenmark herstellt sowie die Fixation im experimentellen Set-up gewährleistet. So kann ein und dieselbe Stelle des Knochenmarks eines Tieres wiederholt untersucht werden (162). Geht man davon aus, dass Plasmablasten, welche aus der Keimzentrumsreaktion hervorgegangen sind, in Nischen im Knochenmark einwandern, wo sie langlebig werden (163), ist es gut möglich, TN-XXL⁺-Plasmazellen dort auffinden und untersuchen zu können.

Bisher ist es uns nicht gelungen, antigenspezifische YellowCaB-Zellen *in vitro* mit Antigen zu stimulieren. Wir vermuten, dass das Antigen zu diesem Zweck membrangebunden sein muss. Dem BCR ermöglicht dies, durch die Ausübung mechanischer Zugkräfte die Affinität zum Antigen zu testen (39, 40). Dafür muss Antigen auf sogenannten Plasmamembranschichten (PMS) oder planaren Lipiddoppelschichten (*planar lipid bilayer*, PBL) immobilisiert werden. Für PMS werden eukaryotische Zellen in Glaskammern kultiviert und ihre Integrität durch Ultraschallbehandlung zerstört, sodass die Plasmamembran zurückbleibt. Über Streptavidin-Biotin-Reaktionen kann Antigen an dieses gebunden werden. Die Glaskammern können direkt in der konfokalen Mikroskopie eingesetzt werden. Natürliche PLB (im Gegensatz zu synthetischen aus synthetischen Phospholipiden) werden aus PMS hergestellt und funktionieren im Prinzip ähnlich, mit dem Unterschied, dass hier schonender vorgegangen wird und die natürliche Doppelschicht-

Organisation der Phospholipide erhalten bleibt. Nur membrangebundenes Antigen erzeugt B-Zell-Spreizung und damit die korrekte Ausbildung einer immunologischen Synapse, die BCR-Signalmomente naturgetreu mikroskopisch beobachtbar machen (164). Auch können wir so die BCR-Aktivierung von B1-8lo:- und B1-8hi:YellowCaB-Zellen direkt vergleichen, was mit löslichem Antigen nicht möglich wäre. Wir könnten dieses System dazu nutzen, unsere Hypothese einer mehrstufigen Calciumaktivierung zu testen, indem wir mehrmals hintereinander mit Antigen stimulieren und es z.B. mit anschließender anti-CD40-Gabe koppeln würden.

Die Stärke des Ca^{2+} -Signaling in B-Zellen ist von einer Vielzahl von Einflussfaktoren abhängig und wird von diesen kontrolliert, d.h. bei Bedarf verstärkt oder herunter reguliert. Diese Einflussfaktoren können Korezeptoren, Adapterproteine oder unterschiedliche Signalwege sein, die angeschaltet werden. Wie viele metabolische Prozesse unterliegt dabei der Calciumeinstrom in die Zelle einem Feedback-Mechanismus, wird also durch seine eigenen Produkte abgeregelt. Von den unter 1.2.1. beschriebenen Faktoren interessiert uns vor allem der BCR-Signaling-inhibierende CD22-Rezeptor, da Mutationen dieses Oberflächenmoleküls auch in Zusammenhang mit dem Entstehen von Autoimmunität gebracht werden (165–167). Uns interessiert, ob wir in YellowCaB-Tieren mit gentechnisch ausgeschaltetem CD22-Gen demnach eine deutlich höhere FRET-Antwort sichtbar machen können und welche Auswirkung dieses erwartete Verhalten der B-Zellen auf die Entwicklung der Keimzentren sowie der Plasmablasten hat. Denkbar wären in $\text{CD22}^{-/}$:(B1-8:)YellowCaB-Tieren z.B. kürzere Reaktionszeiten, veränderte LZ/DZ-Strukturen, ein deutlich vergrößerter oder verkleinerter Pool an GC-Emigranten und evtl. eine Neigung zur präferentiellen Entstehung von Plasmablasten gegenüber Gedächtnis-B-Zellen (168). Versuche mit diesen Tieren könnten helfen, wichtige Informationen zum Entstehen von Autoimmunkrankheiten, in welchen eine CD22-Fehlregulation eine Rolle spielt, zu gewinnen.

Die während der Keimzentrumsreaktion entstehenden Antikörper können Antigene abfangen und so den Zugriff für die B-Zellen limitieren und damit die Stringenz der Reaktion erhöhen, so dass höher affine Antikörper entstehen (161, 169). Wir wollen versuchen, diesen Umstand bei der Intravitalmikroskopie nachzuahmen, indem wir anti-NP-Antikörper hoher und niedriger Affinität während der Messung intravenös verabreichen. Wir erhoffen uns, eine direkte Reaktion des BCR-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms durch FRET-Änderung zu sehen, möglicherweise auch einen Einfluss auf die Mobilität der Zellen zu beobachten. Eventuell ließe sich auch ein Einfluss des maskierten Antigens auf die Kontaktzeiten und Kontakthäufigkeiten zwischen B-Zellen und B-Zellen oder zwischen B-Zellen und FDCs erkennen. Diese Methoden würden uns helfen, die Rolle des BCR und die Kontrolle seiner Signaltransduktionswege noch besser zu verstehen.

5. Referenzen

1. H. Heine, E. Lien, Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **130**, 180–192 (2003).
2. A. Aderem, D. M. Underhill, Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
3. M. M. Frank, L. F. Fries, The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today.* **12**, 322–326 (1991).
4. B. M. Baker, S. J. Gagnon, W. E. Biddison, D. C. Wiley, Conversion of a T cell antagonist into an agonist by repairing a defect in the TCR/peptide/MHC interface: implications for TCR signaling. *Immunity.* **13**, 475–84 (2000).
5. J. A. Villadangos, Presentation of antigens by MHC class II molecules: Getting the most out of them. *Mol. Immunol.* **38**, 329–346 (2001).
6. K. Suzuki, I. Grigorova, T. G. Phan, L. M. Kelly, J. G. Cyster, Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1485–1493 (2009).
7. D. Nemazee, Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 281–294 (2017).
8. R. R. Hardy, P. W. Kincade, K. Dorshkind, The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *imm.* **26**, 703–714 (2007).
9. R. Mansson *et al.*, Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 21028–21033 (2012).
10. J. Medvedovic, A. Ebert, H. Tagoh, M. Busslinger, Pax5: A master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv. Immunol.* **111**, 179–206 (2011).
11. K. Tokoyoda, T. Egawa, T. Sugiyama, B. Il Choi, T. Nagasawa, Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity.* **20**, 707–718 (2004).
12. J. P. Miller *et al.*, The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J. Exp. Med.* **196**, 705–711 (2002).
13. S. Herzog, M. Reth, H. Jumaa, Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 195–205 (2009).
14. J. P. Pereira, J. An, Y. Xu, Y. Huang, J. G. Cyster, Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat. Immunol.* **10**, 403–411 (2009).
15. R. Pappu *et al.*, Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science (80-.).* **316**, 295–298 (2007).
16. A. E. Hauser, U. E. Höpken, in *Molecular Biology of B Cells* (Elsevier, Second Edi., 2015; <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123979339000126>), pp. 187–214.

17. R. Roozendaal *et al.*, Conduits mediate transport of low molecular weight antigen to lymph node follicles. *30*, 264–276 (2010).
18. T. Junt *et al.*, Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature*. **450**, 110–114 (2007).
19. T. G. Phan, I. Grigorova, T. Okada, J. G. Cyster, Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* **8**, 992–1000 (2007).
20. B. A. Heesters, R. C. Myers, M. C. Carroll, Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* **14** (2014).
21. P. Garside, Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science (80-)*. **281**, 96–99 (1998).
22. N. M. Haynes *et al.*, Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1 High germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol.* **179**, 5099–5108 (2007).
23. S. Moriyama *et al.*, Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* **211**, 1297–1305 (2014).
24. J. F. A. P. Miller *et al.*, Cell-to-cell interaction in the immune response. VII. Requirement for differentiation of thymus-derived cells. *J. Exp. Med.* **134**, 1266–1284 (1971).
25. J. Sprent, Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice measured in vitro. *Immunol. Rev.* **42**, 108–137 (1978).
26. N. A. Mitchison, The carrier effect in the secondary response to hapten- protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur.J.Immunol.* **1**, 10–17 (1971).
27. Y. J. Liu *et al.*, Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. **342**, 929–31 (1989).
28. G. D. Victora *et al.*, Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy using a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. **143**, 592–605 (2010).
29. Z. Shulman *et al.*, T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science (80-)*. **341**, 673–677 (2013).
30. A. D. Gitlin *et al.*, T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science (80-)*. **349**, 643–646 (2015).
31. A. D. Gitlin, Z. Shulman, M. C. Nussenzweig, Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature*. **509**, 637–40 (2014).
32. Z. Shulman *et al.*, Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. **345**, 1058–62 (2014).
33. N. S. De Silva, U. Klein, Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**,

- 137–148 (2015).
34. F. D. Batista, N. E. Harwood, The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
 35. R. E. Dolmetsch, R. S. Lewis, C. C. Goodnow, J. I. Healy, Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* **386**, 855–858 (1997).
 36. F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 34–47 (2008).
 37. M. Matsumoto *et al.*, Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature.* **382** (1996), pp. 462–6.
 38. L. G. Hannum, a M. Haberman, S. M. Anderson, M. J. Shlomchik, Germinal center initiation, variable gene region hypermutation, and mutant B cell selection without detectable immune complexes on follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 931–942 (2000).
 39. E. Natkanski *et al.*, B cells use mechanical energy to Discriminate Antigen Affinities. *Science (80-.).* **340**, 1587–1590 (2013).
 40. C. R. Nowosad, K. M. Spillane, P. Tolar, Germinal center B cells recognize antigen through a specialized immune synapse architecture. *Nat. Immunol.* **17**, 1–11 (2016).
 41. M. H. Kosco, K. Szakal, J. G. Tew, In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J. Immunol.* **140**, 354–360 (1988).
 42. M. H. Kosco-Vilbois, Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 764–769 (2003).
 43. H. M. Dijkstra, C. G. M. Kallenberg, J. G. J. Van De Winkel, Inflammation in autoimmunity: Receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* **22** (2001), pp. 510–516.
 44. M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–29 (2003).
 45. Q.-H. Liu *et al.*, Distinct calcium channels regulate responses of primary B lymphocytes to B cell receptor engagement and mechanical stimuli. *J. Immunol.* **174**, 68–79 (2005).
 46. M. Engelke, N. Engels, K. Dittmann, B. Stork, J. Wienands, Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol. Rev.* **218**, 235–246 (2007).
 47. S.-F. Hsu *et al.*, Fundamental Ca²⁺ signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca²⁺ entry pathway. *J. Immunol.* **166**, 6126–6133 (2001).
 48. K. L. Hoek *et al.*, Transitional B cell fate is associated with developmental stage-specific regulation of diacylglycerol and calcium signaling upon B Cell receptor engagement. *J. Immunol.* **177**, 5405–5413 (2006).
 49. S. Junek, M. Engelke, D. Schild, J. Wienands, Spatiotemporal resolution of Ca²⁺ signaling

- events by real time imaging of single B cells. *FEBS Lett.* **586**, 1452–1458 (2012).
50. L. Nitschke, T. Tsubata, Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol.* **25** (2004), pp. 543–550.
 51. Y. Baba, M. Matsumoto, T. Kurosaki, Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol. Immunol.* **2**, 2–6 (2013).
 52. J. W. Putney, A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* **7**, 1–12 (1986).
 53. H. Shinohara *et al.*, PKC β regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J. Exp. Med.* **202**, 1423–1431 (2005).
 54. S. Feske, Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1238** (2011), pp. 74–90.
 55. S. Fuchs *et al.*, Antiviral and regulatory T cell immunity in a patient with stromal interaction molecule 1 deficiency. *J. Immunol.* **188**, 1523–1533 (2012).
 56. M. Vaeth *et al.*, Store-Operated Ca²⁺ entry in follicular T cells controls humoral immune responses and autoimmunity. *Immunity.* **44**, 1350–1364 (2016).
 57. M. M. Winslow, E. M. Gallo, J. R. Neilson, G. R. Crabtree, The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity.* **24**, 141–152 (2006).
 58. A. M. Scharenberg, L. A. Humphries, D. J. Rawlings, Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 778–89 (2007).
 59. L. Nitschke, The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 290–297 (2005).
 60. L. Nitschke, R. Carsetti, B. Ocker, G. Köhler, M. C. Lamers, CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr. Biol.* **7**, 133–143 (1997).
 61. H. Wardemann, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science (80-)*. **301**, 1374–1377 (2003).
 62. R. J. Benschop, D. Melamed, D. Nemazee, J. C. Cambier, Distinct signal thresholds for the unique antigen receptor – linked gene expression programs in mature and Immature B Cells. *J. Exp. Med.* **190** (1999).
 63. S. B. Gauld, R. J. Benschop, K. T. Merrell, J. C. Cambier, Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat. Immunol.* **6**, 1160–1167 (2005).
 64. J. I. Healy *et al.*, Activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity.* **6**, 419–428 (1997).
 65. S. Pillai, A. Cariappa, The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 767–77 (2009).
 66. M. Balazs, F. Martin, T. Zhou, J. F. Kearney, Blood dendritic cells interact with splenic

- marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. **17**, 341–352 (2002).
67. S. Yurasov *et al.*, Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **201**, 703–711 (2005).
68. N. P. Nikolov, G. G. Illei, Pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **21**, 465–470 (2009).
69. T. L. O'Keefe, G. T. Williams, F. D. Batista, M. S. Neuberger, Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J. Exp. Med.* **189**, 1307–1313 (1999).
70. S. Bolland, J. V. Ravetch, in FcγRIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. **13**, 277–285 (2000).
71. J. Yang, M. Reth, Receptor dissociation and B-cell activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **393**, 27–43 (2015).
72. A. Kusumi, H. Ike, C. Nakada, K. Murase, T. Fujiwara, Single-molecule tracking of membrane molecules: Plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Semin. Immunol.* **17**, 3–21 (2005).
73. J. Yang, M. Reth, Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature*. **467**, 465–469 (2010).
74. M. Woodruff, B. Reid, K. James, Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on human lymphocytes in vitro. *Nature*. **215**, 591–594 (1967).
75. J. Yang, M. Reth, The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* **584** (2010), pp. 4872–4877.
76. K. Kläsener, P. C. Maity, E. Hobeika, J. Yang, M. Reth, B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk. *Elife*. **3**, e02069 (2014).
77. O. Garaschuk, O. Griesbeck, A. Konnerth, Troponin C-based biosensors: A new family of genetically encoded indicators for in vivo calcium imaging in the nervous system. *Cell Calcium*. **42**, 351–361 (2007).
78. R. H. Kretsinger, Calcium-Binding Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 239–266 (1976).
79. Z. Grabarek, Structural Basis for Diversity of the EF-hand Calcium-binding Proteins. *J. Mol. Biol.* **359** (2006), pp. 509–525.
80. J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto, A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **3**, 137–141 (2001).
81. V. A. Romoser, P. M. Hinkle, A. Persechini, Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J. Biol. Chem.* **272**, 13270–13274 (1997).

82. G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11241–11246 (1999).
83. A. Miyawaki, R. Y. Tsien, Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* **327**, 472–500 (2000).
84. M. Mank, O. Griesbeck, Genetically encoded calcium indicators. *Chem. Rev.* **108**, 1550–1564 (2008).
85. N. Heim, O. Griesbeck, Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 14280–14286 (2004).
86. M. Mank *et al.*, A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys. J.* **90**, 1790–1796 (2006).
87. N. Heim *et al.*, Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nat. Methods.* **4**, 127–129 (2007).
88. M. Mues *et al.*, Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nat. Med.* **19**, 778–83 (2013).
89. J. Mueller, M. Matloubian, J. Zikherman, Cutting Edge: An in vivo reporter reveals active B cell receptor signaling in the germinal center. *J. Immunol.* **194**, 2993–7 (2015).
90. A. M. Khalil, J. C. Cambier, M. J. Shlomchik, B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science.* **336**, 1178–81 (2012).
91. J. Zikherman, R. Parameswaran, A. Weiss, Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature.* **489**, 160–164 (2012).
92. W. Luo *et al.*, B cell receptor and CD40 signaling are rewired for synergistic induction of the c-Myc transcription factor in germinal center B cells. *Immunity.* **48**, 313–326 (2018).
93. T. Litzemberger *et al.*, B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.* **188**, 169–180 (1998).
94. T.-A. Y. Shih, E. Meffre, M. Roederer, M. C. Nussenzweig, Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 570–5 (2002).
95. S. Yoshikawa *et al.*, Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of Ca²⁺ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci. Rep.* **6**, 18738 (2016).
96. C. Ulbricht, R. L. Lindquist, L. M. Tech, A. E. Hauser, Tracking plasma cell differentiation in living mice with two-photon-microscopy. *Methods Mol. Biol.* **1623**, 37–50 (2017).
97. M. Mank *et al.*, A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat. Methods.* **5**, 805–811 (2008).
98. A. Geiger *et al.*, Correlating calcium binding, Förster resonance energy transfer, and conformational change in the biosensor TN-XXL. *Biophys. J.* **102**, 2401–10 (2012).

99. H. C. Gerritsen, M. A. H. Asselbergs, A. V. Agronskaia, W. G. J. H. M. Van Sark, Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: Acquisition speed, photon economy and lifetime resolution. *J. Microsc.* **206**, 218–224 (2002).
100. G. Weber, Resolution of the fluorescence lifetimes in a heterogeneous system by phase and modulation measurements. *J. Phys. Chem.* **85**, 949–953 (1981).
101. M. A. Digman, V. R. Caiolfa, M. Zamai, E. Gratton, The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophys. J.* **94**, L14–L16 (2008).
102. Sauer B, B. Sauer, Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2087–2096 (1987).
103. P. Soriano, Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [1]. *Nat. Genet.* **21** (1999), pp. 70–71.
104. M. Ojaniemi *et al.*, Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33** (2003), pp. 597–605.
105. H. Ren *et al.*, Toll-like receptor-triggered calcium mobilization protects mice against bacterial infection through extracellular ATP release. *Infect. Immun.* **82**, 5076–5085 (2014).
106. E. J. Pone *et al.*, B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: Modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity.* **48**, 1–12 (2015).
107. C. Arpin *et al.*, Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science (80-.).* **268**, 5–8 (1995).
108. K. Roh *et al.*, Biomaterials A synthetic stroma-free germinal center niche for efficient generation of humoral immunity ex vivo. *Biomaterials.* **164**, 106–120 (2018).
109. E. Strehler, M. Treiman, Calcium pumps of plasma membrane and cell Interior. *Curr. Mol. Med.* (2004).
110. D. M. Bautista, R. S. Lewis, Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *J. Physiol.* (2004).
111. D. Guerini, L. Coletto, E. Carafoli, Exporting calcium from cells. *Cell Calcium* (2005).
112. C. C. Goodnow *et al.*, Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* **334**, 676–682 (1988).
113. B. K. L. Hippen, L. E. Tze, T. W. Behrens, CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J. Exp. Med.* **191**, 0–6 (2000).
114. D. M. Tarlinton, Evolution in miniature: Selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol. Cell Biol.* **86** (2008), pp. 133–138.
115. K. M. Toellner *et al.*, The human germinal centre cells, follicular dendritic cells and germinal centre t cells produce b cell-stimulating cytokines. *Cytokine.* **7**, 344–354 (1995).

116. A. Butch, G. Chung, J. Hoffmann, M. Nahm, Cytokine expression by germinal center cells. *J. Immunol.* **150**, 39–47 (1993).
117. D. Mesquita Jr *et al.*, Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **49**, 1–11 (2016).
118. A. E. Hauser *et al.*, Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity.* **26**, 655–67 (2007).
119. L. Tian, S. Andrew Hires, L. L. Looger, Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb. Protoc.* **7**, 647–656 (2012).
120. T. Rose, P. M. Goltstein, R. Portugues, O. Griesbeck, Putting a finishing touch on GECIs. *Mol. Neuroscience.* **7**, 1–15 (2014).
121. S. Direnberger *et al.*, Biocompatibility of a genetically encoded calcium indicator in a transgenic mouse model. *Nat. Commun.* **3**, 1031 (2012).
122. J. L. Rinnenthal *et al.*, Parallelized TCSPC for dynamic intravital fluorescence lifetime imaging: quantifying neuronal dysfunction in neuroinflammation. *PLoS One.* **8**, e60100 (2013).
123. D. Prawitt *et al.*, TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15166–71 (2003).
124. P. Launay *et al.*, TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science (80-.).* **306**, 1374–1377 (2004).
125. F. Coffey, B. Alabyev, T. Manser, Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity.* **30**, 599–609 (2009).
126. R. J. Johnston *et al.*, Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science (80-.).* **325**, 1006–1010 (2009).
127. R. Nurieva *et al.*, Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science (80-.).* **325**, 1001–5 (2009).
128. D. Yu *et al.*, The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity.* **31**, 457–468 (2009).
129. D. Zotos *et al.*, IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell–intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* **207**, 365–378 (2010).
130. K. M. Toellner *et al.*, T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* **187**, 1193–1204 (1998).
131. R. L. Reinhardt, H. E. Liang, R. M. Locksley, Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
132. K. Hatzi *et al.*, BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* **212**, 539–553 (2015).

133. Y. H. Nguyen, K. Y. Lee, T. J. Kim, S. J. Kim, T. M. Kang, CD40 co-stimulation inhibits sustained BCR-induced Ca²⁺ signaling in response to long-term antigenic stimulation of immature B cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **15**, 179–187 (2011).
134. J. R. Lee, Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: Effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment. *Mol. Cell. Biochem.* **252**, 1–7 (2003).
135. C. G. Vinuesa, M. A. Linterman, C. C. Goodnow, K. L. Randall, T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol. Rev.* **237**, 72–89 (2010).
136. D. Dominguez-Sola *et al.*, The FOXO1 transcription factor instructs the germinal center dark zone program. *Immunity.* **43**, 1064–1074 (2015).
137. Y. Zhan *et al.*, Responses Against Complex Antigens in Various Models of CD4 T-Cell Deficiency. *Immunol. Res.* **30**, 1–14 (2004).
138. E. J. Pone *et al.*, Toll-Like Receptors and B-Cell Receptors Synergize to Induce Immunoglobulin Class-Switch DNA Recombination: Relevance to Microbial Antibody Responses. *Crit. Rev. Immunol.* **30**, 1–29 (2010).
139. S. R. Park *et al.*, HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat. Immunol.* **10**, 540–550 (2009).
140. T. H. Tran *et al.*, B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effects of silencers. *Nat. Immunol.* **11**, 148–154 (2010).
141. D. P. Castiblanco, R. W. Maul, L. M. Russell Knode, P. J. Gearhart, Co-stimulation of BCR and toll-like receptor 7 increases somatic hypermutation, memory B cell formation, and secondary antibody response to protein antigen. *Front. Immunol.* **8** (2017).
142. E. J. Pone *et al.*, BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* **3**, 712–767 (2012).
143. C. R. Ruprecht, A. Lanzavecchia, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 810–816 (2006).
144. J. Eckl-Dorna, F. D. Batista, BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9 ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. *Blood.* **113**, 3969–3977 (2009).
145. M. Akkaya *et al.*, Toll-like receptor 9 antagonizes antibody affinity maturation. *Nat. Immunol.* **19**, 255–266 (2018).
146. E. Ozcan, I. Rauter, L. Garibyan, S. R. Dillon, R. S. Geha, Toll-like receptor 9 , transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor , and CD40 synergize in causing B-cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 601–609 (2011).

147. N. L. Bernasconi, E. Traggiai, A. Lanzavecchia, Activation of human memory B cells maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science (80-.)*. **2199**, 2199–2202 (2010).
148. C. D. C. Allen, T. Okada, Imaging of germinal center selection. *Science*. **315**, 528–531 (2007).
149. J. Rossbacher, A. M. Haberman, S. Neschen, A. Khalil, M. J. Shlomchik, Antibody-independent B cell-intrinsic and -extrinsic roles for CD21/35. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2384–2393 (2006).
150. Z. Chen, S. B. Koralov, M. Gendelman, M. C. Carroll, G. Kelsoe, Humoral immune responses in Cr2^{-/-} mice: enhanced affinity maturation but impaired antibody persistence. *J. Immunol.* **164**, 4522–4532 (2000).
151. J. M. Ahearn *et al.*, Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*. **4**, 251–262 (1996).
152. S. E. Applequist, J. Dahlström, N. Jiang, H. Molina, B. Heyman, Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. *J. Immunol.* **165**, 2398–2403 (2000).
153. M. Kolev, G. Le Friec, C. Kemper, Complement-tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 811–820 (2014).
154. F. D. Batista, D. Iber, M. S. Neuberger, B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. **411**, 489–94 (2001).
155. S. J. Fleire *et al.*, B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science (80-.)*. **312**, 738–741 (2006).
156. T. G. Phan, J. A. Green, E. Gray, Y. Xu, J. G. Cyster, Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat. Immunol.* **10**, 786–796 (2009).
157. K. G. C. Smith *et al.*, The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J.* **16**, 2996–3006 (1997).
158. J. Feng, X. Liu, X. Ni, H. Qi, External signals regulate germinal center fate-determining transcription factors in the A20 lymphoma cell line. *Mol. Immunol.* **93**, 79–86 (2018).
159. X. Li *et al.*, Cbl Ubiquitin Ligases Control B Cell Exit from the Germinal-Center Reaction. *Immunity*. **48**, 530–541.e6 (2018).
160. W. Ise *et al.*, T follicular helper cell-germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate. *Immunity*. **48**, 702–715.e4 (2018).
161. Y. Zhang *et al.*, Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp.*

Med. **210**, 457–464 (2013).

162. D. Reismann *et al.*, Longitudinal intravital imaging of the femoral bone marrow reveals plasticity within marrow vasculature. *Nat. Commun.* **8**, 2153 (2017).
163. A. Radbruch *et al.*, Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* **6** (2006), pp. 741–750.
164. P. Tolar, J. Hanna, P. D. Krueger, S. K. Pierce, The constant region of the membrane immunoglobulin mediates B cell-receptor clustering and signaling in response to membrane antigens. *Immunity.* **30**, 44–55 (2009).
165. W. Luo *et al.*, A balance between B cell receptor and inhibitory receptor signaling controls plasma cell differentiation by maintaining optimal Ets1 levels. *J. Immunol.* **193**, 909–20 (2014).
166. N. Sieger *et al.*, CD22 ligation inhibits downstream B cell receptor signaling and Ca(2+) flux upon activation. *Arthritis Rheum.* **65**, 770–9 (2013).
167. L. Nitschke, CD22 and Siglec-G regulate inhibition of B-cell signaling by sialic acid ligand binding and control B-cell tolerance. *Glycobiology.* **24**, 807–817 (2014).
168. C. P. Chappell, K. E. Draves, E. A. Clark, CD22 is required for formation of memory B cell precursors within germinal centers. *PLoS One.* **12**, 1–10 (2017).
169. Y. Zhang, L. Garcia-Ibanez, K. M. Toellner, Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* **270**, 8–19 (2016).
170. B. P. Zambrowicz *et al.*, Disruption of overlapping transcripts in the ROSA geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 3789–9794 (1997).
171. D. Liu *et al.*, T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature.* **517**, 214–8 (2015).

Eigene Publikationen und Mitautorenschaft

1. H. Radbruch *et al.*, Intravital FRET: Probing Cellular and Tissue Function in Vivo. *Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci.* **16**, 11713–11727 (2015).
2. C. Ulbricht, R. L. Lindquist, L. Tech, A. E. Hauser, in *Methods Mol Biol* (2017; http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7095-7_3), vol. 1623, pp. 37–50.
3. A. Rakhymzhan *et al.*, Synergistic Strategy for Multicolor Two-photon Microscopy: Application to the Analysis of Germinal Center Reactions in Vivo. *Sci. Rep.* **7** (2017)
4. K. Pollok *et al.*, The chronically inflamed central nervous system provides niches for long-lived plasma cells. *Acta Neuropathol. Commun.* **5**, 88 (2017).