

**Vergleichende Analyse des Antikörper- und B-Zell-vermittelten
immunologischen Gedächtnisses**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Heike Leyendeckers
aus Grefrath

Hundt Druck GmbH, Köln
2003

Berichtersteller: Priv. Doz. Dr. Roswitha Nischt
Prof. Dr. Jonathan Howard

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
2 Material und Methoden	16
2.1 Puffer	16
2.2 Zellen	16
2.2.1 Peripheres Blut	16
2.2.2 Präparation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	16
2.3 Verwendete Antigene	17
2.4 Kopplungsmethoden	17
2.4.1 Kopplung von Antigenen an Magnetpartikel	17
2.4.2 Kopplung von Antigenen an Phycoerythrin	18
2.4.3 Kopplung von Biotin an Antigen	19
2.5 Magnetische Zellsortierung	19
2.5.1 Anreicherung von CD19 ⁺ B-Zellen	20
2.5.2 Magnetische Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen	20
2.5.3 Magnetische Anreicherung PLA ₁ B bindender basophiler Granulozyten	21
2.6 Immunfluoreszenzfärbungen	21
2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung CD19 ⁺ B Zellen	22
2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung rTT.C-spezifischer B-Zellen	22
2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung PLA ₁ B-spezifischer B-Zellen	22
2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung PLA ₁ B-bindender Granulozyten	23
2.6.5 Immunfluoreszenzfärbung NC16A-spezifischer B-Zellen	23
2.6.6 Immunfluoreszenzfärbung TPO-spezifischer B-Zellen	23
2.7 Durchflußzytometrische Analyse	23
2.7.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahl in einer Probe	24
2.8 Humane B-Zellkultur	24
2.9 Detektion von Antigen-spezifischen Immunglobulinen	25
2.9.1 ELISA	25
2.9.2 Western Blot Analyse	27
2.9.3 Färbung humaner Hautschnitte	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Etablierung der Methode	28
3.1.1 Experimentelle Strategie	28
3.1.2 Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen	29
3.1.2.1 Anreicherung von B-Zellen mit Spezifität für rTT.C	29
3.1.2.2 Anreicherung von B-Zellen mit Spezifität für PLA ₁ B	31
3.1.2.3 Anreicherung von NC16A-spezifischen B-Zellen	32
3.1.2.4 Anreicherung von TPO-spezifischen B-Zellen	33
3.1.3 Reproduzierbarkeit der Methode	34
3.1.4 Ermittlung der Wiederfindungsrate	35
3.2 Spezifitätskontrolle der angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen	36
3.2.1 Kontrollanreicherung mit irrelevantem Antigen	37
3.2.1.1 Spezifitätskontrolle der Anreicherung NC16A-bindender B-Zellen	37
3.2.1.2 Spezifitätskontrolle der Anreicherung TPO-bindender B-Zellen	39
3.2.2 Spezifitätskontrolle mittels Zubler-System (LD-Kultur)	41
3.2.2.1 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur rTT.C-spezifischer IgG ⁺ B-Zellen	42
3.2.2.2 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur PLA ₁ B-spezifischer IgG ⁺ B-Zellen	42
3.2.2.3 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur GST-NC16A-bindender IgG ⁺ B-Zellen	42
3.2.2.4 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur TPO-spezifischer IgG ⁺ B-Zellen	44
3.3 Phänotypisierung Antigen-spezifischer B-Zellen	45
3.3.1 Phänotypisierung rTT.C-spezifischer B-Zellen	45
3.3.2 Phänotypisierung PLA ₁ B-spezifischer B-Zellen	47
3.3.3 Phänotypisierung NC16A-spezifischer B-Zellen	48
3.3.4 Phänotypisierung TPO-spezifischer B-Zellen	49
3.4 Korrelationsanalysen	50

3.4.1	Frequenzen von rTT.C-spezifischen IgG ⁺ B-Zellen und Serumtiter von rTT.C-spezifischem IgG	50
3.4.2	Frequenzen von PLA ₁ B-spezifischen IgG ⁺ B-Zellen und Serumtiter von PLA ₁ B-spezifischem IgG	52
3.4.3	Frequenzen von NC16A-spezifischen IgG ⁺ B-Zellen und Serumtiter von NC16A-spezifischem IgG	54
3.4.4	Frequenzen von TPO-spezifischen IgG ⁺ B-Zellen und Serumtiter von TPO-spezifischem IgG	55
4	Diskussion	58
4.1	Etablierung einer Methode zur Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen	60
4.2	Spezifitätskontrolle der angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen	61
4.3	Immunophänotypisierung Antigen-spezifischer B-Zellen	62
4.4	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Frequenz Antigen-spezifischer Gedächtnis B-Zellen und Antigen-spezifischem Antikörpertiter	65
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70

Abkürzungen

APC	Allophycozyanin
BSA	Rinderserumalbumin
ELISA	Enzym-gekoppelter-Immunosorbenstest
FITC 1	Fluoreszeinisothiozyanat Isomer 1
g	Gravitation
GST	Glutathion-S-Transferase
Ig	Immunglobulin
MACS	magnetischer Zellsortierer
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC I, II	Haupt-Lymphozyten Antigen I und II
NC16A	16. nicht-kollagenöse Domäne des Typ XVII Kollagen
OD	optische Dichte
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
rad	Bestrahlungseinheit
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
rTT.C	rekombinantes Tetanus Toxin C-Fragment
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeitsfaktor
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PLA ₁ B	Phospholipase A ₁ B
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
s	Sekunde
TPO	Thyroidperoxidase
U	Einheiten

1 Einleitung

Die Immunologie hat sich aus der Beobachtung heraus entwickelt, daß Menschen, nachdem sie bestimmte Infektionen überwunden hatten, diese Krankheiten nur in äußerst seltenen Fällen ein zweites Mal bekamen. Dieses adaptive immunologische Gedächtnis ist hochgradig spezifisch: wer einmal Masern hatte, ist vor dem Masern-Virus geschützt, aber nicht vor anderen Virus-Erkrankungen wie Mumps oder Windpocken. Diese Spezifität ist ein Grundcharakteristikum der Immunantwort.

Die verschiedenen Reaktionen des Immunsystems zerstören und beseitigen eindringende Organismen und alle Giftstoffe, die diese abgeben oder ausscheiden. Da die Wirkungsweise des Immunsystems somit eine zerstörende ist, ist es absolut notwendig, daß Immunreaktionen ausschließlich gegen Moleküle erfolgen, die für den Organismus fremd sind, und niemals gegen Moleküle des eigenen Körpers. Diese Fähigkeit, fremde von eigenen Molekülen zu unterscheiden, ist eine weitere grundlegende Eigenschaft des Immunsystems. Gelegentlich versagt das Immunsystem jedoch und reagiert gegen Zellen und Moleküle des eigenen Körpers. Solche Autoimmunerkrankungen können tödliche Folgen haben.

Die Fähigkeit des Immunsystems auf unterschiedlichste Antigene hochspezifisch reagieren zu können, läßt sich anhand der Theorie der klonalen Selektion erklären (Burnet 1957). Diese besagt, daß im gesunden Immunsystem zunächst zwar eine riesige Vielfalt an Lymphozyten mit verschiedensten Spezifitäten entsteht, anschließend aber nur die Zellen ausgewählt werden, welche die Fähigkeit besitzen ein Antigen spezifisch zu binden. Gemäß dieser Theorie werden Lymphozyten während ihrer Entwicklung darauf festgelegt, mit ihren Rezeptoren selektiv nur ein Antigen binden zu können.

Adaptive Immunantworten werden grob in zwei Klassen eingeteilt: (1) die Zell-vermittelte Antwort und (2) die Antikörper-vermittelte Antwort (humorale Immunität). Die für die Zell-vermittelte Immunität wichtigsten Lymphozyten sind T-Zellen, welche sich in mindestens zwei Hauptklassen unterteilen lassen: die T-Helfer-Zellen, welche die Aktivität anderer Zellen des Immunsystems verstärken und regulieren, sowie die zytotoxischen T-Zellen, die unmittelbar an der Abwehr von Infektionen durch die Vernichtung der infizierten Zellen beteiligt sind.

Die humorale Immunität basiert auf der spezifischen Aktivierung von B-Zellen, deren Differenzierung zu Plasmazellen und der Produktion von Antikörpern

(Immunglobuline). Antikörper bestehen aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Polypeptidketten, welche in konstante und variable Regionen unterteilt sind. Die schweren Ketten können sich in den konstanten Regionen unterscheiden, was die Klasse des Antikörpers, den sogenannten Isotyp, definiert. Man findet die fünf Isotypen IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Durch die unterschiedlichen konstanten Regionen werden die Effektorfunktionen eines Antikörpers bestimmt, die variable Region bestimmt die Antigenbindung.

Antikörper zirkulieren im Blut und anderen Körperflüssigkeiten und binden überall dort spezifisch an das Antigen, für das die entsprechende B-Zelle im Laufe ihrer Entwicklung spezifisch selektioniert wurde. Sie inaktivieren aufgrund dieser Bindung unter anderem Viren und bakterielle Giftstoffe. Außerdem leitet die Antikörperbindung bei eindringenden Mikroorganismen deren Zerstörung ein (Opsonierung).

Wie von der Theorie der klonalen Selektion angenommen, wird die Spezifität der Immunglobuline während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark durch einzigartige genetische Mechanismen festgelegt. Hierbei können hunderte verschiedene Gensegmente der Gene, die für die Antikörper kodieren, kombiniert werden (Tonegawa 1983, Alt 1987). Zusätzlich wird durch Mutation in diesen Gensegmenten eine noch größere Vielfalt unterschiedlicher Antikörpermoleküle möglich (Kocks 1988). Alle von einer individuellen B-Zelle produzierten Antikörper haben daher die gleiche Antigenbindungsstelle (Nussenzweig 1987). Die B-Zelle trägt die von ihr hergestellten Immunglobuline auf der Oberfläche ihrer Zellmembran, wo sie als Rezeptoren für das Antigen dienen (Pernis 1970, Raff 1970, Reth 1992). Noch im Knochenmark findet durch klonale Deletion eine Selektion der autoreaktiven B-Zellen statt: bindet eine unreife B-Zelle im Knochenmark ein Autoantigen, wird diese Zelle entweder eliminiert oder inaktiviert (Nemazee 1989, Nossal 1991, Nossal 1992).

Nachdem die selbst-toleranten Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark sämtliche Entwicklungsstadien erfolgreich durchlaufen haben, werden sie als reife, naive B-Zellen, die sowohl den IgM sowie den IgD Isotyp des Antikörpers ausprägen, in die Zirkulation zwischen Blut und sekundären, lymphoiden Organen entlassen (Mather 1984). Dort sind sie einer ständigen natürlichen Selektion unterzogen: nur jene B-Zellen, welche mit ihrem Antigen-Rezeptor ihr Antigen binden, werden aktiviert zu

prolifrieren und zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen zu differenzieren (Rajewsky 1996).

T-Zell-unabhängige Antigene, wie z.B. bakterielle Polysaccharide, können alleine durch ihre Bindung an das Oberflächen-Immunglobulin die B-Zelle aktivieren (Mond 1995). T-Zell-abhängige Antigene, wie z.B. Proteine, benötigen dagegen T-Zell-Hilfe, da ihre Antigen-Rezeptorbindung alleine nicht ausreicht um eine B-Zelle zu aktivieren (Parker 1993). Durch die Bindung des Antigens erhält die B-Zelle ein erstes Signal zur Aktivierung. Das Antigen wird mittels Antigen-Rezeptor in darauf spezialisierte Kompartimente im Zellinneren aufgenommen und in Peptidfragmente zerlegt (Prozessierung). Werden diese Peptide mittels MHC Klasse II Molekülen T-Helfer-Zellen präsentiert, welche den Peptid-MHC-Komplex durch ihren T-Zell-Rezeptor und den CD4-Korezeptor erkennen, erhält die B-Zelle ein zusätzliches Signal, welches zur Aktivierung nötig ist. Unter anderem spielt dabei die Bindung von CD40 auf der B-Zelle an CD40L auf der T-Helferzelle eine wichtige Rolle (Van den Eertwegh 1993). Die Aktivierung von B-Zellen führt zur Bildung von Primärfollikeln und später durch Assoziation mit T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen zu sogenannten Keimzentren in denen sich die B-Zellen zu teilen beginnen, so daß aus einer B-Zelle ein Klon von Tochterzellen mit identischer Spezifität wird. In den Keimzentren finden hierzu mehrere Prozesse statt: (1) Bestimmte Regionen der Antikörpergene sind Ziel somatischer Hypermutationen, was zu einer gesteigerten Spezifität und damit höheren Affinität der Antikörper-Antigen-Bindung führen kann (Eisen 1964, Kelsoe 1996). (2) Es findet ein Klassenwechsel von den Antikörper-Isotypen IgM und IgD zu den Isotypen IgG, IgA oder IgE statt (Liu, Y. J. 1991, Siebenkotten 1995). (3) Zusätzlich werden die B-Zellen einer erneuten Selektion unterzogen: Bindung von Antigen an den B-Zell-Rezeptor ohne T-Zell-Hilfe führt zu einer schnellen Apoptose der B-Zelle, ein Mechanismus der hilft das Risiko der Bildung von autoreaktiven B-Zellen einzuschränken (Liu, Y. J. 1989, Rajewsky 1996).

Die Keimzentrumsreaktion führt zur Bildung von Antikörper-sekretierenden Plasmazellen und von Gedächtnis B-Zellen. Das B-Zellgedächtnis ist ein systemisches Phänomen, welches charakterisiert wird durch: (a) erhöhte Titer und Affinität von existierenden Antikörper im Serum und (b) zirkulierende Gedächtnis B-Zellen, welche eine schnelle Antikörperantwort nach erneutem Kontakt mit dem Antigen liefern. Die relative Wichtigkeit ihres Beitrages ist bisher allerdings immer

noch nicht gut verstanden (Ahmed 1996). Die Anwesenheit von neutralisierenden oder opsonierenden Antikörpern im Serum ist das einzige Mittel um spezifisch vor einer Infektion zu schützen und ist der wichtigste Schutzmechanismus gegen viele virale und die meisten mikrobiellen Infektionen (Ada 1990, Ahmed 1996, Zinkernagel 1996, Zinkernagel 1997). Gedächtnis B-Zellen können zwar keine Infektion direkt bekämpfen, aber da sie nach Kontakt mit dem Pathogen sehr schnell proliferieren und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren können, spielt die Anwesenheit von Gedächtnis B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Infektionen und dem Schutz vor Krankheiten (Ahmed 1996).

Die Halbwertszeit von sekretiertem Antikörper beträgt ungefähr 3 Wochen (Fahey 1965, Morell 1970, Talbot 1987, Vieira 1988). Daher setzt ein über längere Zeit bestehender Antikörpertiter die Anwesenheit von Antikörper-produzierenden Plasmazellen voraus.

Der größte Teil der Antikörper wird von Plasmazellen im Knochenmark produziert (Benner 1981, Slifka 1995). Lange bestand die Meinung, daß diese Plasmazellen nur kurzlebig seien und ständig neu durch Aktivierung mit persistierendem Antigen aus langlebigen Gedächtnis B-Zellen nachgebildet würden (Gray 1988, Szakal 1989, Tew 1990, MacLennan 1992, Bachmann 1994, Ahmed 1996, Bachmann 1996, Zinkernagel 1996). Jüngere Studien zeigten jedoch, das eine substantielle Fraktion der Plasmazellen im murinen Knochenmark langlebig ist und ohne die Anwesenheit von Antigen oder Gedächtnis B-Zellen über einen langen Zeitraum (> 1 Jahr) hinweg Antikörper produzieren (Manz 1997, Manz 1998, Slifka 1998b, Maruyama 2000). Wenn langlebige Plasmazellen die einzige zelluläre Quelle für langlebigen Antikörpertiter sind, muß die humorale Immunität nicht notwendigerweise mit der Gedächtnis B-Zell-Immunität korrelieren, sondern könnte eine unabhängig kontrollierte Form des immunologischen Gedächtnisses darstellen. Letzteres könnte für die Entwicklung von Vakzinen und die Therapie von Patienten mit Allergien und Autoimmunerkrankungen wichtig sein. Bei Vakzinierungen würden sich unter anderem daraus bedeutende Folgen für die Strategie von Wiederholungs- oder Verstärkungsimpfungen ergeben. In diagnostischen Routineuntersuchungen ist die Messung der Konzentration von Antigen-spezifischen Antikörpern im Serum bislang der einzige Meßwert für schützende Immunität nach Vakzinierung (Ada 1990). Daher werden minimale Titer Antigen-spezifischer Antikörper im Serum als Grenzwerte festgelegt, bei denen ein immunologischer Schutz nicht mehr gegeben ist und eine

Wiederholungsimpfung angeraten wird. Dies ist nicht immer sinnvoll, da schützende Immunität nach Vakzinierung auch noch dann vorhanden sein kann, wenn keine Antigen-spezifischen Antikörper mehr im Serum nachweisbar sind (Wainwright 1991, Tilzey 1995, West 1996). In diesen Fällen scheinen Gedächtnis B-Zellen und T-Zellen eine Rolle zu spielen.

Bei vielen Erkrankungen, die durch Fehlfunktionen des Immunsystems hervorgerufen werden, wie Allergien oder Autoimmunerkrankungen, dient der Nachweis von Allergen- oder Autoantigen-spezifischen Antikörpern ebenfalls häufig als diagnostisches Mittel. Auch bei diesen Krankheiten ist nicht klar, welche Rolle Antigen-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei der Aufrechterhaltung der Antikörper-Serumtiter spielen.

Ein Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen ob sich Zusammenhänge zwischen spezifischem Antikörpertiter und damit den entsprechenden Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und den spezifischen Gedächtnis B-Zellen im humanen peripheren Blut finden lassen. Dazu wurden Antigen-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei Immunantworten untersucht, die sich hinsichtlich verschiedener Parameter wie Persistenz des Antigens, Häufigkeit der Immunisierung und Dauer der Immunantwort unterschieden.

Es wurde eine Vakzinierungssituation analysiert, in der durch die Impfung mit dem formaldehydfixierten und damit ungefährlichen Tetanus Toxoid eine nachweisbar schützende und langanhaltende Antikörperimmunität gegen das Tetanus Toxin aufgebaut wird (Scheibel 1966, Simonsen 1984, Ada 1990). Tetanus Toxin wird von dem Bakterium *Clostridium tetani* produziert und löst Wundstarrkrampf aus. Es blockiert durch Bindung an Nervenzellen die inhibitorische Neuronenaktion und führt so zu chronischen Muskelkontraktionen. Die durch die Immunisierung gebildeten hochaffinen Antikörper im Serum wirken neutralisierend und verhindern so die Bindung des Toxins (Ershler 1982). Da in Deutschland nahezu jeder Mensch gegen Tetanus geimpft ist, war es möglich das Blut normaler Blutspender zu untersuchen. Dieses Kollektiv von untersuchten Personen repräsentiert eine Immunantwort, die schon länger abgeschlossen ist und bei der sich kein oder wenig persistierendes Antigen im Organismus befindet. Um Gedächtnis B-Zellen mit Spezifität für Tetanus Toxin anzureichern, zu detektieren und zu charakterisieren, wurde das in Bakterien

rekombinant hergestellte und nicht toxische C-Fragment des Tetanus Toxin (rTT.C) benutzt.

Es wurden ebenfalls Allergen-spezifische Gedächtnis B-Zellen bei Patienten mit Allergie gegen Wespengift untersucht. Von einer Allergie redet man bei einer Überreaktion des Immunsystems gegen ein ungefährliches, fremdes Antigen, dem Allergen (Lichtenstein 1993). Im Fall der Insektengiftallergien werden Antikörper des Isotyps IgE gegen Bestandteile des Giftes gebildet. Bei der Allergie gegen Wespengift spielen Antikörper gegen Phospholipase A₁B (PLA₁B) und Hyaluronidase eine dominierende Rolle (Hoffmann 1994). Diese Antikörper binden an Rezeptoren auf basophilen Granulozyten und Mastzellen, die spezifisch die konstante Region des IgE binden (Fcε-Rezeptoren). Bei einem Insektenstich kommt es durch die Bindung des Allergens an die Antikörper zu einer Quervernetzung der IgE-Moleküle, die an die Fcε-Rezeptoren gebunden haben. Dadurch werden die basophilen Granulozyten und Mastzellen aktiviert, vorgebildete Mediatoren wie Histamin auszuschütten, welche unter anderem eine starke Erweiterung der Blutgefäße auslösen (Zweiman 1993). Dies kann zu einem systemischen Schock führen, unter Umständen sogar zum Tod des Betroffenen. Bei Behandlungen von Insektengiftallergien versucht man seit einiger Zeit mittels einer Hyposensibilisierung des Patienten mit dem jeweiligen Insektengift eine Toleranz gegen das Allergen zu induzieren (Valentine 1990, Frew 1994).

In dieser Arbeit wurden PLA₁B-spezifische B-Zellen aus Blut von Patienten angereichert und untersucht, die sich in regelmäßigen Abständen einer solchen Hyposensibilisierung mit Wespengift unterzogen. Die Patienten wurden in regelmäßigen Abständen von ein bis drei Monaten mit Wespengift immunisiert und jeweils vor der nächsten Immunisierung wurde ihnen Blut entnommen. Hier war es also möglich eine Wiederholungsimmunisierung nach definierter Zeit zu analysieren bei denen man davon ausgehen muß, daß sich persistierendes Antigen zumindest in geringen Mengen noch im Organismus befindet. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurde ebenfalls untersucht, ob im Blut von normalen, gesunden Blutspendern B-Zellen mit Spezifität für PLA₁B detektierbar sind.

Zusätzlich wurde die Situation Antigen-spezifischer B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen untersucht. Autoimmunerkrankungen treten auf, wenn

spezifische adaptive Immunreaktionen gegen körpereigene Moleküle gerichtet sind (Rose 1992). Trotz der Selektion und Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten während ihrer Entwicklung kommt es immer wieder zu Autoimmunreaktionen (Goodnow 1991, Hartley 1993, MacLennan 1995). Bei Autoimmunerkrankungen handelt es sich also um chronische Immunantworten, bei denen das Autoantigen ständig vorhanden ist. Die Anwesenheit Isotyp-gewechselter hochaffiner Autoantikörper im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen legt nahe, daß Plasmazellen aus der Keimzentrumsreaktion hervorgehen können (Korganow 1999, Hertl 2000). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei Immunreaktionen gegen Autoantigene Gedächtnis B-Zellen gebildet werden und ob sich diese Autoimmunerkrankungen durch die Anwesenheit autoreaktiver Gedächtnis B-Zellen widerspiegeln. Exemplarisch wurden in dieser Arbeit die Autoimmunerkrankungen Bullöses Pemphigoid und die autoimmune Thyroiditis untersucht.

Das bullöse Pemphigoid ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung, die mit subepidermaler Blasenbildung der Haut einhergeht. Das Serum von Patienten mit bullösem Pemphigoid enthält IgG Autoantikörper mit Spezifität für ein 230 kD großes Autoantigen (BP230), ein intrazelluläres Protein, das zu der Plakin Familie gehört und gegen ein 180 kD großes Autoantigen (BP180), einem Typ XVII Kollagen. Beide Autoantigene sind in den Hemidesmosomen lokalisiert - einer transmembranen Struktur, die an der Verankerung der basalen Keratinozyten an die Basalmembran beteiligt ist (Borradori 1999). Besonders die Autoantikörper gegen das BP180 sollen eine enorme pathogene Relevanz bei dem Verlust der Adhäsion der basalen Keratinozyten an Komponenten der Basalmembran haben (Liu, Z. 1993). BP180 ist ein Typ II Transmembranprotein bestehend aus 1497 Aminosäuren, welches mit dem aminoterminalen Ende in den Hemidesmosomen verankert ist und dessen carboxyterminales Ende in die Basallamina reicht (Hopkinson 1992). Die extrazelluläre Domäne enthält 15 unterbrochene Kollagendomänen, die zwischen einer nichtkollagenösen Membran-proximalen Domäne (NC16A) und einer nichtkollagenösen Membran-distalen Domäne (NC1) liegen (Giudice 1992, Gatalica 1997). Es wurde gezeigt, daß die NC16A Domäne des BP180 viele antigene Stellen enthält, die von IgG Autoantikörpern in den Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid erkannt werden (Giudice 1993, Zillikens 1997) und die Serumtiter der NC16A-spezifischen IgG Autoantikörper korrelieren gut mit der Krankheitsaktivität bei

Patienten mit bullösem Pemphigoid (Schmidt 2000). In dieser Arbeit wurde Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid auf die Anwesenheit von Gedächtnis B-Zellen mit Spezifität gegen eine Domäne des BP180 hin untersucht. Als Antigen wurde das rekombinante Fusionsprotein aus NC16A und Glutathion-S-Transferase (GST-NC16A) verwendet.

Die autoimmune Thyroiditis ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen. Die Autoantikörper bei dieser Erkrankung sind gegen eines oder mehrere der thyroiden Antigene Thyroglobulin, Thyroid Peroxidase (TPO) und dem Thyroid stimulierenden Hormonrezeptor gerichtet (Weetman 1994). Thyroide Autoimmunität kann klinisch in zwei große Unterklassen aufgeteilt werden: (a) Überfunktion der Schilddrüse aufgrund von Graves Erkrankung (in Deutschland auch Basedow genannt) oder (b) Unterfunktion der Schilddrüse aufgrund atrophischer Thyroiditis oder Hashimoto Thyroiditis. Bei beiden Arten autoimmuner Thyroiditis können IgG Autoantikörper gegen Thyroglobulin und TPO im Serum der meisten Patienten nachgewiesen werden, wogegen IgG Autoantikörper gegen den Thyroid stimulierenden Hormonrezeptor nur bei Patienten mit Graves Erkrankung nachgewiesen werden können (Weetman 1994). Die Sequenzierungen der Gene für Autoantikörper mit Spezifität für Schilddrüsenantigene von Zellen aus dem peripheren Blut, Schilddrüsengewebe und drainierenden Lymphknoten von Patienten mit autoimmuner Thyroiditis, zeigen Hinweise auf somatische Hypermutation und deuten somit auf eine durchlaufende Keimzentrumsreaktion hin. Ob diese Gene allerdings von Plasmazellen, Gedächtnis B-Zellen oder von Zellen aus dem Keimzentrum stammen, ist vollkommen unklar (McIntosh 1998).

Da die Analyse Antigen-spezifischer B-Zellen durch ihre niedrige Frequenz im Blut erschwert ist, wurde zunächst eine Methode entwickelt, die es erlaubt, mittels immunomagnetischer Anreicherung und Multiparameter-Durchflußzytometrie seltene Antigen-spezifische B-Zellen im Blut nachzuweisen, zu quantifizieren und zu charakterisieren (Leyendeckers 1999, Leyendeckers 2000). In einer ersten magnetischen Trennung wurden B-Zellen unter Verwendung von ablösbaren paramagnetischen Mikropartikeln, die an monoklonale CD19-Antikörper gekoppelt sind, aus Vollblut oder aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert.

Antigen-spezifische B-Zellen wurden dann aus diesen angereicherten B-Zellen unter Zuhilfenahme von Antigen-gekoppelten Magnetpartikeln isoliert. Hier konnte man sich die Tatsache, daß jede B-Zelle den von ihr hergestellten Antikörper als Antigen-Rezeptor auf der Oberfläche trägt, zunutze machen. Die angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen wurden durchflußzytometrisch quantifiziert und phänotypisiert. Die Spezifität der angereicherten Zellen wurde durch die Analyse des von ihnen, nach Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen in einem in vitro Kultursystems unter limitierender Verdünnung, produzierten Antikörpers mit mehreren Methoden wie ELISA, Western Blot Analyse und Immunofluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten nachgewiesen.

Um eine Korrelation zwischen der Frequenz von Antigen-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen im peripheren Blut und dem Antigen-spezifischen IgG im Serum der einzelnen Spender zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse dieser beiden Parameter durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer

PBS (pH 7,2):	137 mM Natriumchlorid 2,6 mM Kaliumchlorid 8,1 mM di-Natriumhydrogenphosphat 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
PBS/EDTA:	PBS, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure
PBS/EDTA/BSA:	PBS/EDTA, 5% Rinderserumalbumin
PBS/EDTA/BSA/Tween 20:	PBS/EDTA/BSA, 0,05% Tween 20
PBS/EDTA/NaN ₃ :	PBS/EDTA, 0,05% Natriumazid
0,1 M NaHCO ₃ pH 9,3:	0,1 M Natriumhydrogencarbonat
PE-Kopplungspuffer pH 6,8:	50mM Natriumchlorid 0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure

2.2 Zellen

2.2.1 Peripheres Blut

Leukozytenreiches Blut (Buffy-Coat) von normalen Blutspendern wurde von der Blutbank des städtischen Krankenhauses in Köln-Merheim bezogen.

Vollblut von Patienten mit einer Allergie gegen Wespengift sowie Vollblut von Patienten mit bullösem Pemphigoid wurde durch die Zusammenarbeit mit Privatdozent Dr. Nicolas Hunzelmann (Abteilung für Dermatologie, Universität zu Köln, Deutschland) erhalten.

Vollblut von Patienten mit autoimmuner Thyroiditis wurde von Dr. Eberhard Voth und Prof. Dr. Harald Schicha (Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universität zu Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Präparation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

50 - 75 ml Buffy-Coat von gesunden Blutspendern oder 20 – 40 ml Vollblut von Patienten wurde 35 min bei 400 x g zentrifugiert. Die weiße Zellschicht oberhalb der Erythrozyten wurde in PBS/EDTA verdünnt und auf Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geschichtet. Dieser Dichtegradient wurde

35 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation befanden sich die PBMC in der Interphase. Diese Interphase wurde abgenommen, die Zellen in PBS/EDTA aufgenommen und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal durchgeführt um restliches Ficoll-Hypaque und Thrombozyten zu entfernen.

2.3 Verwendete Antigene

Das rekombinant in Bakterien hergestellte rTT.C wurde von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Aufgereinigte PLA₁B aus Wespengift wurde uns freundlicherweise von Dr. Michael Spangfort von ALK (Horsholm, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Aufgereinigtes PLA₂ aus Bienengift wurde von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

Das rekombinant in Escherichia coli DH5 α hergestellte GST-NC16A wurde uns freundlicherweise von Dr. Lena Bruckner-Tudermann (Abteilung für Dermatologie, Universität Münster, Deutschland), beziehungsweise von Dr. Nicolas Hunzelmann zur Verfügung gestellt. GST wurde ebenfalls von Dr. Nicolas Hunzelmann zur Verfügung gestellt.

Das rekombinant in Insektenzellen hergestellte TPO wurde von Diarect (Freiburg, Deutschland) bezogen.

2.4 Kopplungsmethoden

Den im folgenden beschriebenen Methoden zur Kopplung von Antigenen ist gemeinsam, daß auf der Seite des Antigens primäre Aminogruppen, wie die des Lysins, an der Kopplungsreaktion direkt oder indirekt über Derivatisierung beteiligt sind. Aus diesem Grund darf der Reaktionsansatz keinerlei andere Amine, wie Natriumazid oder Tris(hydroxymethyl)-aminoethan enthalten.

2.4.1 Kopplung von Antigenen an Magnetpartikel

Magnetpartikel werden über den bifunktionalen N-hydroxysuccinimidester Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclo-hexan-1-carboxylat (SMCC) kovalent an Proteine gebunden (Miltenyi 1990, Kato 1993, Irsch 1995, Kantor 1998). Der NHS-Esterrest des SMCC reagiert mit den primären Aminogruppen auf den Magnetpartikeln und bildet stabile Amidverbindungen. Bei den Antigenen werden zunächst mittels 2-Iminoethanol Hydrochlorid an den primären Aminen

Sulhydrylgruppen eingeführt, mit denen die Maleimidgruppe des SMCC bei einem pH-Wert von 6,5 – 7,5 reagiert.

An Magnetpartikel wurde rTT.C, PLA₁B, GST-NC16A, GST, TPO und PLA₂ gekoppelt.

Die Antigene wurden über eine Nap5-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) in PBS/EDTA umgepuffert und in einem Volumen von 0,5 bis 1 ml aufgefangen. Dazu wurde 10 µl 2-Iminoethanol Hydrochlorid (50 mg/ml, Sigma-Aldrich) gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die aktivierten Antigene über eine PD10-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) in mehreren Fraktionen vom Iminoethanol abgetrennt und in PBS/EDTA umgepuffert. Mit SMCC aktivierte Magnetpartikel wurden freundlicherweise von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Antigene wurden auf Konzentrationen entsprechend ihres Molekulargewichtes eingestellt, zu den aktivierten Magnetpartikeln gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 50 mM Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 30 µl N-ethylmaleimid (Sigma-Aldrich; 4 mg/ml DMF) gestoppt und die Antigen-Magnetpartikel nacheinander über zwei Magnetseparationssäulen von freiem, nicht gekoppeltem Antigen, abgetrennt. Die Antigen-Magnetpartikel wurden auf eine Konzentration anhand der Lichtabsorption bei 450 nm von 10 (OD₄₅₀ = 10) eingestellt, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

2.4.2 Kopplung von Antigenen an Phycoerythrin

Das Phycobiliprotein R-Phycoerythrin (PE) wurde ebenfalls mittels SMCC kovalent an die Antigene gebunden. Hier reagiert das NHS-Esterende des SMCC mit den primären Aminogruppen des PE und die Maleimidgruppe mit den Sulhydrylgruppen der Antigene, die zuvor mittels 2-Iminoethanol eingeführt wurden.

An PE wurde rTT.C, PLA₁B, GST-NC16A und TPO gekoppelt.

1 mg PE (Cyanotech Corporation, Kaila-Kona, Hawaii, USA) wurde in PE-Kopplungspuffer gelöst, 14 µl SMCC (Pierce, Rockford, IL, USA; 1 mg/100 µl in DMF, Sigma-Aldrich) zugegeben und 1h bei RT inkubiert. Über eine PD10-Gelfiltrationssäule wurde das PE-SMCC Konjugat von freiem SMCC abgetrennt. Die Antigene wurden, wie oben beschrieben, mit 2-Iminoethanol aktiviert und über eine Nap5-Gelfiltrationssäule in PE-Kopplungspuffer umgepuffert. Die Antigene wurden in

einem molaren Verhältnis von 1 : 2,5 (Antigen : PE) zu dem aktivierten PE gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 50 mM Mercaptoethanol und 30 µl N-ethylmaleimid (4 mg/ml in DMF) gestoppt. Die Antigen-PE Konjugate wurden über eine PD10-Gelfiltrationssäule zur Lagerung in PBS/EDTA/NaN₃ umgepuffert, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

2.4.3 Kopplung von Biotin an Antigen

Bei der Konjugation von Biotin an Antigene reagieren N-Hydroxysuccinimidester des Biotins mit primären Aminogruppen des Proteins. Hierbei handelt es sich um einen nukleophilen Angriff eines deprotonierten Amins auf eine Esterbindung, Verdrängung des N-Hydroxysuccinimids und Bildung einer Amidbindung. Diese nukleophile Substitution wird durch einen alkalischen pH begünstigt, da dieser die deprotonierte Form der Aminogruppen stabilisiert.

Mit Biotin wurden rTT.C, PLA₁B, GST-NC16A und TPO gekoppelt.

Die Antigene wurden über eine Nap5-Gelfiltrationssäule in 0,1 M NaHCO₃ pH 9,3 umgepuffert und in einem Volumen von 0,5 bis 1 ml aufgefangen. Dazu wurde 15 µl Biotin-N-hydroxysuccinimidester (Pierce; 10 mg/ml in DMSO) gegeben und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Biotin-Konjugate wurden anschließend über eine PD10-Gelfiltrationssäule von freiem, nicht konjugiertem Biotin-N-hydroxysuccinimidester abgetrennt (in PBS/EDTA/NaN₃), aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

2.5 Magnetische Zellsortierung

Zur Anreicherung Antigen-spezifischer Gedächtnis B-Zellen aus humanem peripherem Blut wurde das magnetische Zelltrennsystem MACS (Miltenyi Biotec GmbH) (Miltenyi 1990) verwendet. Hierbei werden Zellen direkt oder indirekt mit superparamagnetischen Mikropartikeln, die an Antigene oder Antikörper gebunden sind, markiert. Die markierten Zellen werden auf einer Stahlkugelmatrix-Säule in einem Hochgradienten-Magnetfeld zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen die Säule ungehindert passieren. Anschließend werden die markierten Zellen außerhalb des Magnetfeldes von der Säule eluiert.

Durch gleichzeitige fluoreszente Markierung der Zellen kann die Separation mittels Durchflußzytometrie kontrolliert werden.

2.5.1 Anreicherung von CD19⁺ B-Zellen

In 15 ml Reaktionsgefäßen wurden PBMC in 800 µl PBS/EDTA/BSA pro 4×10^8 Zellen resuspendiert, je 200 µl CD19 Multisort Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH) pro 4×10^8 Zellen zugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS/EDTA/BSA gewaschen (300 x g für 10 min), der Überstand abgenommen und die PBMC in 2 ml PBS/EDTA/BSA pro 4×10^8 Zellen resuspendiert.

Zur magnetischen Anreicherung der markierten CD19⁺ B-Zellen wurde eine LS-Säule (Miltenyi Biotec GmbH) mit 5 ml PBS/EDTA/BSA äquilibriert. Anschließend wurde im magnetischen Feld eines MidiMACS (Miltenyi Biotec GmbH) die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Unmarkierte Zellen wurden mit 5 x 2 ml PBS/EDTA/BSA von der Säule gewaschen und als negative Fraktion aufgefangen. Die markierten CD19⁺ B-Zellen wurden anschließend außerhalb des Magnetfeldes mit 10 ml PBS/EDTA/BSA als positive Fraktion von der Säule eluiert.

Die positive Fraktion wurde abzentrifugiert, in 980 µl PBS/EDTA/BSA resuspendiert, 20 µl Release-Reagenz (Miltenyi Biotec GmbH) zugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS/EDTA/BSA gewaschen und in 250 µl PBS/EDTA/BSA resuspendiert. Zur Abtrennung der verbliebenen magnetisch markierten CD19⁺ B Zellen wurde eine MS-Säule (Miltenyi Biotec GmbH) mit 2 ml PBS/EDTA/BSA äquilibriert. Anschließend wurde im magnetischen Feld eines MiniMACS (Miltenyi Biotec GmbH) die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Zellen wurden mit 4 x 250 µl PBS/EDTA/BSA von der Säule gewaschen und die Separation mittels Durchflußzytometer überprüft.

2.5.2 Magnetische Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen

Es wurden B-Zellen mit Spezifität für rTT.C, PLA₁B, NC16A und TPO magnetisch angereichert. Zur Kontrolle unspezifischer Hintergrundfärbung wurden Separationen mit GST- und PLA₂-gekoppelten Magnetpartikeln durchgeführt.

Die vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen wurden in 80 µl PBS/EDTA/BSA resuspendiert und mit 20 µl Antigen-gekoppelten Magnetpartikeln für 15 min bei 4°C inkubiert. Die direkte oder indirekte fluoreszente Markierung der Zellen erfolgte im Anschluß durch Zugabe der entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper und Antigene für 10 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in

0,5 ml PBS/EDTA/BSA resuspendiert. Für die spätere durchflußzytometrische Analyse und zur Zellzahlbestimmung in der Ausgangsfraction wurden 20 µl der Zellsuspension vor der Separation abgenommen. Zur magnetischen Anreicherung der markierten Antigen-spezifischen B-Zellen wurden zwei MS-Säulen mit 2 ml PBS/EDTA/BSA äquilibriert. Im magnetischen Feld eines MiniMACS wurde die Zellsuspension auf die erste MS-Säule aufgetragen. Unmarkierte Zellen wurden mit 4 x 0,5 ml PBS/EDTA/BSA von der Säule gewaschen und als erste negative Fraction aufgefangen. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurden die auf der Säule verbliebenen Zellen mit 1 ml PBS/EDTA/BSA auf eine zweite MS-Säule im Magnetfeld eluiert. Erneut wurden die ungebundenen Zellen mit 3 x 0,5 ml PBS/EDTA/BSA von der Säule gewaschen und als zweite negative Fraction aufgefangen. Die markierten Antigen-spezifischen B-Zellen wurden außerhalb des Magnetfeldes mit 0,5 ml PBS/EDTA/BSA als positive Fraction von der Säule eluiert. Die Separation wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft und die Zellzahl in allen Fractionen durchflußzytometrisch bestimmt.

2.5.3 Magnetische Anreicherung PLA₁B bindender basophiler Granulozyten

Für die magnetische Anreicherung PLA₁B bindender basophiler Granulozyten aus Blut von Patienten mit Allergie gegen Wespengift, wurden 10⁷ PBMC in 80 µl PBS/EDTA/BSA resuspendiert und mit 20 µl PLA₁B-gekoppelten Magnetpartikeln für 15 min bei 4°C inkubiert. Die magnetische Separation wurde, wie oben beschrieben, mittels einer MS-Säule und eines MiniMACS durchgeführt.

2.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die durchflußzytometrische Analyse wurden die Zellen direkt oder indirekt mit Fluorochrom- bzw. Hapten-gekoppelten Antikörpern und Antigenen markiert. Die optimale Färbekonzentration der an Fluorochrom- und Hapten-konjugierten monoklonalen Antikörper wurde mit PBMC aus Blut von Normalspendern ermittelt. Alle verwendeten Konjugate ergaben bei einer Antikörperkonzentration von 1 – 5 µg/ml maximale Färbintensität mit minimaler Hintergrundfärbung. Die monoklonalen Antikörper CD80-PE (Klon L307.4, Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA), CD38-Cychrome (Klon HIT2, Pharmingen), CD14-PerCP (Klon MφP9, Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA) wurden nach Herstellerangaben in einer Verdünnung von 1 : 5 eingesetzt. Die optimale Färbekonzentration der Fluorochrom-

und Hapten-konjugierten Antigene wurde mit PBMC aus Blut der entsprechenden Patienten ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung der magnetisch isolierten Zellen fand entweder vor der Zellseparation oder in geeigneten Aliquots nach der Trennung der Zellen statt. Dabei wurden die Zellen in einem Volumen von 100 µl PBS/EDTA/BSA resuspendiert. Anschließend wurden die entsprechenden Fluorochrom-Konjugate zugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. Bei allen Analysen wurde eine Propidiumiodid (PI)-Färbung zum Ausschluß toter Zellen verwendet.

2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung CD19⁺ B Zellen

Um die Separation CD19⁺ B Zellen zu kontrollieren, wurden Proben der einzelnen Fraktionen nach der magnetischen Separation mit CD19-PE (Klon SJ25-C1, Cymbus, Hampshire, Großbritannien) gefärbt.

2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung rTT.C-spezifischer B-Zellen

Für die durchflußzytometrische Detektion, Analyse und Immunophänotypisierung rTT.C-spezifischer Zellen wurden die Zellen mit folgenden Fluorochrom-Konjugaten markiert: rTT.C-PE, anti human IgD-FITC (Klon TA 4.1, Becton Dickinson), anti human IgG-FITC (Klon JDC-10, SBA, Birmingham, AL, USA), CD5-FITC (Klon CLB-T1/1, CLB, Amsterdam, Niederlande), CD10-FITC (Klon W8E7, Becton Dickinson), CD23-FITC (Klon 9P25, Immunotech, Marseilles, Frankreich), CD38-FITC (Klon T16, Immunotech), CD44-FITC (Klon IM7, freundlicherweise von Dr. J. Moll, Karlsruhe, Deutschland zur Verfügung gestellt), CD62L-FITC (Klon 145.bl, freundlicherweise von Dr. A. Thiel, Berlin, Deutschland zur Verfügung gestellt), CD77 (Klon 38.13, Immunotech), anti Ratte IgM-FITC (Klon MARM-4, Serotech, Oxford, Großbritannien), CD80-FITC (Klon MAB104, Immunotech) und CD86-FITC (Klon IT2.2, Pharmingen).

2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung PLA₁B-spezifischer B-Zellen

Für die durchflußzytometrische Detektion, Analyse und Immunophänotypisierung PLA₁B-spezifischer Zellen wurden die Zellen mit folgenden Fluorochrom-Konjugaten markiert: PLA₁B-PE, Streptavidin-CyChrome (Pharmingen), CD9-Biotin (Klon M-L13, Pharmingen), anti human IgG-FITC (Klon JDC-10), anti human IgG1-FITC (Klon

JDC-1, SBA), anti human IgG4-FITC (Klon AC3-BB2, SBA) und anti human IgE-FITC (Klon G7-18, Pharmingen).

2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung PLA₁B-bindender Granulozyten

Für die durchflußzytometrische Detektion PLA₁B-bindender Granulozyten wurden die Zellen mit PLA₁B-PE und anti human IgE-FITC (Klon G7-18) markiert.

2.6.5 Immunfluoreszenzfärbung NC16A-spezifischer B-Zellen

Für die durchflußzytometrische Detektion, Analyse und Immunophänotypisierung NC16A-spezifischer Zellen wurden die Zellen mit folgenden Fluorochrom-Konjugaten markiert: GST-NC16A-PE, GST-NC16A-Biotin, Streptavidin-PE (SBA), CD14-PerCP (Klon M ϕ P9), CD38-APC (Klon HB-7, Becton Dickinson), anti IgG-FITC (Klon JDC-10 und Klon TM15, Serotech), anti IgD-APC (Klon TA 4.1), anti IgG1-FITC (Klon JDC-1), anti IgG4-FITC (Klon AC3-BB2) und anti CLA-FITC (Klon HECA-452, freundlicherweise von Dr. E. Butcher, Abteilung für Pathologie, Stanford Universität, Palo Alto, Kalifornien, USA zur Verfügung gestellt).

2.6.6 Immunfluoreszenzfärbung TPO-spezifischer B-Zellen

Für die durchflußzytometrische Detektion, Analyse und Immunophänotypisierung TPO-spezifischer Zellen wurden die Zellen mit folgenden Fluorochrom-Konjugaten markiert: TPO-Biotin, Streptavidin-PE, anti Biotin-APC (Klon Bio3-18E7.2, Miltenyi Biotec GmbH), CD14-PerCP (Klon M ϕ P9), CD38-CyChrome (Klon HIT2), CD80-PE (Klon L307.4), anti IgG-FITC (Klon JDC-10 und Klon TM15) und anti IgD-APC (Klon TA 4.1).

2.7 Durchflußzytometrische Analyse

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein FACScalibur (Becton Dickinson) mit luftgekühltem Argonlaser verwendet. Die Prinzipien dieser Methode sind bei Radbruch (Radbruch 1992) ausführlich beschrieben. Es werden hierbei gleichzeitig Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen gemessen. Die gefärbten Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander einen Laserstrahl. Die Zellen streuen das auftreffende Licht. Das in spitzem Winkel (3 - 10°) gestreute Licht wird als „Vorwärtsstreulicht“ bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße, während das um 90° reflektierte Licht als „Seitwärtsstreulicht“ bezeichnet wird und mit der Granularität

der Zellen korreliert. Die Anregung der an die Zellen gebundenen Antikörper-Fluorochrom-Konjugate bei unterschiedlicher Wellenlänge ermöglicht eine weitere Analyse der Zellen. Als Fluorochrome wurden FITC (FL1), PE (FL2), CyChrome, PerCP, PI (alle drei FL3), Cy5 und APC (beide FL4) verwendet.

Die Proben wurden in geeigneten Verdünnungen im Durchflußzytometer analysiert, und so Meßwerte von bis zu 200.000 Zellen je Probe erhalten, die gespeichert und mit der Cellquest Research Software (Becton Dickinson) analysiert wurden. Für die Auswertung wurden sie entweder als eindimensionale Histogramme oder als zweidimensionale Punktbilder dargestellt.

2.7.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahl in einer Probe

Um die Frequenz Antigen-spezifischer B Zellen in PBMC zu bestimmen, wurde die Anzahl der Zellen in jeder Probe durchflußzytometrisch ermittelt. Aufgrund der konstanten Durchflußraten ($\mu\text{l/s}$) des Durchflußzytometers können die absoluten Zellzahlen einer Probe bestimmt werden. Die Zellzahl errechnet sich aus dem Probenvolumen (μl), der Durchflußrate ($\mu\text{l/s}$) und der durchschnittlichen Zellrate (n/s) wie folgt: $\text{Zellzahl} = \text{Probenvolumen } (\mu\text{l}) \times (\text{Zellrate } (n/s) / \text{Durchflußrate } (\mu\text{l/s}))$

Die Durchflußraten des Zytometers wurden mit Proben, die definierte Zellkonzentrationen enthielten, nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Durchflußrate } (\mu\text{l/s}) = \text{Zellrate } (n/s) / \text{Zellkonzentration } (n/\mu\text{l})$$

Durch die Ermittlung der Zellzahl in jeder Probe konnte anschließend die Frequenz der Antigen-spezifischen B Zellen in der Ausgangsprobe berechnet werden.

2.8 Humane B-Zellkultur

Um die Spezifität der angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen nachweisen zu können, wurden die Zellen unter Bedingungen der limitierenden Verdünnung (LD-Kultur) zur Expansion, Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-sekretierenden Zellen angeregt. Dabei wurden die angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen zusammen mit bestrahlten (5000 rds) EL4-B5 Mausthyomazellen (freundlicherweise von R.H. Zubler, Genf, Schweiz zur Verfügung gestellt) in 96-Loch Zellkulturplatten (Corning Costar, Acton, Massachusetts, USA) kultiviert. B-Zellen und EL4-B5 Zellen wurden in einem Volumen von 200 μl in folgendem Medium kultiviert: RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Großbritannien), 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Life Technologies), 1 mM L-alanyl-glutamin (Life Technologies),

10 mM HEPES (Life Technologies), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Life Technologies), 0,05 mM 2-Mercaptoethanol (Life Technologies) und 10% Überstand einer gemischten T-Zell und Monozyten-Kultur, die mit Phytohämagglutinin (PHA, 5 µg/ml, Sigma-Aldrich) und Phorbolmyristatacetat (PMA, 10 ng/ml, Sigma-Aldrich) stimuliert wurden.

Der Überstand dieser gemischten T-Zell und Monozyten-Kultur wurde folgendermaßen hergestellt: T-Zellen und Monozyten wurden aus PBMC von normalen Blutspendern mit Hilfe des T-Zell Isolationskits (Miltenyi Biotec GmbH) und des Monozyten Isolationskits (Miltenyi Biotec GmbH) isoliert und 48 h getrennt voneinander in oben genanntem Medium kultiviert. Anschließend wurden die T-Zellen zu den Monozyten gegeben und das Zellgemisch zusammen mit PHA und PMA für weitere 36 h kultiviert. Der Überstand wurde danach bei 400 x g für 10 min zentrifugiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.9 Detektion von Antigen-spezifischen Immunglobulinen

Zur Detektion des in der humanen B-Zellkultur sekretierten spezifischen Antikörpers wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Spezifität von rTT.C-, PLA₁B-, NC16A- und TPO-spezifischen B-Zellen wurde mittels Antigen-spezifischem ELISA überprüft. Die Spezifität von NC16A-spezifischen B-Zellen wurde zusätzlich im Western Blot getestet wie auch durch Färbung von humanen Hautschnitten für das native Autoantigen BP180. Die Spezifität der sezernierten Antikörper TPO-spezifischer B-Zellen wurden im ELISA nicht nur für das rekombinante TPO überprüft, sondern auch für aufgereinigtes, natives TPO aus Schilddrüsengewebe.

2.9.1 ELISA

Die Konzentrationen von Antigen-spezifischem IgG und IgE in humanem Serum oder Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt (Engvall 1972). Für die Quantifizierung von rTT.C-, PLA₁B-, NC16A- und TPO-spezifischem IgG aus Zellkulturüberständen und von rTT.C- und PLA₁B-spezifischem IgG aus Spenderseren wurden ELISA-Platten (Greiner, Solingen, Deutschland) mit dem jeweiligen Antigen beschichtet, freie Bindungsflächen mit BSA abgesättigt und anschließend mit den Zellkulturüberständen bzw. Seren inkubiert. Gebundenes IgG wurde mit biotiniliertem Ziege anti-human IgG F(ab')₂ (SBA) detektiert. Die Messung der Menge des gebundenen Antikörpers wurde durch Inkubation mit Streptavidin-konjugierter

alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) und Substrat (4-nitrophenylphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland) ermöglicht. Zur Konzentrationsbestimmung des rTT.C-spezifischen IgG wurde Tetagam N (Behring, Marburg, Deutschland) als Standard und als Positivkontrolle verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung von PLA₁B-, NC16A- und TPO-spezifischen IgG wurden serielle Verdünnungen des Serums von Spendern mit hohen Serumtitern von Immunglobulinen spezifisch für das entsprechende Antigen als Standard und als Positivkontrolle verwendet. Die Konzentrationen der Antikörper wurden anschließend im Vergleich zum Standardserum berechnet.

Die Bestimmung des NC16A-spezifischen IgG in den Patientenseren wurde freundlicherweise von Dr. Cassian Sitaru im Labor von Dr. Detlef Zillikens an der Universität Würzburg, Deutschland, durchgeführt. Für die Quantifizierung von NC16A-spezifischen IgG aus Patientenseren (Zillikens 1997, Schmidt 2000) wurden ELISA-Platten mit GST-NC16A oder GST beschichtet, freie Bindungsflächen mit BSA abgesättigt und anschließend mit den in PBS/EDTA/BSA/Tween 20 1:100 verdünnten Seren inkubiert. Gebundenes IgG wurde mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertem Ziege anti-human IgG Antikörper (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, Maryland, USA) detektiert. Die optische Dichte (OD) der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Jedes Serum wurde in Triplikaten auf seine Reaktivität gegen GST-NC16A und GST alleine untersucht. Der sich hieraus ergebene Mittelwert der Reaktivität gegen GST wurde vom Mittelwert der Reaktivität gegen GST-NC16A abgezogen. Um die Variabilität von Platte zu Platte zu minimieren, wurden die jeweils 4 gleichen internen Kontrollen mit gemessen.

Für die Quantifizierung von TPO-spezifischem IgG aus Kulturüberständen mit Spezifität für das aufgereinigte TPO aus Schilddrüse wurden ELISA-Kits von Euroimmun (Lübeck, Deutschland) verwendet, wobei die 96-Lochplatten mit dem nativen Antigen beschichtet waren. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Quantifizierung von TPO-spezifischen IgG aus Patientenseren mit Spezifität für das rekombinante TPO wurden ELISA-Kits von Euroimmun verwendet und der ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um rTT.C- und PLA₁B-spezifisches IgE zu bestimmen, wurden ELISA-Platten mit Maus anti-human IgE Antikörper (Klon G7-18, Pharmingen) beschichtet, mit BSA

freie Bindungsstellen abgesättigt und anschließend mit Zellkulturüberständen inkubiert. Gebundenes IgE wurde mit biotiniliertem rTT.C oder PLA₁B detektiert.

2.9.2 Western Blot Analyse

Die Bestimmung des NC16A-spezifischen IgG in den Kulturüberständen und Patientenseren mittels Western Blot Analyse wurde freundlicherweise im Labor von Dr. Nicolas Hunzelmann durchgeführt. Dazu wurde GST-NC16A unter reduzierenden Bedingungen durch ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotec) transferiert und mit den Kulturüberständen (1:20 verdünnt) oder Patientenseren (1:100 – 1:200 verdünnt) inkubiert. Gebundenes IgG wurde mit HRP-konjugiertem Schwein anti-human Antikörper (Dako Corp., Carpinteria, Kalifornien, USA) detektiert. Die HRP-Reaktion wurde mittels Chemiluminiszenz-Detektionsreagenzien (Amersham Pharmacia Biotec) sichtbar gemacht.

2.9.3 Färbung humaner Hautschnitte

Der Nachweis der Spezifität des NC16A-spezifischen IgG gegen natives BP180 in den Kulturüberständen mittels Färbung von humanen Hautschnitten wurde freundlicherweise im Labor von Dr. Nicolas Hunzelmann durchgeführt.

Dazu wurden Sektionen humaner Haut mit 1 M NaCl für 48h bei 4°C inkubiert (Gammon 1992), anschließend mit PBS/BSA/1% Ziegenserum gewaschen und mit den Kulturüberständen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Seren von normalen Blutspendern verwendet und als Positivkontrolle Seren von Patienten mit Bullösem Pemphigoid. Gebundenes IgG wurde mit FITC-konjugiertem Ziege anti-human IgG Antikörper (Dako Corp.) detektiert. Aus den gefärbten Hautsektionen wurden mikroskopische Präparate hergestellt und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode

3.1.1 Experimentelle Strategie

In Abbildung 1 ist ein schematischer Überblick der entwickelten Methode dargestellt.



Abbildung 1: Experimentelles Schema der magnetischen Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen.

PBMC wurden mit CD19 mAk gekoppelten Magnetpartikeln markiert. CD19⁺ B-Zellen wurden magnetisch mittels einer Säule mit Stahlkugelmatrix in einem Permanentmagneten vorangereichert. Anschließend wurden die magnetischen Partikel enzymatisch abgelöst. In einem zweiten Schritt wurden B-Zellen mit der Spezifität für das entsprechende Antigen über direkte und indirekte Methoden magnetisch markiert und in einer weiteren Separation isoliert.

In einer ersten magnetischen Trennung wurden B-Zellen unter Verwendung von ablösbaren Magnetpartikeln, die an monoklonale CD19 Antikörper (mAk) gekoppelt sind, aus Vollblut oder aus PBMC isoliert. Durch eine enzymatische Spaltung wurden die Magnetpartikel von der Oberfläche der Zellen abgelöst. Antigen-spezifische B-Zellen wurden dann aus diesen vorangereicherten B-Zellen mittels (a) Hapten-markiertem Antigen und anti-Hapten-mAk gekoppelten Magnetpartikeln oder (b)

direkt an Magnetpartikel gekoppeltem Antigen markiert und in einer zweiten magnetischen Trennung isoliert. Die angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen konnten anschließend durchflußzytometrisch unter Verwendung von (a) Hapten-markiertem Antigen und anti-Hapten-Phycoerythrin (PE) oder (b) direkt an PE gekoppeltem Antigen quantifiziert und charakterisiert werden.

3.1.2 Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen

3.1.2.1 Anreicherung von B-Zellen mit Spezifität für rTT.C

Zunächst wurde eine früher entwickelte indirekte Anreicherungsmethode, bei der vorangereicherte CD19⁺ B-Zellen mittels Digoxigenin (Dig)-markiertem rTT.C und anti-Dig mAk gekoppelten Magnetpartikeln markiert und angereichert wurden, getestet. Diese Methode hatte den großen Nachteil, daß für die magnetische und fluoreszente Markierung in beiden Fällen das Hapten Dig benutzt wurde und es dadurch zu einer stärkeren unspezifischen Färbung kam, die für jede Probe individuell mit einer Inhibitionsfärbung kontrolliert werden mußte (Odendahl 1996). Um eine solche Kontrolle obsolet zu machen und eine spezifischere Färbung zu erzielen, wurde eine Markierungsmethode durch direkt an Magnetpartikel gekoppeltes rTT.C entwickelt. Um beide Markierungsstrategien zu vergleichen, wurden rTT.C-spezifische B-Zellen aus $2,5 \times 10^7$ CD19⁺ B-Zellen von 6 normalen gesunden Blutspendern vereinigt und mittels beider Methoden angereichert. Die Reinheiten (6,41% zu 6,39%) und die Zahlen der angereicherten rTT.C-spezifischen B-Zellen (1600 zu 1720) unterschieden sich nicht wesentlich, unabhängig davon ob die direkte oder indirekte Methode angewendet wurde. Dagegen ergab die direkte Färbung mit dem rTT.C-PE ein 15,4-fach stärkeres Signal für die mittlere Fluoreszenzintensität verglichen mit der indirekten Färbung mit rTT.C-Dig und anti-Dig konjugiertem mAk-PE (Abbildung 2). In den weiteren Experimenten wurde daher ausschließlich die direkte Markierungsstrategie mit Antigen-gekoppelten Magnetpartikeln verwendet.

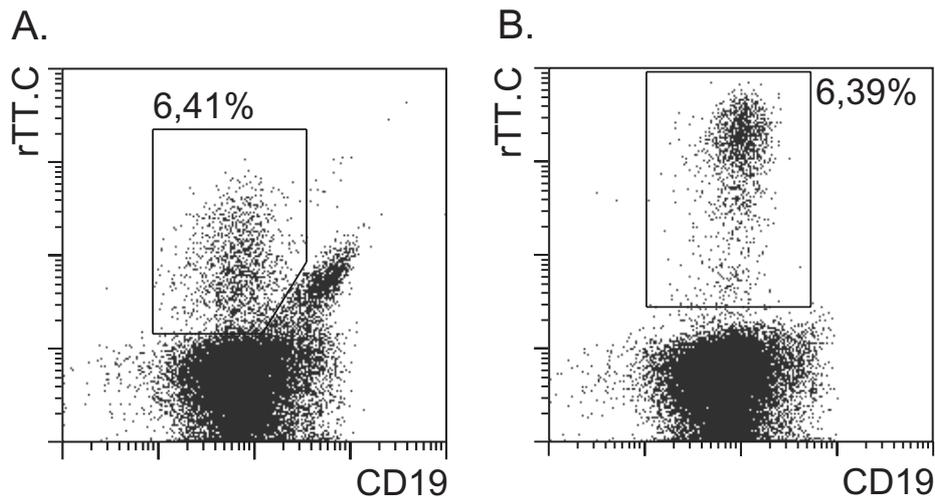


Abbildung 2: Vergleich der indirekten und direkten Methode zur Anreicherung rTT.C-spezifischer B-Zellen.

(A) Indirekte Methode: Das Punktediagramm zeigt eine Zweifarbenanalyse für anti-Dig-PE und CD19-FITC von rTT.C-spezifische B-Zellen, die aus vorangereicherten, CD19⁺ B-Zellen 6 gesunder Blutspender mittels rTT.C-Dig und anti-Dig-Magnetpartikel angereichert wurden. (B) Direkte Methode: Das Punktediagramm zeigt eine Zweifarbenanalyse für rTT.C-PE und CD19-FITC von rTT.C-spezifischen B-Zellen, die aus den CD19⁺ B-Zellen der gleichen Spender mittels rTT.C-Magnetpartikel angereichert wurden. Zelltrümmer, Erythrozyten, Thrombozyten und tote Zellen wurden durch das Definieren eines elektronischen Fensters nach Streulichteigenschaften und auf Grund ihrer Propidiumiodid (PI) Immunofluoreszenz von der Analyse ausgeschlossen.

Die Reinheit der B-Zellen nach Anreicherung mit CD19 mAk gekoppelten Magnetpartikeln wurde durch eine fluoreszente Markierung mit PE-gekoppeltem CD19 mAk und anschließender durchflußzytometrischer Analyse überprüft. Die durchschnittliche Reinheit der CD19⁺ B-Zellen lag bei $97,85 \pm 1,24\%$ in 47 Experimenten, in denen die B-Zellen aus PBMC angereichert wurden. Die Wiederfindungsrate betrug $79,36 \pm 16,31\%$ in 38 Experimenten, in denen sie nach Anreicherung aus PBMC bestimmt wurde. Nach dem Ablösen der Magnetpartikel von der Zelloberfläche wurden die rTT.C-spezifischen B-Zellen aus den vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen durch eine weitere magnetische Anreicherung isoliert. Zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugiertem CD19 mAk und rTT.C-PE markiert. Abbildung 3 zeigt eine typische durchflußzytometrische Analyse rTT.C-spezifischer B-Zellen.

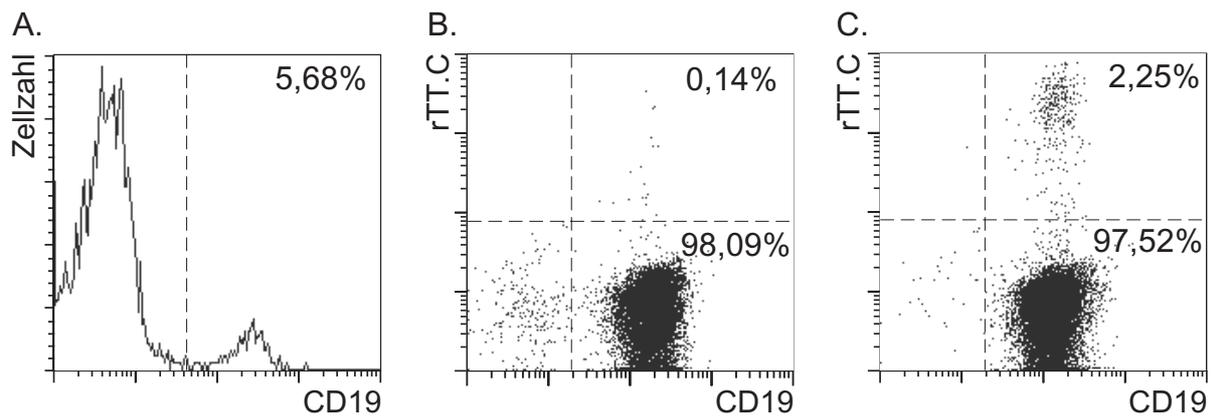


Abbildung 3: Immunomagnetische Anreicherung von rTT.C-spezifischen B-Zellen.

rTT.C-spezifische B-Zellen wurden aus PBMC eines normalen, gesunden Blutspenders angereichert. Histogramm A zeigt eine CD19-PE Markierung von PBMC vor der Separation, Punktediagramm B zeigt eine Zweifarbenanalyse für CD19-FITC und rTT.C-PE von CD19⁺ B-Zellen nach positiver Selektion aus PBMC, und Punktediagramm C zeigt eine Zweifarbenanalyse für CD19-FITC und rTT.C-PE von isolierten rTT.C-spezifischen B-Zellen, die aus vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen separiert wurden. Bei der Analyse wurde ein elektronisches Fenster auf lebende kernhaltige Zellen entsprechend ihrer Streulichteigenschaften und PI Immunofluoreszenz definiert.

3.1.2.2 Anreicherung von B-Zellen mit Spezifität für PLA₁B

Aus Vollblut von Patienten mit Wespengiftallergie oder PBMC von normalen Blutspendern wurden zunächst CD19⁺ B-Zellen mittels magnetischer Separation angereichert. Auch hier wurde die Reinheit der B-Zellen nach der Anreicherung mit CD19-Magnetpartikeln durchflußzytometrisch überprüft. Die durchschnittliche Reinheit der CD19⁺ B-Zellen lag bei $75,38 \pm 13,83\%$, wie in 11 Experimenten ermittelt wurde, in denen die B-Zellen aus Vollblut angereichert wurden. Da die Zahl der B-Zellen in Vollblut nicht exakt determiniert werden kann, konnten keine Wiederfindungsraten für CD19⁺ B-Zellen aus Vollblut bestimmt werden.

Zur Anreicherung und Detektion von PLA₁B-spezifischen B-Zellen wurde aufreinigtes PLA₁B aus Wespengift an Magnetpartikel sowie an PE gekoppelt. Nach Ablösen der Magnetpartikel von der Zelloberfläche wurden vorangereicherte CD19⁺ B-Zellen mit den PLA₁B-Magnetpartikel inkubiert und in einer zweiten magnetischen Separation die PLA₁B-spezifischen B-Zellen isoliert. Zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen mit PLA₁B-PE markiert. Ein Problem stellte die Unterscheidung der PLA₁B-spezifischen B-Zellen von den eventuell mitangereicherten basophilen Granulozyten dar, die PLA₁B-spezifisches IgE mittels ihrer FcεRI Oberflächenrezeptoren binden und so ebenfalls für PLA₁B positiv erscheinen können

(Irsch 1995). Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit Fluorochrom gekoppelten Antikörper mit Spezifität für das CD9 Oberflächenmolekül (CD9-Cychrome) inkubiert. Das CD9 Antigen wird unter anderem auf basophilen Granulozyten, nicht aber auf B-Zellen ausgeprägt und konnte somit zur Diskriminierung verwendet werden. Abbildung 4 zeigt eine typische durchflußzytometrische Analyse PLA₁B-spezifischer B-Zellen.

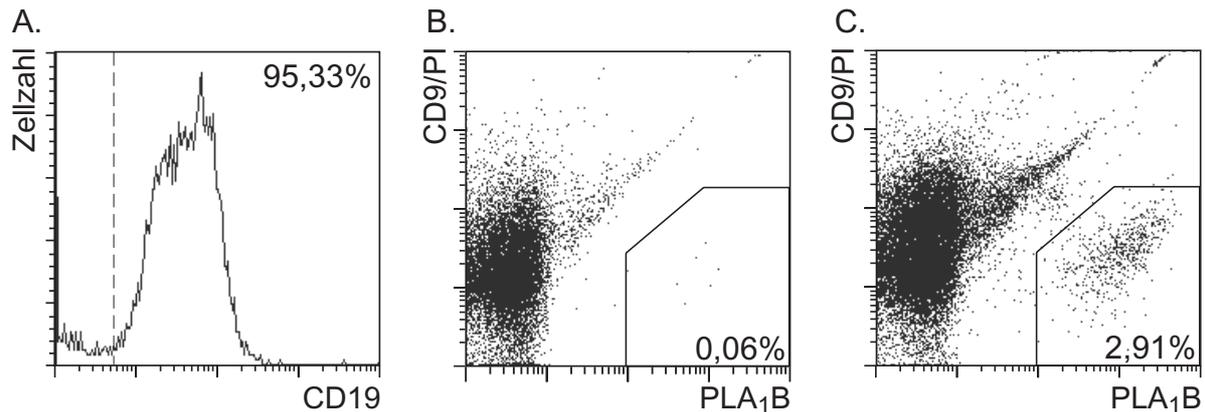


Abbildung 4: Immunomagnetische Anreicherung und Analyse von PLA₁B-spezifischen B-Zellen aus Blut eines Spenders mit Wespengiftallergie.

Histogramm A zeigt die Analyse einer CD19-PE Markierung von angereicherten B-Zellen aus Vollblut, Punktediagramm B zeigt die Analyse einer PLA₁B-PE, CD9-Cychrome und PI-Färbung von CD19⁺ B-Zellen nach Anreicherung, und Punktediagramm C zeigt eine Zweifarbenanalyse für PLA₁B-PE und CD9-Cychrome von isolierten PLA₁B-spezifischen B-Zellen, die aus vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen separiert wurden. Bei der Analyse wurde ein elektronisches Fenster auf lebende, kernhaltige Zellen entsprechend ihrer Streulichteigenschaften und PI Immunofluoreszenz gesetzt.

3.1.2.3 Anreicherung von NC16A-spezifischen B-Zellen

Die Anreicherung von NC16A-spezifischen B-Zellen wurde ebenso nach der beschriebenen Isolationsmethode durchgeführt. Die durchschnittliche Reinheit der CD19⁺ B-Zellen lag in 22 Experimenten, in denen die B-Zellen aus PBMC angereichert wurden, bei $96,78\% \pm 7,43\%$ und bei $86,78\% \pm 3,34\%$, in denen sie aus Vollblut angereichert wurden. Zur Anreicherung von NC16A-spezifischen Gedächtnis B-Zellen wurde GST-NC16A an Magnetpartikel gekoppelt, die Zellen damit markiert und anschließend mittels MACS isoliert. Zunächst wurde das GST-NC16A zur durchflußzytometrischen Detektion der Zellen ebenfalls an PE gekoppelt, jedoch stellte sich in den ersten Experimenten heraus, daß die Helligkeit der Zellen sehr gering war und daher ein Verstärkungssystem benötigt wurde. Aus diesem Grund

wurde in späteren Experimenten biotiniliertes GST-NC16A verwendet und mit Streptavidin-PE detektiert. Zur Unterscheidung zwischen naiven B-Zellen und Gedächtnis B-Zellen wurden die Zellen mit fluoreszent gekoppelten anti IgG Antikörpern und in einigen Fällen zusätzlich mit anti-IgD Antikörpern markiert. Zum Ausschluß kontaminierender Monozyten wurde eine Markierung mit CD14-PerCP benutzt. In Abbildung 5 ist eine durchflußzytometrische Analyse NC16A-spezifischer Gedächtnis B-Zellen dargestellt.

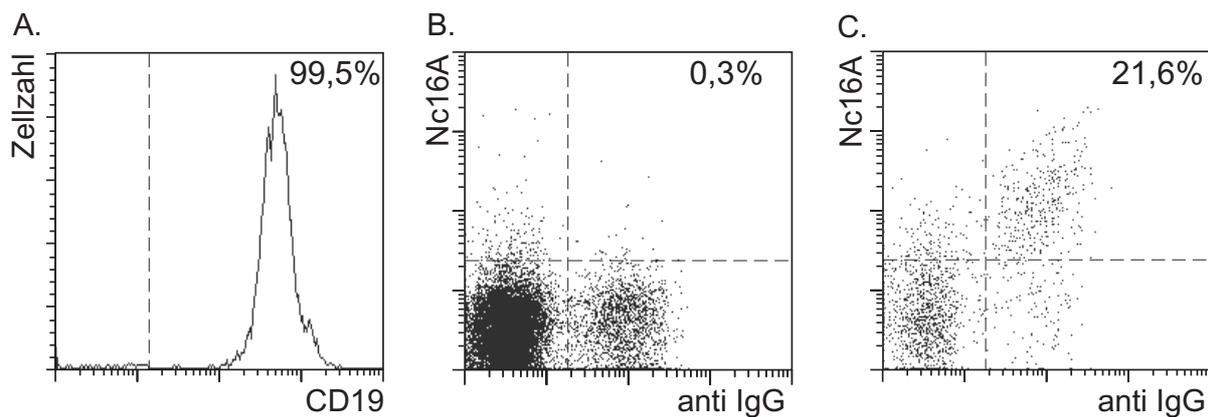


Abbildung 5: Immunomagnetische Anreicherung von NC16A-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen.

NC16A-spezifische Gedächtnis B-Zellen wurden aus PBMC eines Spenders mit bullösem Pemphigoid angereichert. Histogramm A zeigt die Analyse einer CD19-PE Markierung von angereicherten B-Zellen aus PBMC, Punktediagramm B zeigt eine Zweifarbenanalyse für anti-IgG-FITC und GST-NC16A-Bio/Streptavidin-PE von CD19⁺ B-Zellen nach Voranreicherung aus PBMC, und Punktediagramm C zeigt eine Zweifarbenanalyse für anti-IgG-FITC und GST-NC16A-Bio/Streptavidin-PE von isolierten NC16A-spezifischen B-Zellen. Ausschließlich lebende, kernhaltige Zellen wurden entsprechend ihrer Streulichteigenschaften und PI Immunofluoreszenz in die Analyse einbezogen.

3.1.2.4 Anreicherung von TPO-spezifischen B-Zellen

Bei der Voranreicherung CD19⁺ B-Zellen lag die durchschnittliche Reinheit bei $96,77\% \pm 4,22\%$ in 93 Experimenten, in denen B-Zellen aus PBMC angereichert wurden. TPO wurde zur magnetischen Anreicherung an Magnetpartikel gekoppelt und zur durchflußzytometrischen Detektion biotiniliert. Nach magnetischer Voranreicherung der B-Zellen wurden die Zellen mit TPO-Magnetpartikeln markiert und mittels MACS isoliert. Zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen mit TPO-PE und Streptavidin-PE inkubiert. Zur eindeutigen Phänotypisierung von IgG⁺ IgD⁻ Gedächtnis B-Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit anti-IgG-FITC und

anti-IgD-APC markiert. Um kontaminierende Monozyten, Keimzentrums-ähnliche B-Zellen und tote Zellen in der Analyse erkennen und ausschließen zu können, wurden die Zellen mit CD14-PerCP, CD38-Cychrome und PI inkubiert. In Abbildung 6 ist die durchflußzytometrische Analyse TPO-spezifischer Gedächtnis B-Zellen eines normalen Blutspenders dargestellt.

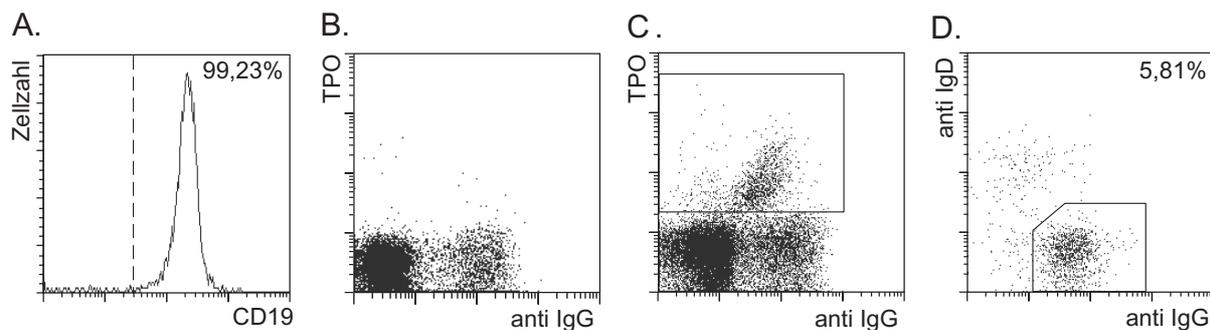


Abbildung 6: Immunomagnetische Anreicherung von TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen.

(A) Analyse einer CD19-PE Markierung von magnetisch angereicherten CD19⁺ B-Zellen aus PBMC eines normalen Blutspenders. (B + C) Zweifarbenanalyse einer anti IgG-FITC und TPO-Bio/Streptavidin-PE Markierung von CD19⁺ B-Zellen vor (B) und nach (C) magnetischer Anreicherung TPO-spezifischer B-Zellen. (D) Zweifarbenanalyse einer anti IgG-FITC und anti IgD-APC Markierung von TPO-bindenden B-Zellen, welche durch ein elektronisches Analysefenster wie in (C) dargestellt, definiert wurden. Die Zahl gibt die Frequenz der TPO-bindenden IgG⁺ IgD⁻ B-Zellen an. Monozyten, Plasmazellen, Keimzentrums-ähnliche B-Zellen und tote Zellen wurden durch Setzen eines elektronischen Fensters nach Markierung mit CD14-PerCP, CD38-Cychrome und PI von der Analyse ausgeschlossen.

3.1.3 Reproduzierbarkeit der Methode

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zur magnetischen Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen zu untersuchen, wurden rTT.C-spezifische B-Zellen aus vereinigten B-Zellen von 6 normalen gesunden Blutspendern in einer Serie von 6 parallelen Separationen angereichert (Tabelle 1). Die Reinheit der Zellen schwankte zwischen 9,2% und 11,2% (Mittelwert: 10,16% ± 0,74%) und die Zahl der rTT.C-spezifischen B-Zellen, die aus ca. 2 x 10⁷ vorangereicherten B-Zellen isoliert wurden, schwankte zwischen 2550 und 3020 (Mittelwert: 2743 ± 159 Zellen).

Tabelle 1: Reproduzierbarkeit der Anreicherung von rTT.C-spezifischen B-Zellen

Experiment Nr. ^{a)}	Reinheit der rTT.C-spezifischen CD19 ⁺	Anzahl der rTT.C-spezifischen CD19 ⁺
	B-Zellen ^{b)}	B-Zellen ^{b)}
1	9,59 %	2670
2	9,77 %	2550
3	11,17 %	2670
4	9,23 %	3020
5	10,66 %	2780
6	10,55 %	2770
Mittelwert \pm SA ^{c)}	10,16 % \pm 0,74 %	2743 \pm 159

^{a)}PBMC von 6 Spendern wurden vereinigt und wieder in 6 Fraktionen aufgeteilt, aus denen rTT.C-spezifische B Zellen mittels magnetischer Anreicherung isoliert wurden

^{b)}in der angereicherten Fraktion laut durchflußzytometrischer Analyse

^{c)}Standardabweichung

3.1.4 Ermittlung der Wiederfindungsrate

Da die Frequenz Antigen-spezifischer B-Zellen im peripheren Blut extrem niedrig ist, ist es nicht möglich ihre Anzahl in einer Blutprobe genau zu bestimmen. Daher ist es auch nicht möglich die Wiederfindungsrate der Antigen-spezifischen B-Zellen nach der magnetischen Anreicherung zu bestimmen. Im Fall der Allergen-spezifischen B-Zellen jedoch sind die basophilen Granulozyten über ihren oberflächenständigen IgE Rezeptor Fc ϵ RI mit Allergen-spezifischem IgE beladen (Irsch 1995). Sie können so zur Überprüfung der PLA₁B-gekoppelten magnetischen und fluoreszenten Reagenzien herangezogen werden. Dazu wurden PBMC von Wespengiftallergikern und normalen, gesunden Blutspendern mit PLA₁B-PE und anti IgE-FITC inkubiert und anschliessend durchflußzytometrisch analysiert. Die auf ihrer Oberfläche IgE tragenden basophilen Granulozyten der Allergiker waren spezifisch für PLA₁B-PE gefärbt, während die ebenfalls auf ihrer Oberfläche IgE tragenden Basophilen Granulozyten der normalen Blutspender nicht gefärbt waren. Ebenfalls kann eine minimale Wiederfindungsrate der PLA₁B-spezifischen B-Zellen bestimmt werden. Basophile Granulozyten eines Wespengiftallergikers konnten mittels PLA₁B-Magnetpartikeln bis zu einer Reinheit von 96,62% mit einer Wiederfindungsrate von 98,57% angereichert werden (Abbildung 7).

Die mittlere PE-Fluoreszenzintensität der PLA₁B-PE gefärbten basophilen Granulozyten war mit einem Wert von 346 in diesem Experiment 1,2- bis 4,3-fach niedriger als die mittlere PE-Fluoreszenzintensität der PLA₁B-spezifischen B-Zellen,

welche im Bereich von 422 bis 1471 (n = 10) lag. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Menge an PLA₁B-spezifischem Immunglobulin auf den basophilen Granulozyten geringer ist als auf den PLA₁B-spezifischen B-Zellen. Somit kann man annehmen, daß die Wiederfindungsrate der PLA₁B-spezifischen B-Zellen bei der magnetischen Anreicherung mittels PLA₁B-Magnetpartikel in der gleichen Größenordnung, wenn nicht sogar höher ist, als die Wiederfindungsrate der basophilen Granulozyten.

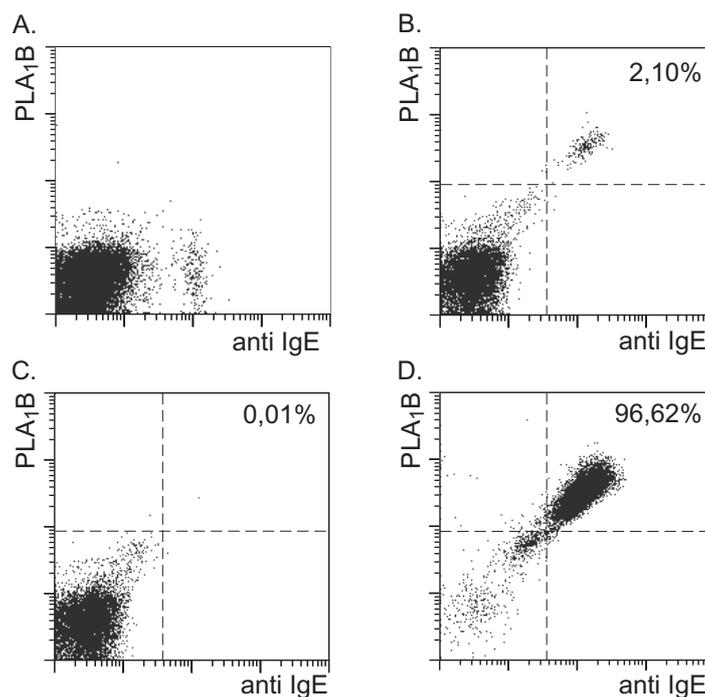


Abbildung 7: Markierung und magnetische Anreicherung PLA₁B-bindender basophiler Granulozyten.

Die Zellen wurden mit anti IgE-FITC und PLA₁B-PE gefärbt. (A) PBMC eines normalen gesunden Blutspenders, (B) PBMC eines Wespengiftallergikers. (C) PBMC eines Wespengiftallergikers nach Entfernen der PLA₁B-bindenden basophilen Granulozyten (negative Zellfraktion). (D) PBMC eines Wespengiftallergikers nach Anreicherung der PLA₁B-bindenden basophilen Granulozyten (positive Zellfraktion). Basierend auf ihren Streulichtsignalen und PI Färbung wurden lebende, kernhaltige Zellen zur Analyse in ein elektronisches Fenster eingeschlossen.

3.2 Spezifitätskontrolle der angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen

Das wichtigste Kriterium für oder wider der Nutzung einer Zellsortierungstechnik ist die Kontrolle ihrer Spezifität. Diese wurde bei der Anreicherung von Antigen-spezifischen Gedächtnis B-Zellen durch folgende Experimente kontrolliert: (a) Test der Anreicherung mit einem irrelevantem Antigen und Determinierung des etwaigen Ausmaßes der unspezifischen fluoreszenten Markierung und (b) Analyse des

sekretierten Antikörpers nach Aktivierung und Proliferation der angereicherten Gedächtnis B-Zellen mit spezifischem oder irrelevantem Antigen unter Bedingungen der limitierenden Verdünnung (Zubler-System).

3.2.1 Kontrollanreicherung mit irrelevantem Antigen

Bei der durchflußzytometrischen Analyse Autoantigen-spezifischer B-Zellen wurde festgestellt, daß die Helligkeit der B-Zellen deutlich geringer war als bei der Markierung mit fluoreszentem rTT.C oder PLA₁B. Zusätzlich war in den magnetisch angereicherten Fraktionen eine größere unspezifische Markierung zu erkennen als in der Fraktion vor der Anreicherung. Außerdem war bei dem Maß der unspezifischen Markierung eine große Spendervariabilität zu verzeichnen. Aus diesem Grund mußte für jeden untersuchten Spender eine individuelle Kontrolle durchgeführt werden. Dazu wurden die vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen der Spender in jeweils zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde mit einem irrelevanten Antigen, welches an Magnetpartikel gekoppelt wurde, markiert und die andere mit dem entsprechendem relevanten Antigen, ebenfalls an Magnetpartikel gekoppelt. Beide Fraktionen wurden mit dem relevantem Fluorochrom-gekoppeltem Antigen markiert, magnetisch separiert und durchflußzytometrisch analysiert. Nur in der Fraktion, die mit dem relevanten Antigen markiert wurde, sollten Antigen-spezifisch angereicherte und markierte Zellen zu detektieren sein.

3.2.1.1 Spezifitätskontrolle der Anreicherung NC16A-bindender B-Zellen

Bei der Spezifitätskontrolle von NC16A-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen wurde bei 6 Patienten mit bullösem Pemphigoid und 4 gesunden Spendern eine individuelle Spezifitätskontrolle durchgeführt. Das irrelevante Antigen, welches an Magnetpartikel gekoppelt wurde, war hierbei das Fusionsprotein GST, welches auch bei GST-NC16A einen Teil des Proteins ausmacht. Die Hälfte der CD19⁺ B-Zellen wurde mit GST-Magnetpartikeln inkubiert, die andere Hälfte mit GST-NC16A-Magnetpartikeln. Beide Fraktionen wurden mit GST-NC16A-Bio und Streptavidin-PE markiert, anschließend magnetisch separiert und durchflußzytometrisch analysiert. Abbildung 8 zeigt die Anreicherung GST-NC16A-bindender Zellen mit GST-NC16A-Magnetpartikeln und GST-Magnetpartikeln eines Spenders mit bullösem Pemphigoid.

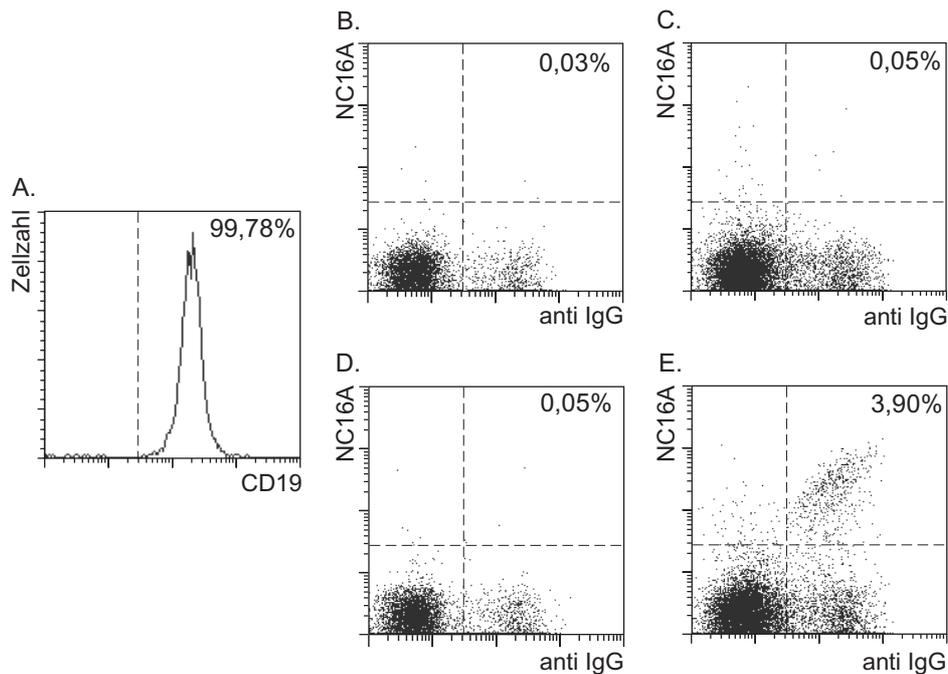


Abbildung 8: Separation GST-NC16A-bindender Zellen

(A) CD19-PE Markierung magnetisch angereicherter CD19⁺ B-Zellen aus PBMC eines Patienten mit bullösem Pemphigoid. (B – E) zeigt eine Zweifarbenanalyse für anti IgG-FITC und GST-NC16A-Biotin plus Streptavidin-PE von CD19⁺ B-Zellen vor (B und D) und nach (C und E) magnetischer Anreicherung GST-bindender Zellen (B und C) und GST-NC16A-bindender Zellen (D und E). Zelltrümmer, Erythrozyten und Thrombozyten wurden durch Setzen eines elektronischen Fensters nach Streulichteigenschaften, Monozyten und tote Zellen auf Grund von CD14-PerCP Markierung und PI Immunofluoreszenz von der Analyse ausgeschlossen.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, wurden zwischen 2,4 und 22,4 (Median 12,1) GST-bindende B-Zellen pro eine Million CD19⁺ B-Zellen im Blut von Patienten und zwischen 0,5 und 3,4 (Median 1,7) im Blut von gesunden Spendern detektiert. Vergleicht man die Mediane der Zellen reaktiv für GST-NC16A mit denen für GST alleine, sind im Fall der Patienten ungefähr 10% der Zellen reaktiv für GST (99,6 verglichen mit 12,1), wohingegen die Werte der gesunden Spender in der gleichen Größenordnung lagen (2,2 verglichen mit 1,7). Das deutet darauf hin, daß die detektierten Zellen bei den gesunden Spendern als unspezifische Hintergrundfärbung gewertet werden können. Die höchste Frequenz GST-bindender IgG⁺ B-Zellen in der Kontrollanreicherung war 22,4. Wohingegen die geringste Frequenz der Zellen, die im Zubler System expandiert werden konnte, bei 36,1 lag. Aus diesem Grund wurde ein Wert von 30 NC16A-spezifischen IgG⁺ B-zellen in einer Million CD19⁺ B-Zellen als Ausschlußkriterium festgelegt.

3.2.1.2 Spezifitätskontrolle der Anreicherung TPO-bindender B-Zellen

Bei der Spezifitätskontrolle der magnetischen Anreicherung von TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen wurden individuelle Untersuchungen bei allen 59 normalen Blutspendern und 34 Patienten mit autoimmuner Thyroiditis durchgeführt. Das an Magnetpartikel gekoppelte irrelevante Antigen war hierbei Phospholipase A2 (PLA2) aus Bienengift. Die Hälfte der CD19⁺ B-Zellen eines jeden Spenders wurde mit PLA2-Magnetpartikeln inkubiert, die andere Hälfte mit TPO-Magnetpartikeln. Beide Fraktionen wurden mit TPO-Bio und Streptavidin-PE markiert, anschließend magnetisch separiert und durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 9).

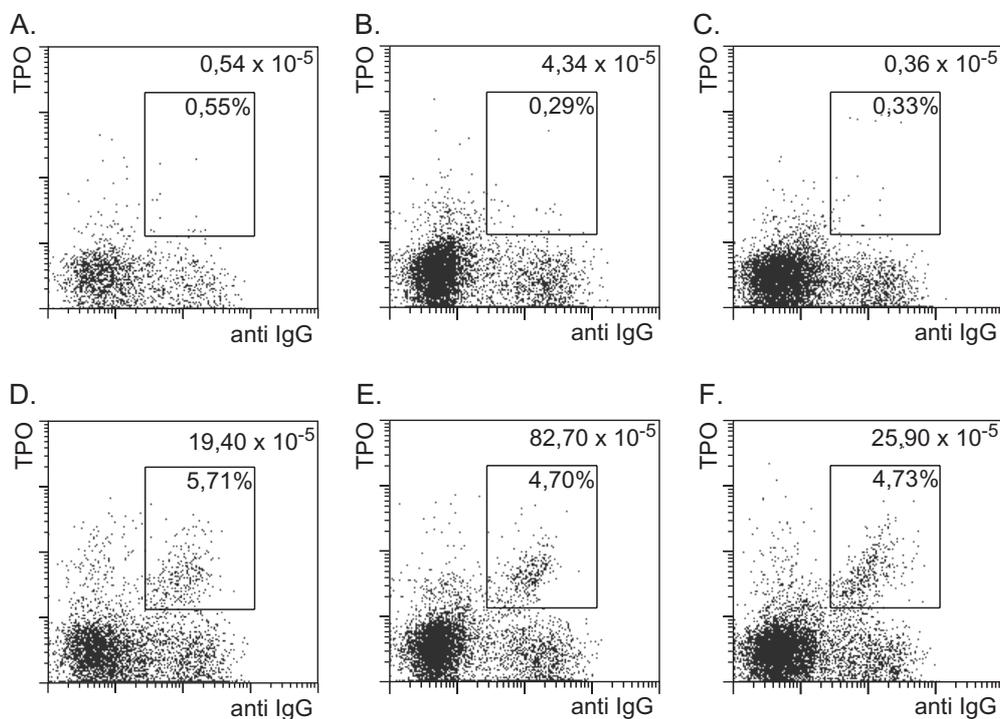


Abbildung 9: Detektion TPO-spezifischer IgG⁺ B-Zellen bei Spendern mit autoimmuner Thyroiditis und normalen Blutspendern.

Zweifarbenganalyse für anti IgG-FITC und TPO-Biotin plus Streptavidin-PE von CD19⁺ B-Zellen nach magnetischer Anreicherung mit PLA₂-Magnetpartikeln (A bis C) und TPO-Magnetpartikeln (D bis F). (A und D) Normaler Blutspender ohne detektierbaren Serumtiter für TPO-spezifisches IgG (< 10 U/ml), (B und E) Patient mit Graves Disease (anti TPO: 131 U/ml) und (C und F) Patient mit Hashimoto Thyroiditis (anti TPO: 777 U/ml). CD14-PerCP-, CD38-Cychrome-, PI-Immunofluoreszenz und Streulichtsignale wurden zum Setzen von elektronischen Analysefenstern herangezogen. Die Zahlen innerhalb der Analysefenster geben die Frequenz der TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen in der angereicherten Fraktion an und die Zahlen außerhalb der Analysefenster geben die Frequenzen der TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen in den vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen an.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, schwankte die Frequenz der TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen in der mit TPO-Magnetpartikel angereicherten Fraktion zwischen 0,02% und 10,27% (Median 0,22%), was absoluten Zellzahlen von 1 bis 1537 (Median 34) entsprach. In der mit PLA₂-Magnetpartikel angereicherten Fraktion schwankte die Frequenz der TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen zwischen 0,01% und 0,64% (Median 0,09%), was absoluten Zellzahlen von 1 bis 152 (Median 10) entsprach. Durch diese Werte ergab sich ein Faktor zwischen den Frequenzen der TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen in der mit TPO-Magnetpartikel angereicherten Fraktion und den Frequenzen in der mit PLA₂-Magnetpartikel angereicherten Fraktion, der von 0,4-fach bis 59,3-fach (Median 2,6-fach) reichte. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde der Ausschlußwert für die minimale Frequenz TPO-bindender IgG⁺ B-Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion auf 0,09% festgelegt. Zusätzlich wurde eine minimale Anzahl von 10 detektierten TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen definiert und ein minimaler Multiplikationsfaktor von 2,6-fach wurde im Vergleich der Frequenzen TPO-bindender IgG⁺ B-Zellen in der mit TPO-Magnetpartikel angereicherten Fraktion und den Frequenzen in der mit PLA₂-Magnetpartikel angereicherten Fraktion als Ausschlußwert gesetzt. In weiteren Experimenten (siehe 3.2.2.4) wurden diese Ausschlußkriterien bestätigt.

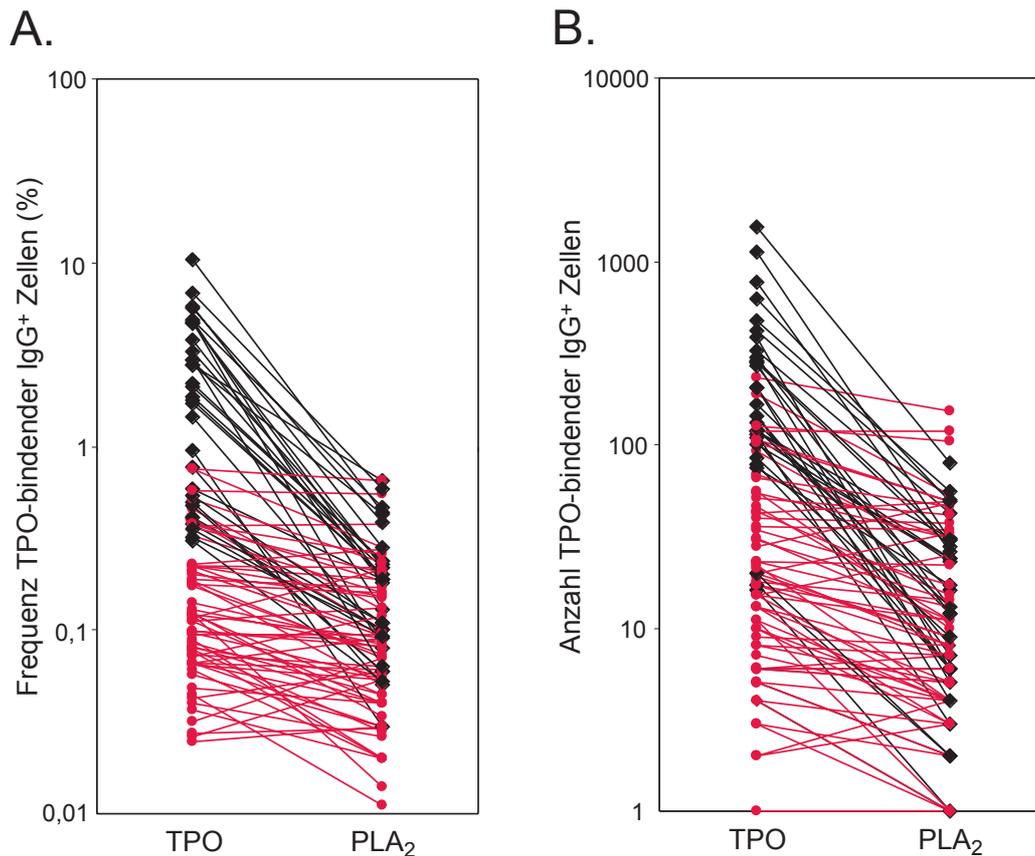


Abbildung 10: Anzahl und Frequenz TPO-bindender IgG⁺ B Zellen nach immunomagnetischer Anreicherung mit TPO- verglichen mit PLA₂-Magnetpartikeln.

(A) Frequenzen und (B) absolute Anzahl durchflußzytometrisch detektierter TPO-bindender IgG⁺ B Zellen nach immunomagnetischer Anreicherung mit TPO- verglichen mit PLA₂-gekoppelten Magnetpartikeln. (●) Proben, die als negativ klassifiziert wurden und (◆) Proben, die als positiv klassifiziert wurden für TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B Zellen.

3.2.2 Spezifitätskontrolle mittels Zubler-System (LD-Kultur)

Um die Spezifität der Anreicherung und der Detektion von isolierten Antigen-spezifischen B-Zellen zu kontrollieren, wurden angereicherte Antigen-spezifische B-Zellen in einer Dichte von 0,3 oder 1 Antigen-spezifischen IgG⁺ B-Zellen pro Vertiefung in 96-Lochplatten ausplattiert und mit 50.000 bestrahlten EL4 B5 Maus-Thymoma Zellen und mit 10% Kulturüberstand von PHA/PMA-koaktivierten T-Zellen und Monozyten stimuliert. Nach 10 Tagen Stimulation wurde der Zellkulturüberstand auf das Vorhandensein von sekretiertem Antigen-spezifischen IgG mittels diverser Methoden wie (a) ELISA, (b) Western Blot oder (c) immunfluoreszenter Färbung von Hautschnitten analysiert.

3.2.2.1 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur rTT.C-spezifischer IgG⁺ B-Zellen

Angereicherte rTT.C-spezifische B-Zellen aus Blut eines normalen Blutspenders wurden in einer Dichte von 0,3 rTT.C-spezifischen B-Zellen unter limitierender Verdünnung im Zubler-System (LD-Kultur) ausplattiert und für 10 Tage kultiviert. Das sekretierte rTT.C-spezifische IgG wurde mittels eines rTT.C-spezifischen ELISAs detektiert. Der Anteil der für rTT.C-spezifisches IgG positiven Löcher von 23,95% lag dem nach Poisson-Verteilung erwartetem Wert von 26% sehr nah, unter der Voraussetzung, daß 100% der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen proliferieren und zu Antikörper-sekretierenden Zellen differenzieren.

3.2.2.2 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur PLA₁B-spezifischer IgG⁺ B-Zellen

Die Spezifität der angereicherten PLA₁B-spezifischen B-Zellen eines Wespengiftallergikers wurde ebenfalls durch Analyse des sekretierten PLA₁B-spezifischen Antikörpers untersucht. Die Zellen wurden in einer Dichte von 0,3 PLA₁B-spezifischen B-Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Das sekretierte PLA₁B-spezifische IgG wurde mittels eines PLA₁B-spezifischen ELISA detektiert. Der Anteil der für PLA₁B-spezifisches IgG positiven Löcher von 21,3% lag ebenfalls dem erwartetem Wert von 26% sehr nahe.

3.2.2.3 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur GST-NC16A-bindender IgG⁺ B-Zellen

NC16A-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen von drei Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP5, BP7 und BP12) wurden in einer Dichte von 0,3 oder 1 NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen im Zubler System ausplattiert. Nach 10 Tagen wurde der Überstand auf NC16A-spezifisches IgG untersucht. Der Anteil der Löcher die positiv für NC16A-spezifisches IgG, in denen die Zellen in einer Dichte von 0,3 bzw. 1 spezifischen Zelle ausplattiert wurden, war dem nach Poisson-Verteilung erwartetem Wert von 7,6% bzw. 50,6% sehr nahe, unter der Voraussetzung, daß mindestens 50% der Zellen proliferiert und zu Antikörper-sekretierenden Zellen differenzieren (siehe Tabelle 5).

Der Überstand aus einigen im ELISA positiv und negativ getesteten Löchern der Kultur von Patient BP12 wurde außerdem mittels Western Blot in der Arbeitsgruppe von Dr. Nicolas Hunzelmann untersucht. Nur die Löcher, die auch im ELISA ein positives Signal gaben, zeigten auch ein Signal im Western Blot (Abbildung 11).

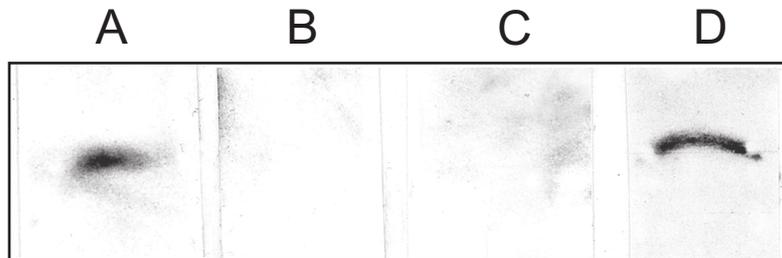


Abbildung 11: Western Blot Analyse des NC16A-spezifischen Antikörpers.

NC16A-spezifische B-Zellen wurden aus PBMC eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP9) angereichert und in limitierender Verdünnung im Zubler System kultiviert. Überstände aus Löchern, die im NC16A-spezifischen ELISA positiv (A) und (B) negativ erschienen, wurden getestet. (C) Sekundärantikörper als Kontrolle, (D) Serum eines Patienten mit bullösem Pemphigoid als Positivkontrolle.

Um zu analysieren, ob das sekretierte GST-NC16A-spezifische IgG im Kulturüberstand zusätzlich zum rekombinanten GST-NC16A Fusionsprotein auch natives BP180 bindet, wurden die gesamten angereicherten und die abgereicherten Fraktionen der NC16A-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen im Zubler System in Kultur genommen und mittels ELISA und immunfluoreszenter Färbung von humanen Hautschnitten ("Salt split skin"-Technik) (Gammon 1992) auf die Anwesenheit von NC16A-spezifischem IgG untersucht. Abbildung 12 zeigt die durchflußzytometrische Analyse der beiden Fraktionen und die immunfluoreszente Färbung der Hautschnitte. Nur der Überstand der angereicherten Fraktion NC16A-spezifischer Gedächtnis B-Zellen zeigt eine deutliche Färbung der Basalmembran, in der sich das Autoantigen BP180 befindet, wohingegen der Überstand der negativen Fraktion nach Separation NC16A-spezifischer B-Zellen in keinem von beiden Tests ein positives Signal gab.

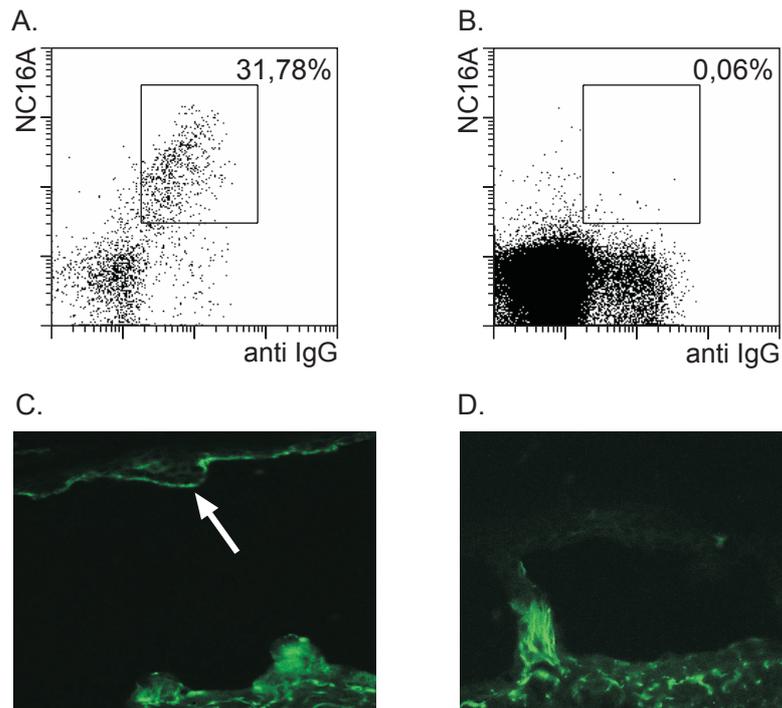


Abbildung 12: Spezifitätskontrolle angereicherter NC16A-spezifischer B-Zellen.

An- oder abgereicherte Fraktionen NC16A-spezifischer IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen aus PBMC eines Patienten (BP4) mit bullösem Pemphigoid wurden im Zubler-System kultiviert. Mit dem Kulturüberstand wurden humane Hautschnitte gefärbt. Die Punktediagramme A und B zeigen eine Zweifarbenanalyse für GST-NC16A-Bio/Streptavidin-PE und anti-IgG-FITC einer von NC16A-spezifischen B-Zellen angereicherten Fraktion (A) und einer Fraktion abgereicherter NC16A-spezifischer B-Zellen (B). Die Analyse schließt nur lebende, kernhaltige Zellen entsprechend ihrer Streulichteigenschaften und PI Immunfluoreszenz ein. Die Fotos zeigen die immunfluoreszente Färbung humaner Haut mit dem Kulturüberstand der für NC16A-spezifische B-Zellen angereicherten Fraktion (C) und der für NC16A-spezifische B-Zellen abgereicherter Fraktion (D) nach Separation und Kultur dieser Zellen. Nur der Kulturüberstand der Fraktion angereicherter NC16A-spezifischer B-Zellen zeigt eine Färbung der Basalmembran (weißer Pfeil).

3.2.2.4 Spezifitätskontrolle des sekretierten Antikörpers nach Kultur TPO-spezifischer IgG⁺ B-Zellen

Um die Spezifität der angereicherten TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen zu untersuchen und die in Abschnitt 3.2.1.2 festgelegten Ausschlusskriterien zu verifizieren, wurden jeweils die Fraktionen der für das Kontrollantigen PLA₂ und für TPO angereicherten Fraktionen von 6 Patienten mit autoimmuner Thyroiditis (vier wurden als positiv und zwei als negativ für TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen klassifiziert) und 4 normaler Blutspender (zwei wurden als positiv und zwei als negativ für TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen klassifiziert) im Zubler-

System analysiert. Die Zellen aus der Fraktion der angereicherten TPO-spezifischen B-Zellen wurden in einer Dichte von 0,3 TPO-bindenden IgG⁺ B-Zellen im Zubler-System ausplattiert. Die der für PLA₂ angereicherten Fraktion wurden in der gleichen Zelldichte wie die für TPO angereicherten Fraktion ausplattiert. Nach 10 Tagen wurde der Überstand auf TPO-spezifisches IgG mittels ELISA untersucht. Wie in Tabelle 2 gezeigt, ist in den vier Fällen, in denen die Spender als negativ für TPO-spezifisch IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen klassifiziert wurden, weder in den Löchern in denen Zellen aus der Kontrollanreicherung mit PLA₂, noch in der Anreicherung für TPO TPO-spezifisches IgG detektiert worden. Im Gegensatz dazu wurde bei den sechs Fällen, die als positiv für TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen klassifiziert wurden, der Anteil von Löchern in denen Sekretion von TPO-spezifischem IgG detektiert wurde nahe dem erwarteten Wert von 26%, welcher nach Poisson-Verteilung erwartet wird, wenn 100% der TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen proliferieren und zu IgG-sekretierenden Zellen differenzieren.

Tabelle 2: Detektion von TPO-spezifischen B-Zellen in LD-Kultur

Spender ^{a)}	Anreicherung mit TPO-Magnetpartikeln			Anreicherung mit PLA ₂ -Magnetpartikeln			Klassifikation
	Anzahl der TPO-bindenden IgG ⁺ B Zellen ^{b)}	% TPO-bindender IgG ⁺ B Zellen ^{b)}	Frequenz TPO-spezifischer IgG ⁺ Löcher nach LD Kultur	Anzahl der TPO-bindenden IgG ⁺ B Zellen ^{b)}	% TPO-bindender IgG ⁺ B Zellen ^{b)}	Frequenz TPO-spezifischer IgG ⁺ Löcher nach LD Kultur	
AIT2	4	0,41	0%	1	0,10	0%	-
AIT3	5	0,46	0%	2	0,13	0%	-
NBD11	6	0,07	0%	5	0,06	0%	-
NBD31	20	0,21	0%	9	0,09	0%	-
AIT6	16	0,77	27,5%	1	0,05	1,4%	+
AIT7	17	0,49	22,0%	2	0,06	0,6%	+
AIT13	78	3,28	19,8%	6	0,23	2,1%	+
AIT16	104	2,96	14,6%	6	0,19	6,3%	+
NBD57	766	4,68	25,3%	26	0,19	0%	+
NBD58	1127	5,81	36,6%	30	0,28	0%	+

^{a)}Die Spender-Identifizierung zeigt an, ob es sich um einen normalen Blutspender (NBD) oder einen Patienten mit autoimmuner Thyroiditis (AIT) handelt.

^{b)}Detektiert mittels Durchflußzytometrie in der angereicherten Fraktion

3.3 Phänotypisierung Antigen-spezifischer B-Zellen

3.3.1 Phänotypisierung rTT.C-spezifischer B-Zellen

Ihren Streulichteigenschaften entsprechend sind die meisten der angereicherten rTT.C-spezifischen B-Zellen des peripheren Blutes kleine, ruhende Lymphozyten. Um sie einem B-Zelldifferenzierungsstadium zuordnen zu können und ihre Immunglobulinausprägung festzustellen wurden rTT.C-spezifische B-Zellen

hinsichtlich der Ausprägung diverser B-Zelldifferenzierungs-Antigene und Immunglobulinklassen analysiert (Abbildung 13). Die meisten der rTT.C-spezifischen CD19⁺ B-Zellen prägten oberflächenständiges IgG, aber kein oberflächenständiges IgD aus. Nur wenige der rTT.C-spezifischen CD19⁺ B-Zellen prägten oberflächenständiges IgD, aber kein oberflächenständiges IgG aus. In zwei unabhängigen Experimenten, in denen B-Zellen von je 6 Spendern vereinigt wurden, waren $72,18 \pm 4,58\%$ der rTT.C-spezifischen B-Zellen IgG⁺ und $15,77 \pm 2,13\%$ waren IgD⁺. Die mittlere durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Zellen, die IgD ausprägten, war deutlich niedriger als der Zellen, die IgG ausprägten. Dies deutet darauf hin, daß die IgG⁺ rTT.C-spezifischen B-Zellen eine höhere Affinität zu rTT.C haben oder eine größere Anzahl von oberflächenständigen Antikörpermolekülen pro Zelle ausprägen.

Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind nicht oder nur in sehr geringem Maße auf rTT.C-spezifischen B-Zellen ausgeprägt. Das gleiche gilt für: (a) CD10, ein Antigen das nur von frühen B-Zellvorläufern und B-Zellen im Keimzentrum ausgeprägt wird (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997); (b) CD5, einem T-Zellantigen das schwach auf einer Untergruppe reifer B-zellen ausgeprägt wird (Huang 1987, Murakami 1992, Kantor 1993); (c) CD38, einem Antigen welches nicht auf der Oberfläche von naiven B-Zellen oder Gedächtnis B-Zellen, aber auf B-Zellen im Keimzentrum oder Plasmazellen gefunden wird (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997); und CD77, dessen Ausprägung bei B-Zellen auf einer Untergruppe von B-Zellen im Keimzentrum beschränkt ist (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997). Der Lymphozyten Bestimmungsort-Rezeptor (Homing-Rezeptor) CD44, einem Antigen welches auf der Oberfläche von naiven B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen, aber nicht auf B-Zellen im Keimzentrum gefunden wird (MacLennan 1994, Kremmidiotis 1995, Liu, Y. J. 1997), ist auf allen rTT.C-spezifischen B-Zellen ausgeprägt. Die meisten rTT.C-spezifischen B-Zellen prägen kein CD23 aus ($85,31 \pm 1,41\%$, n = 2), ein Antigen welches auf naiven B-Zellen, aber nicht auf B-Zellen im Keimzentrum, Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen ausgeprägt ist (Liu, Y. J. 1997). Nur sehr wenige rTT.C-spezifische B-Zellen zeigen eine positive Färbung für CD62L ($3,03 \pm 2,18\%$, n = 2).

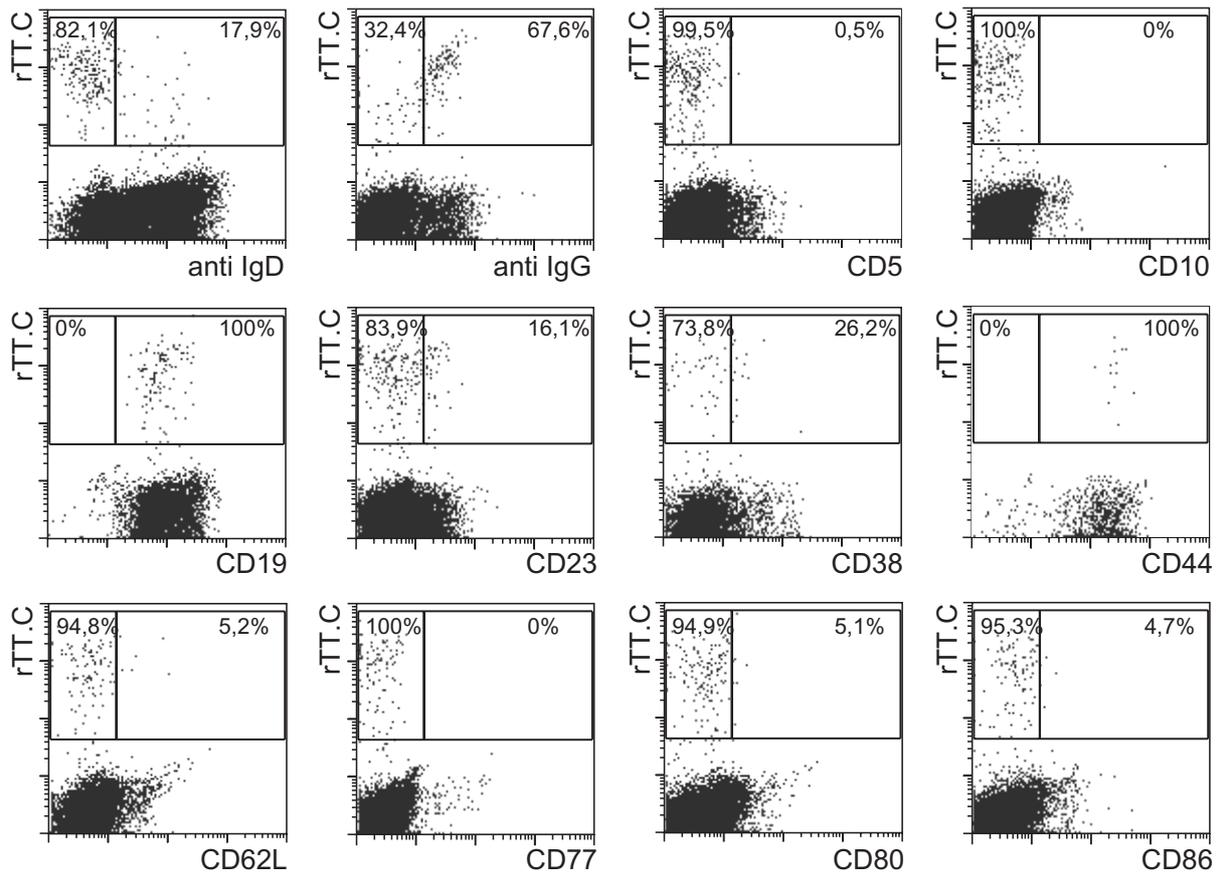


Abbildung 13: Immunphänotypisierung rTT.C-spezifischer B-Zellen.

rTT.C-spezifische B-Zellen wurden aus vereinigten PBMC von 6 verschiedenen normalen, gesunden Blutspendern angereichert. Die Punktediagramme zeigen eine fluoreszente Markierung mit rTT.C-PE gegen Markierungen mit FITC-gekoppelten Antikörpern spezifisch für diverse Differenzierungsantigene. PI Immunofluoreszenz und Streulichtsignale dienten zum Ausschluß toter Zellen von der Analyse.

3.3.2 Phänotypisierung PLA₁B-spezifischer B-Zellen

Auch die meisten der angereicherten PLA₁B-spezifischen B-Zellen aus Blut von Wespengiftallergikern und normalen Blutspendern waren ihren Streulichteigenschaften entsprechend kleine, ruhende Lymphozyten. Sie wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Ausprägung der Immunglobulinklasse analysiert (Abbildung 14). Zwischen 60% und 80% der PLA₁B-spezifischen B-Zellen waren positiv für oberflächenständiges IgG (Mittelwert: $86 \pm 13\%$, $n = 10$), unabhängig davon ob sie aus Blut von Wespengiftallergikern oder normalen Blutspendern angereichert wurden. Die dominierende IgG Unterklasse war IgG1. Zwischen 40% und 71% der PLA₁B-spezifischen B-Zellen waren IgG1⁺ (Mittelwert: $54 \pm 16\%$, $n = 3$). Es wurden keine PLA₁B-spezifischen B-Zellen detektiert, die IgE ($n = 13$) oder IgG4 ($n = 3$) ausprägten.

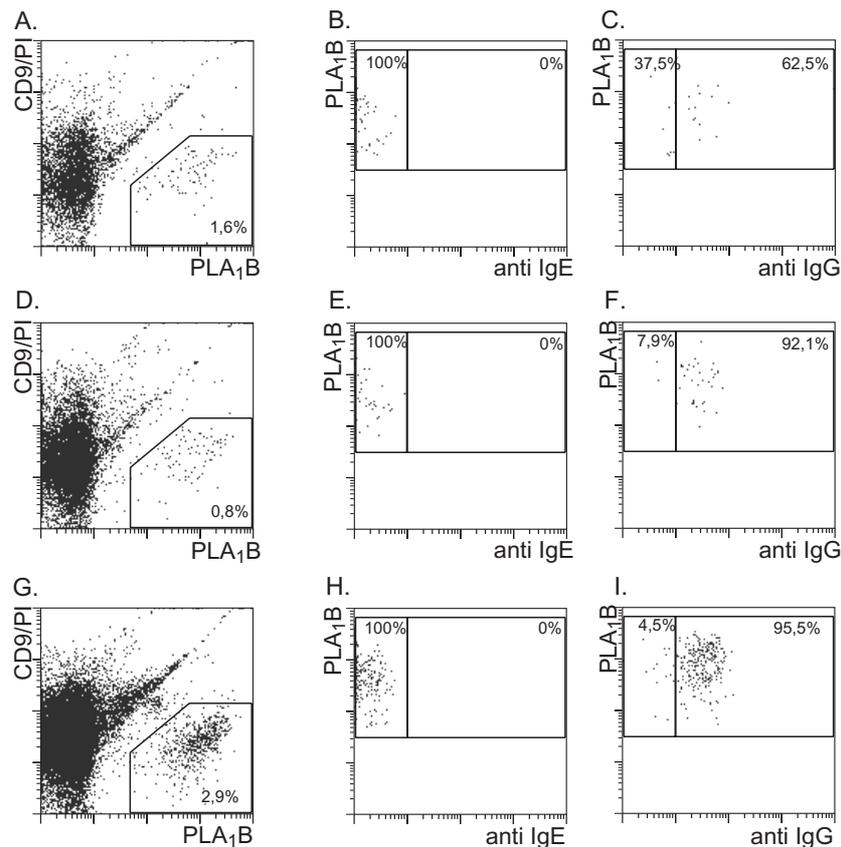


Abbildung 14: Immunglobulinklassen-Ausprägung von PLA₁B-spezifischen B-Zellen.

PLA₁B-spezifische B-Zellen wurden aus Blut eines normalen Blutspenders (A-C) und zwei Wespengiftallergikern (D-F und G-I) angereichert. Die Punktediagramme A, D und G zeigen eine Zweifarbenanalyse der angereicherten Zellen für PLA₁B-PE, CD9-Cychrome und PI. In diesen Punktediagrammen wurden PLA₁B-spezifischen B-Zellen in ein elektronisches Analysefenster eingeschlossen. In den Punktediagramme B, C, E, F, H, und I sind nur die Zellen dargestellt, die innerhalb dieses Analysefensters liegen. Die Punktediagramme B, E und H zeigen eine Zweifarbenanalyse für PLA₁B-PE und IgE-FITC und die Punktediagramme C, F und I zeigen eine Zweifarbenanalyse für PLA₁B-PE und anti IgG-FITC.

3.3.3 Phänotypisierung NC16A-spezifischer B-Zellen

Angereicherte NC16A-spezifische B-Zellen wurden mittels Vier-Farben-Durchflußzytometrie hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. Auch hier handelte es sich aufgrund der Streulichtheitseigenschaften um kleine, ruhende Lymphozyten. Um NC16A-spezifische B-Zellen einem B-Zelldifferenzierungsstadium zuzuordnen, wurden die angereicherten Zellen von zwei Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP4 und BP6) auf die Ausprägung verschiedener B-Zelldifferenzierungsantigene und Immunglobulinunterklassen hin untersucht. Abbildung 15 zeigt, daß wenn überhaupt nur sehr wenige GST-NC16A-bindende IgG⁺ B-Zellen IgD, CD38 und IgG4

ausprägen. Eine kleine Fraktion GST-NC16A-bindenden IgG⁺ B-Zellen prägt das Haut-Lymphozyten-Antigen CLA aus, welches ein Bestimmungsort-Rezeptor für Lymphozyten in die Haut ist (Berg 1991). Die meisten der GST-NC16A-bindenden IgG⁺ B-Zellen prägen die IgG1 Unterklasse aus.

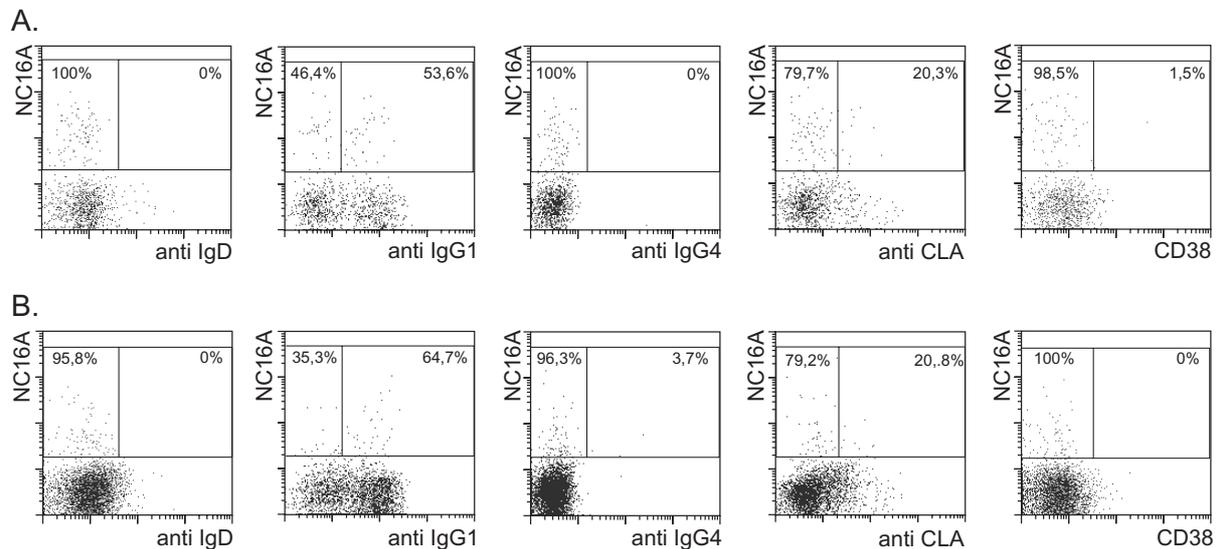


Abbildung 15: Immunphänotypisierung von NC16A-spezifischen B-Zellen.

Angereicherte NC16A-spezifische B-Zellen aus PBMC von zwei Patienten mit bullösem Pemphigoid (A + B) wurden immunphänotypisch mittels Multiparameter Durchflußzytometrie analysiert. (A) Patient BP4, (B) BP6. Gezeigt ist eine Markierung lebender, kleiner IgG⁺ Lymphozyten (ein elektronisches Analysefenster wurde nach Streulichtsignalen, und Markierung mit anti IgG-FITC, CD14-PerCP und PI definiert) mit GST-NC16A und monoklonalen Antikörpern gegen IgD, IgG1, IgG4, CLA und CD38.

3.3.4 Phänotypisierung TPO-spezifischer B-Zellen

TPO-spezifische B-Zellen wurden hinsichtlich ihres Gedächtnis Phänotyps bezüglich der etwaigen Ausprägung von IgD und IgG untersucht (siehe auch Abbildung 6 und Abbildung 9). Keimzentrumsartige B-Zellen wurden aufgrund der fehlenden Ausprägung von CD38 elektronisch von der Analyse ausgeschlossen. Aufgrund der Streulichteigenschaften konnte man schließen, daß es sich bei den IgD⁻/IgG⁺/CD38⁻ TPO-spezifischen B-Zellen in der Zirkulation um kleine, ruhende Lymphozyten handelte.

Zusätzlich wurden bei drei Patienten mit autoimmuner Thyroiditis angereicherte TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen hinsichtlich ihrer Ausprägung des Aktivierungsmarkers CD80 analysiert (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997). Wie

Abbildung 16 zeigt, wird CD80 übereinstimmend auf den meisten, wenn nicht sogar allen, TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen ausgeprägt.

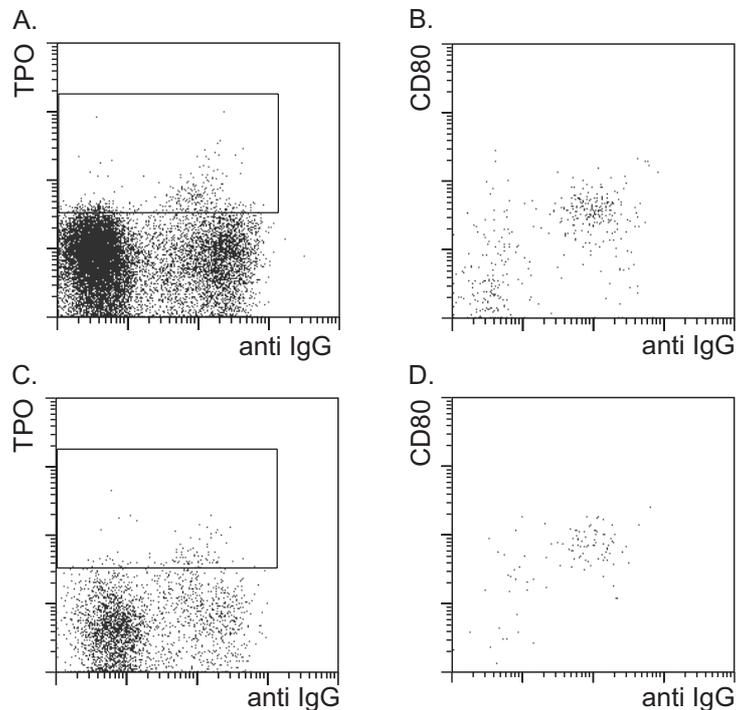


Abbildung 16: CD80 Ausprägung auf TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen

(A und C) Zweifarbenanalyse einer anti IgG-FITC und TPO-Bio/anti Biotin-APC Markierung von CD19⁺ B-Zellen nach Anreicherung TPO-spezifischer B-Zellen aus PBMC von zwei Patienten mit autoimmuner Thyroiditis. (B und D) Zweifarbenanalyse einer anti IgG-FITC und CD80-PE Markierung von TPO-bindenden B-Zellen, auf die wie in (A und B) ein elektronisches Analysefenster gesetzt worden ist. Monozyten, Plasmazellen, Keimzentrums-ähnliche B-Zellen und tote Zellen wurden durch ein elektronisches Fensters nach Markierung mit CD14-PerCP, CD38-Cychrome und PI von der Analyse ausgeschlossen.

3.4 Korrelationsanalysen

3.4.1 Frequenzen von rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und Seramtiter von rTT.C-spezifischem IgG

B-Zellen mit Spezifität für rTT.C wurden aus Blutproben von 24 normalen, gesunden Blutspendern mittels der indirekten Methode isoliert (Odendahl 1996). In Tabelle 3 ist die Zahl der in jeder Fraktion durchflußzytometrisch detektierten rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen angegeben. Für alle Proben, in denen mindestens 10 rTT.C-spezifische IgG⁺ B-Zellen detektiert wurde, ist die berechnete Anzahl der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ebenfalls angegeben. Die Berechnung basiert auf der Basis der durchflußzytometrisch bestimmten absoluten Zellzahl und der Frequenz

der rTT.C-spezifischen B-Zellen. Die berechnete Anzahl der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ist immer höher als die der durchflußzytometrisch detektierten Zellen. Dies resultiert daraus, daß nur circa 25 bis 50% der Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion durchflußzytometrisch analysiert wurde. Die Frequenzen der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen wurden auf der Basis der berechneten Anzahl der angereicherten rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und der absoluten Anzahl der vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen berechnet. Die Frequenz der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen innerhalb der CD19⁺ B-Zellen reichte von $6,5 \times 10^{-6}$ bis zu $7,81 \times 10^{-5}$ (Mittelwert: $2,95 \times 10^{-5}$, n = 13).

Tabelle 3: Frequenzen rTT.C-spezifischer IgG⁺ B-Zellen und Konzentrationen von rTT.C-spezifischem IgG im Serum normaler Blutspender

Spender	Durchflußzytometrisch bestimmte Anzahl der IgG ⁺ rTT.C-spezifischen B Zellen	Berechnete Anzahl der IgG ⁺ rTT.C-spezifischen B Zellen in der ganzen Probe ^{a)}	Frequenz der IgG ⁺ rTT.C-spezifischen B Zellen unter CD19 ⁺ B Zellen ($\times 10^{-6}$) ^{b)}	Serumtiter des rTT.C-spezifischen IgG (U/ml) ^{c)}
1	0	NB	NB	217
2	1	NB	NB	1772
3	1	NB	NB	48
4	2	NB	NB	34
5	3	NB	NB	929
6	3	NB	NB	814
7	3	NB	NB	3267
8	3	NB	NB	478
9	4	NB	NB	2089
10	4	NB	NB	38
11	6	NB	NB	339
12	17	193	6,5	134
13	18	69	22,9	2535
14	20	98	21,2	356
15	34	345	11,3	741
16	36	123	12,5	141
17	38	232	18,6	1212
18	40	458	32,4	4783
19	47	149	58,4	342
20	50	483	7,5	4026
21	68	742	15,8	324
22	112	728	69,1	2952
23	183	1700	78,1	645
24	186	559	29,3	1813

NB = nicht bestimmt

^{a)}Die Zahl der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der angereicherten Fraktion wurde auf der Basis der absoluten Zellzahl und der Frequenz der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion berechnet. Die Anzahl der Zellen, die durchflußzytometrisch detektiert wurden, ist niedriger als die Anzahl der Zellen, die für die gesamte Fraktion berechnet wurden, da nur 25% bis 50% der angereicherten Fraktion durchflußzytometrisch analysiert wurden.

^{b)}Frequenzen der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen wurden auf der Basis der berechneten Anzahl der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion und der Anzahl der CD19⁺ B-Zellen in der Probe vor der Anreicherung der rTT.C-spezifischen B-Zellen berechnet.

^{c)}Der Serumtiter des rTT.C-spezifischen IgG wurde mittels ELISA bestimmt.

Abbildung 17 zeigt die Frequenzen der rTT.C-spezifischen IgG⁺ B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen aufgetragen gegen den Titer des mittels ELISA bestimmten rTT.C-spezifischen IgG im Serum von normalen, gesunden Blutspendern (Tabelle 3). Es konnte keine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden ($r = 0,059$, $p = 0,848$, $n = 13$).

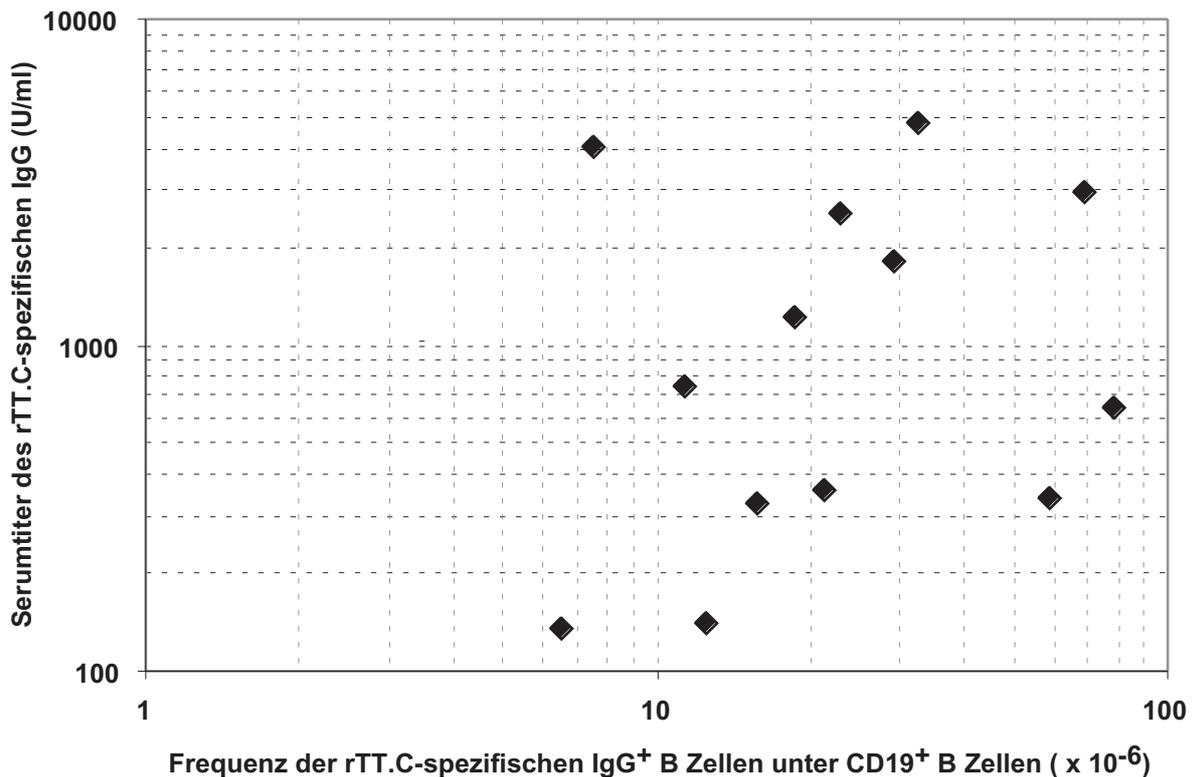


Abbildung 17: Korrelationsanalyse zwischen der Frequenz rTT.C-spezifischer IgG⁺ B-Zellen und dem Serumtiter des rTT.C-spezifischen IgG.

3.4.2 Frequenzen von PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und Serumtiter von PLA₁B-spezifischem IgG

B-Zellen mit Spezifität für PLA₁B wurden aus Blutproben von 8 normalen, gesunden Blutspendern und 9 Wespengiftallergikern mittels PLA₁B-Magnetpartikel und PLA₁B-PE angereichert und durchflußzytometrisch analysiert. In Tabelle 4 ist die Zahl der tatsächlich in jeder Fraktion durchflußzytometrisch detektierten PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen angegeben. Für alle Proben, in denen mindestens 10 PLA₁B-spezifische IgG⁺ B-Zellen detektiert wurden, ist die berechnete Anzahl der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ebenfalls angegeben. Die Berechnung basiert auf der Basis der durchflußzytometrisch bestimmten absoluten Zellzahl und der Frequenz

der PLA₁B-spezifischen B-Zellen. Die berechnete Anzahl der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ist immer höher als die der durchflußzytometrisch detektierten Zellen. Dies resultiert ebenfalls daraus, daß nur circa 25 bis 50% einer magnetisch angereicherten Fraktion durchflußzytometrisch analysiert wurde. Die Frequenzen der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen wurden auf der Basis der berechneten Anzahl der angereicherten PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und der absoluten Anzahl der vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen berechnet. Die Frequenz der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen innerhalb der Population der CD19⁺ B-Zellen betrug zwischen $2,0 \times 10^{-6}$ und $4,448 \times 10^{-4}$ (Mittelwert: $9,76 \times 10^{-5}$, n = 10).

Tabelle 4: Frequenzen PLA₁B-spezifischer IgG⁺ B-Zellen und Konzentrationen von PLA₁B-spezifischem IgG im Serum normaler Blutspender

Spender ^{a)}	Durchflußzytometrisch bestimmte Anzahl der IgG ⁺ PLA ₁ B-spezifischen B Zellen	Berechnete Anzahl der IgG ⁺ PLA ₁ B-spezifischen B Zellen in der ganzen Probe ^{b)}	Frequenz der IgG ⁺ PLA ₁ B-spezifischen B Zellen unter CD19 ⁺ B Zellen ($\times 10^{-6}$) ^{c)}	Serumtiter des PLA ₁ B-spezifischen IgG (U/ml) ^{d)}
N1	1	NB	NB	251
N2	3	NB	NB	41
A1	4	NB	NB	4567
A2	4	NB	NB	904
N3	5	NB	NB	168
N4	6	NB	NB	ND
N5	8	NB	NB	63
A3	11	77	26,5	28
A4	12	78	97,5	10000
N6	18	220	12,5	114
A5	18	140	175,0	2209
A6	24	196	41,7	1747
N7	25	34	2,0	11
A7	29	223	65,5	108
A8	38	473	78,8	1058
A9	268	2580	444,8	594
N8	406	543	31,4	2007

NB = nicht bestimmt

^{a)}A1 bis A9: Proben der Wespengiftallergiker. N1 bis N8: Proben der normalen Blutspender.

^{b)}Die Zahl der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der angereicherten Fraktion wurde auf der Basis der absoluten Zellzahl und der Frequenz der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion berechnet. Die Anzahl der Zellen, die durchflußzytometrisch detektiert wurden, ist niedriger als die Anzahl der Zellen, die für die gesamte Fraktion berechnet wurden, da nur 25% bis 50% der angereicherten Fraktion durchflußzytometrisch analysiert wurden.

^{c)}Frequenzen der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen wurden auf der Basis der berechneten Anzahl der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen in der magnetisch angereicherten Fraktion und der Anzahl der CD19⁺ B-Zellen in der Probe vor der Anreicherung der PLA₁B-spezifischen B-Zellen berechnet.

^{d)}Der Serumtiter des PLA₁B-spezifischen IgG wurde mittels ELISA bestimmt.

Abbildung 18 zeigt die Frequenzen der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen innerhalb der Population der CD19⁺ B-Zellen aufgetragen gegen den Titer des mittels ELISA bestimmten PLA₁B-spezifischen IgG im Serum. Es konnte auch hier keine statistisch

signifikante lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden ($r = -0,098$; $p = 0,834$; $n = 7$).

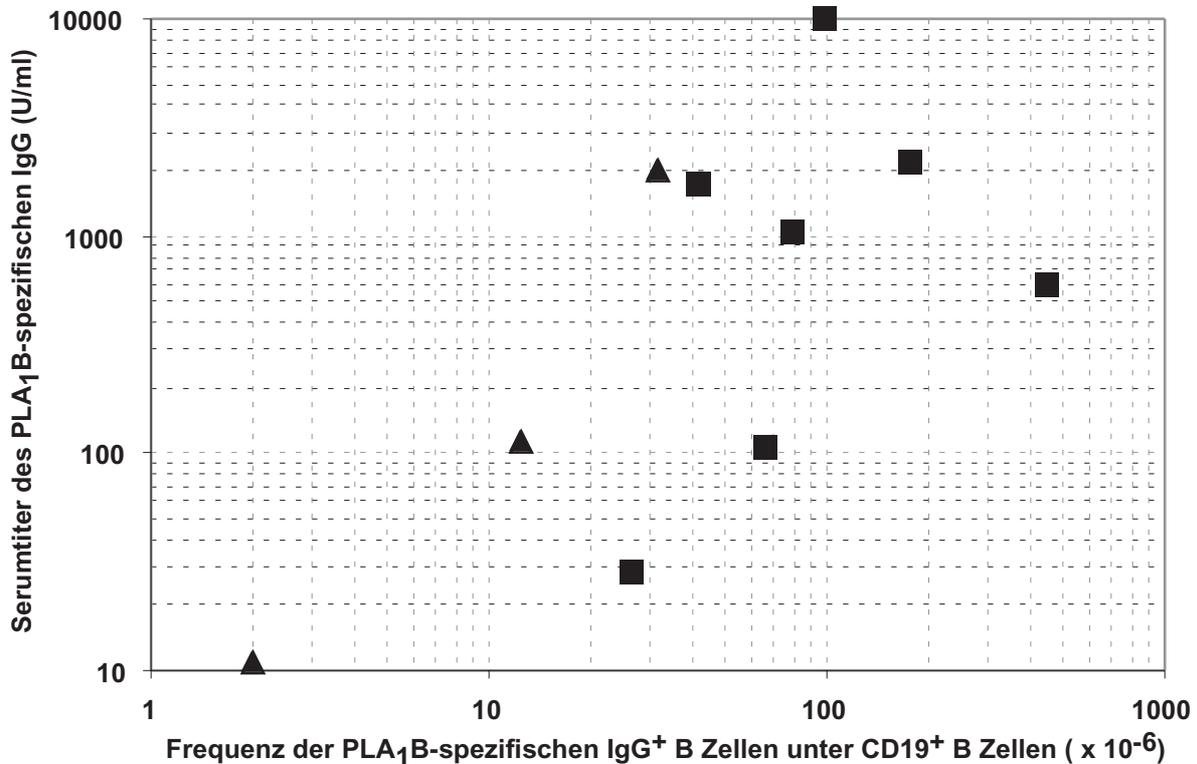


Abbildung 18: Korrelationsanalyse zwischen der Frequenz PLA₁B-spezifischer IgG⁺ B-Zellen und dem Serumtiter des PLA₁B-spezifischen IgG.

(▲) Daten der normalen Blutspender; (■) Daten der Wespengiftallergiker.

3.4.3 Frequenzen von NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und Serumtiter von NC16A-spezifischem IgG

IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen mit Spezifität für NC16A wurden aus Blutproben von 14 Patienten mit bullösem Pemphigoid und vier gesunden Spendern angereichert und durchflußzytometrisch analysiert. In Tabelle 5 sind die Daten der einzelnen Spender zusammengefaßt. Zwischen 10,1 und 414,6 (Median 99,6) GST-NC16A-bindende IgG⁺ B-Zellen pro 1 Millionen CD19⁺ B-Zellen wurden im peripheren Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid detektiert, wohingegen nur zwischen 1,1 und 5,4 (Median 2,2) GST-NC16A-bindende IgG⁺ B-Zellen pro 1 Millionen CD19⁺ B-Zellen im Blut der gesunden Spender gefunden wurden. Die Reinheit der GST-NC16A-bindenden IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in der angereicherten Fraktion bei den Patienten reichte von 0,15% bis 22,41% (Median 2,22%) und von 0,02% bis 0,07% (Median 0,03%) bei den gesunden Spendern.

Der NC16A-spezifische IgG Serumtiter der einzelnen Patienten wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zillikens mittels ELISA ermittelt. Hierbei konnten jedoch keine absoluten Werte angegeben werden, so daß eine Korrelationsanalyse im Fall von NC16A nicht möglich ist. Allerdings kann man erkennen, daß der Serumtiter bei den Patienten schwankt (ausgedrückt durch + und ++) und nicht unbedingt bei den Patienten mit den meisten NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen höher ist als bei denen mit wenigen oder gar keinen NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen.

Tabelle 5: NC16A-spezifische IgG⁺ B Zellen im Blut und Serumstatus von Patienten mit bullösem Pemphigoid und von normalen gesunden Spendern.

Spender ^{a)}	Anzahl der GST-NC16A-spezifischen IgG ⁺ B Zellen pro 1 Million Zellen in der angereicherten Fraktion	Anzahl der GST-spezifischen IgG ⁺ B Zellen pro 1 Million Zellen in der angereicherten Fraktion	Serumstatus für NC16A-spezifisches IgG ^{b)}	Prozent der positiven Löcher nach LD Kultur
NBD1	1,1	1,9	NB	NB
NBD2	1,3	0,5	NB	NB
NBD3	3,1	1,6	NB	NB
NBD4	5,4	3,4	NB	NB
BP1	10,1	NB	+	NB
BP2	11,1	4,1	+	NB
BP3	15,2	2,4	+	NB
BP4	34,4	NB	++	NB
BP5	36,1	NB	+	30.5% (50.6%) ^{c)}
BP6	43,5	NB	+	NB
BP7	95,6	NB	+	29% (50.6%) ^{c)}
BP8	103,7	NB	+	NB
BP9	109,9	NB	++	NB
BP10	213,6	2,8	+	NB
BP11	256,9	20,1	++	NB
BP12	278,6	NB	+	24.0% (7.6%) ^{c)}
BP13	282,6	22,4	++	NB
BP14	414,6	20,7	++	NB

NB = nicht bestimmt

^{a)}NBD1 bis NBD4: Proben der normalen Blutspender. BP1 bis BP14: Proben der Patienten mit bullösem Pemphigoid.

^{b)}Der Serumstatus für NC16A-spezifisches IgG wurde mittels ELISA bestimmt.

^{c)}Der Wert, der nach Poisson-Verteilung erwartet wird, wenn 50% der GST-NC16A-spezifischen Zellen proliferieren und zu IgG-sekretierenden Zellen differenzieren, ist in Klammern angegeben.

3.4.4 Frequenzen von TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen und Serumtiter von TPO-spezifischem IgG

Es wurden Blutproben von 34 Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und 59 normalen Blutspendern hinsichtlich der Existenz von TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen untersucht. In Tabelle 6 sind alle ermittelten Werte zusammengefaßt und die Anzahl der durchflußzytometrisch detektierten TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in den für TPO angereicherten Fraktionen aller untersuchten Proben angegeben. Der Serumtiter des TPO-spezifischen IgG aller Spender wurde mittels ELISA bestimmt.

Tabelle 6: Frequenzen TPO-spezifischer IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen und Konzentrationen von TPO-spezifischem IgG im Serum untersuchter Spender

Spender ^{a)}	Anzahl der IgG ⁺ TPO-bindenden B Zellen nach Anreicherung mit TPO	% IgG ⁺ TPO-bindender B Zellen nach Anreicherung mit TPO	% IgG ⁺ TPO-binding B cells nach Anreicherung mit PLA ₂	Faktor ^{b)}	Serumtit er (U/ml) ^{c)}	Frequenz TPO-spezifischer B Zellen unter CD19 ⁺ B Zellen (x 10 ⁶) ^{d)}
NBD1	1	0,04	0,06	0,7	< 10	ND
NBD2	2	0,03	0,05	0,5	< 10	ND
NBD3	2	0,03	0,03	1,0	< 10	ND
NBD4	3	0,07	0,05	1,4	< 10	ND
AIT1	3	0,09	0,02	4,5	33	ND
NBD5	4	0,09	0,09	1,0	< 10	ND
NBD6	4	0,04	0,01	4,0	< 10	ND
AIT2	4	0,41	0,10	4,1	62	ND
NBD7	5	0,05	0,04	1,3	< 10	ND
NBD8	5	0,07	0,03	2,3	< 10	ND
AIT3	5	0,46	0,13	3,5	< 10	ND
NBD9	6	0,03	0,03	1,0	< 10	ND
NBD10	6	0,20	0,15	1,3	< 10	ND
NBD11	6	0,07	0,06	1,2	< 10	ND
AIT4	6	0,03	0,07	0,4	417	ND
AIT5	6	0,23	0,19	1,2	70	ND
NBD12	7	0,12	0,09	1,3	< 10	ND
NBD13	8	0,07	0,06	1,2	< 10	ND
NBD14	8	0,04	0,02	2,0	< 10	ND
NBD15	9	0,10	0,09	1,1	< 10	ND
NBD16	10	0,09	0,04	2,3	< 10	ND
NBD17	10	0,06	0,02	3,0	< 10	ND
NBD18	11	0,10	0,06	1,7	< 10	ND
NBD19	11	0,12	0,01	12,0	< 10	ND
NBD20	13	0,12	0,04	3,0	< 10	ND
NBD21	13	0,06	0,03	2,0	< 10	ND
NBD22	13	0,18	0,05	3,6	< 10	ND
NBD23	15	0,07	0,12	0,6	< 10	ND
NBD24	15	0,10	0,08	1,3	< 10	ND
NBD25	15	0,13	0,03	4,3	< 10	ND
AIT6	16	0,77	0,05	15,4	258	187
NBD26	17	0,08	0,06	1,3	< 10	ND
NBD27	17	0,07	0,04	1,8	< 10	ND
AIT7	17	0,49	0,06	8,2	44	162
NBD28	18	0,19	0,17	1,1	< 10	ND
NBD29	19	0,13	0,08	1,6	< 10	ND
NBD30	20	0,07	0,09	0,8	< 10	ND
NBD31	20	0,21	0,09	2,3	< 10	ND
NBD32	20	0,31	0,05	6,2	< 10	9
NBD33	21	0,04	0,03	1,3	< 10	ND
NBD34	22	0,08	0,02	4,0	< 10	ND
NBD35	23	0,21	0,09	2,3	< 10	ND
NBD36	23	0,18	0,16	1,1	< 10	ND
NBD37	28	0,23	0,28	0,8	< 10	ND
NBD38	30	0,18	0,07	2,6	94	ND
NBD39	31	0,08	0,03	2,7	< 10	ND
NBD40	34	0,14	0,08	1,7	< 10	ND
NBD41	36	0,11	0,13	0,8	< 10	ND
AIT8	40	0,37	0,38	1,0	268	ND
NBD42	42	0,36	0,20	1,8	< 10	ND
NBD43	43	0,22	0,09	2,4	< 10	ND
AIT9	46	0,08	0,04	2,0	57	ND
NBD44	51	0,52	0,23	2,3	< 10	ND
NBD45	54	0,22	0,15	1,5	< 10	ND
AIT10	55	0,19	0,07	2,7	93	ND
NBD46	66	0,76	0,64	1,2	< 10	ND
AIT11	68	0,33	0,16	2,1	50	ND
AIT12	74	0,41	0,11	3,7	343	142
AIT13	78	3,28	0,23	14,3	670	430
NBD47	84	0,54	0,11	4,9	< 10	5
AIT14	91	0,11	0,04	2,8	289	ND
AIT15	100	2,74	0,65	4,2	111	825
NBD48	102	0,38	0,26	1,5	< 10	ND
AIT16	104	2,96	0,19	15,6	1232	496
NBD49	106	0,38	0,19	2,0	< 10	ND
AIT17	108	0,37	0,10	3,7	134	140
AIT18	114	0,95	0,03	31,7	79	180
AIT19	118	0,58	0,19	5,8	2032	518
NBD50	119	0,57	0,55	1,0	< 10	ND
AIT20	119	0,32	0,10	3,2	600	477
NBD51	121	0,36	0,09	5,2	585	104
NBD52	127	0,12	0,22	0,5	< 10	ND
AIT21	132	0,48	0,06	8,0	56	333
AIT22	142	3,78	0,18	21,0	481	622
AIT23	144	1,43	0,09	15,9	1244	575
AIT24	164	1,86	0,22	8,5	1720	253
AIT25	189	0,76	0,28	2,7	720	ND
NBD53	204	2,93	0,06	48,8	72	45
AIT26	206	10,27	0,44	23,3	1996	837
AIT27	231	0,22	0,22	1,0	101	ND
NBD54	267	5,60	0,39	14,4	< 10	194
AIT28	279	4,83	0,13	37,2	87	150
AIT29	281	2,11	0,24	8,8	294	381
NBD55	285	2,79	0,42	6,6	< 10	79
AIT30	297	4,70	0,22	21,4	131	827
AIT31	327	1,78	0,20	8,9	441	564
AIT32	381	4,74	0,08	59,3	777	259
AIT33	414	2,20	0,24	9,2	335	764
AIT34	472	1,72	0,20	8,6	790	381
NBD56	621	4,87	0,47	10,4	73	128
NBD57	766	4,68	0,19	24,6	16	189
NBD58	1127	5,81	0,28	20,8	191	218
NBD59	1537	6,87	0,59	11,6	183	245

^{a)}AIT1 bis AIT34: Proben der Patienten mit autoimmuner Thyroiditis. NBD1 bis NBD59: Proben der normalen Blutspender.

^{b)}Der Faktor ist zwischen den % der IgG⁺ TPO-bindenden B-Zellen nach Anreicherung für TPO und % IgG⁺ TPO-bindenden B-Zellen in der Kontrollanreicherung bestimmt.

^{c)}Der Serumtit er des TPO-spezifischen IgG wurde mittels ELISA bestimmt.

^{d)}Die Frequenzen der TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen wurden basierend auf der Anzahl der TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in der angereicherten Fraktion und der Anzahl der vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen bestimmt.

Basierend auf den unter 3.2.1.2 definierten Ausschlußkriterien, wurden TPO-spezifische IgG⁺ B-Zellen in 22 von 34 (65%) Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und in 10 von 59 (17%) normalen Blutspendern gefunden. Die Frequenzen der TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen innerhalb der Population der vorangereicherten CD19⁺ B-Zellen wurden nur für die Spender bestimmt, die als positiv für TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen klassifiziert wurden (siehe 3.2.1.2). Die Frequenzen reichten von 5×10^{-6} bis zu $8,37 \times 10^{-4}$ (Median $2,49 \times 10^{-4}$, n = 32). Überraschenderweise wurde bei vier der zehn normalen Blutspender, bei denen TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in der Zirkulation gefunden wurden, kein TPO-spezifisches IgG im Serum detektiert.

Abbildung 19 zeigt die Frequenzwerte der TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen innerhalb der Population CD19⁺ B-Zellen verglichen mit den Titern des mittels ELISA bestimmten TPO-spezifischen IgG im Serum (Tabelle 6). Die Daten der Spender, die TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in der Zirkulation, aber kein detektierbares anti-TPO IgG im Serum hatten, konnten nicht in die Analyse einbezogen werden. Es konnte auch hier keine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden ($r = 0,364$; $p = 0,057$; n = 28).

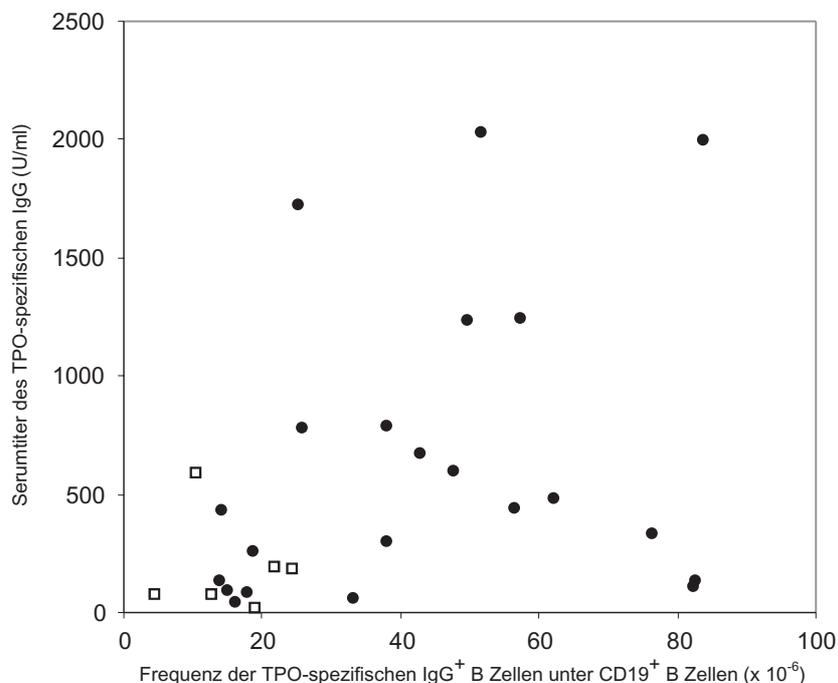


Abbildung 19: Korrelationsanalyse zwischen der Frequenz TPO-spezifischer IgG⁺ B-Zellen und dem Serumtiter des TPO-spezifischen IgG.

(●) Daten der Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und (□) Daten der normalen Blutspender.

4 Diskussion

Das Immunsystem hat die Fähigkeit über sehr lange Zeit, teilweise sogar ein ganzes Menschenleben lang, protektiv gegenüber spezifischen Antigenen zu sein. Eine Reinfektion mit einem Antigen wird verhindert wenn sich das Immunsystem an dieses Antigen aus der früheren Infektion „erinnert“. Ein solches immunologisches Gedächtnis wird auf B-Zell-Ebene durch Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen und deren Produktion von Antikörpern repräsentiert. Lange anhaltende Antikörperantworten nach Vakzinierung sind ein Schlüsselaspekt der protektiven Immunität und spiegeln generell den Grad des B-Zellgedächtnisses. Traditionelle Modelle postulieren, daß Gedächtnis B-Zellen unentbehrlich für die Aufrechterhaltung lang anhaltender Antikörper-Antworten sind: Antikörpertiter im Serum sollen von Plasmazellen aufrecht erhalten werden, die kurzlebig sind und kontinuierlich durch neu gebildete Plasmazellen ersetzt werden. Gedächtnis B-Zellen sollen durch persistierendes Antigen aktiviert werden und zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren (Gray 1993, Bachmann 1994, Bachmann 1996, Zinkernagel 1996). Diese Modelle wurden jedoch in letzter Zeit von Studien von Manz et al. (Manz 1997, Manz 1998) und Slifka et al. (Slifka 1998a, Slifka 1998b) in Frage gestellt, welche mit ihren Untersuchungen demonstrierten, daß Plasmazellen langlebig sein können und in Abwesenheit von Gedächtnis B-Zellen und Antigen für lange Zeit Antikörper produzieren können.

Inwiefern also dieses humorale immunologische Gedächtnis abhängig von der Anwesenheit langlebiger Gedächtnis B-Zellen ist, ist nicht geklärt. Ebenfalls schlecht verstanden ist die Rolle, die Antigen-spezifische B-Zellen im Gegensatz zu Antigen-spezifischen Plasmazellen, Gedächtnis T-Zellen und Effektor T-Zellen in pathologischen Immunreaktionen wie Allergien und Autoimmunerkrankungen spielen (Ahmed 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit von Antigen-spezifischen Gedächtnis B-Zellen im peripheren Blut und dem spezifischen Antikörper im Serum unter verschiedenen immunologischen Bedingungen, wie Häufigkeit der Immunisierung, Persistenz des Antigens und Dauer der Immunantwort untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, ob bei Autoimmunerkrankungen, für deren Pathogenese autoreaktive Antikörper

beschrieben wurden, auch eine vermehrte Anwesenheit Autoantigen-spezifischer Gedächtnis B-Zellen nachzuweisen ist.

Hierzu wurden B-Zellen mit Spezifität für (1) rTT.C nach Vakzinierung gegen Wundstarrkrampf bei geimpften Spendern, (2) das Allergen PLA₁B aus Wespengift bei gesunden Spendern und Wespengiftallergikern während einer Hyposensibilisierungstherapie, (3) das Autoantigen GST-NC16A bei gesunden Spendern und Patienten mit der Autoimmunerkrankung Bullöses Pemphigoid und (4) das Autoantigen TPO bei gesunden Spendern und bei Patienten mit autoimmuner Thyroiditis analysiert.

Da in Deutschland ein fast flächendeckender Impfschutz gegen Wundstarrkrampf besteht, weil schon früh in der Kindheit gegen Tetanus immunisiert wird, war es möglich bei der Untersuchung rTT.C-spezifischer Gedächtnis B-Zellen das Blut normaler Blutspender zu verwenden. Leider war es aber dabei nicht möglich genauere Angaben über den Immunisierungsstatus der untersuchten Personen zu erhalten (Wie oft wurde immunisiert? Wie lange liegt die letzte Immunisierung zurück?). Das Kollektiv der untersuchten Personen war daher sehr gemischt und man geht von einem großen Anteil aus, der vor langer Zeit immunisiert wurde (> 1 Jahr) und bei denen ein lang anhaltender Antikörper Serumtiter gegen Tetanus Toxin vermutlich ohne oder nur mit geringen Mengen persistierenden Antigens nachweisbar war.

Bei der Untersuchung von PLA₁B-spezifischen B-Zellen war es möglich ein Patientenkollektiv von Wespengiftallergikern zu analysieren, die sich einer spezifischen Hyposensibilisierung unterzogen und die exakt einen Monat nach Erhalt der letzten Immunisierungsdosis analysiert werden konnten. Dabei handelte es sich um eine Wiederholungsimmunisierung, bei der man davon ausgehen kann, daß sich persistierendes Antigen noch im Organismus befindet. Da PLA₁B eines der dominierenden Antigene aus Wespengift ist, ist ebenfalls ein großer Anteil der Bevölkerung durch Wespenstiche immunisiert und so konnte zum Vergleich und zur Kontrolle normale Blutspender analysiert werden.

Bei den Personen mit bullösem Pemphigoid und Thyroiditis handelte es sich um Patienten mit chronischen Autoimmunerkrankungen. Womit man davon ausgehen konnte, daß das Autoantigen permanent als stimulierendes Antigen persistent war.

NC16A ist ein Fragment aus einer nichtkollagenösen Domäne des Kollagen Typ XVII (BP180), welches eines der beiden Hauptautoantigene ist, gegen die Patienten mit bullösem Pemphigoid Autoantikörper generieren (Liu, Z. 1993, Borradori 1999). Das rekombinant hergestellte GST-NC16A wurde zur Anreicherung von Autoantigen-spezifischen B-Zellen aus Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid verwendet.

TPO ist ein membrangebundenes Protein, welches hauptsächlich auf der apikalen Oberfläche von Thyrozyten lokalisiert ist (McLachlan 2000). Da die Schilddrüse ein stark durchblutetes Gewebe ist und thyroide Antigene nicht vollständig physisch vom Immunsystem abgetrennt sind, scheint die Toleranz gegenüber thyroiden Antigenen sehr fragil zu sein. Mehr als 40% der Frauen über 20 Jahre zeigen bei einer Autopsie eine Entzündung der Schilddrüse (Okayasu 1994). Die Anwesenheit von TPO-spezifischen Autoantikörpern im Serum korreliert mit der histologisch manifestierten Thyroiditis (Weetman 1994) und TPO-spezifische Autoantikörper sind bei fast allen Patienten mit klinisch manifestierter autoimmuner Thyroiditis (Hashimoto wie auch Graves Erkrankung) feststellbar (Weetman 1994, McLachlan 2000). TPO wurde zur Anreicherung von Autoantigen-spezifischen B-Zellen aus Blut von Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und normalen Blutspendern verwendet.

4.1 Etablierung einer Methode zur Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen

Die Analyse Antigen-spezifischer B-Zellen in humanem peripherem Blut wird durch ihre niedrige Frequenz erschwert. Bisherige Methoden der Darstellung beschränkten sich vor allem auf die Analyse des von ihnen sekretierten spezifischen Antikörpers nach Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper-sekretierenden Zellen in diversen Kultursystemen (Lanzavecchia 1983, Wen 1987, Nakamura 1988, Rudolphi 1993, Oshiba 1994, Quiding Jarbrink 1995, Simonsson-Lagerkvist 1995). Diese Analysemethoden haben den großen Nachteil, daß die Zellen nicht ihrem *in vivo* Phänotyp entsprechend untersucht werden können. Um die Zellen allerdings direkt aus dem peripheren Blut analysieren und phänotypisieren zu können, ist es unerlässlich sie anzureichern und somit ihre Frequenz in der zu untersuchenden Probe zu erhöhen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode nutzt die Tatsache, daß naive und Gedächtnis B-Zellen native Antigene durch ihren B-Zellrezeptor erkennen. Dieser ist die membrangebundene Form des Antikörpers, den die Zelle später nach der

Differenzierung zur Plasmazelle sekretiert (Pernis 1970, Raff 1970, Reth 1992). Zur Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen wurden sehr kleine, superparamagnetische, Antigen-gekoppelte Partikel (MACS-Magnetpartikel; <50 nm Durchmesser) eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Methode der Multiparameter-Durchflußzytometrie entwickelt, um die angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen quantifizieren und charakterisieren zu können. Die Methode stellte sich als effizient, zuverlässig und hochspezifisch heraus. Mit der magnetischen Anreicherung wurde nicht nur eine starke Reduzierung des Probenvolumens, sondern auch eine bis zu 20.000-fache Anreicherung der Antigen-spezifischen B-Zellen erreicht. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch eine parallele Bearbeitung einer in sechs Teile aufgeteilten Probe des selben Ausgangsmaterials bewiesen. Die Wiederfindungsrate der Antigen-spezifischen B-Zellen bei der Anreicherung war größer als 98%, wie in einem Modellsystem mit basophilen Granulozyten aus Blut von Patienten mit Wespengiftallergie bestimmt wurde.

4.2 Spezifitätskontrolle der angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen

Das wichtigste Kriterium für die Verwendung einer Zellsortierungstechnologie ist der Nachweis der Spezifität. In dieser Arbeit wurde die Spezifität der angereicherten Zellen auf mehrfache Weise bewiesen: (1) Die magnetische Markierung und die Anreicherung rTT.C-spezifischer B-Zellen mit Dig-gekoppeltem rTT.C konnte durch die Vorinkubation mit ungekoppeltem rTT.C inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). (2) Die Markierungsintensität von basophilen Granulozyten mit PE- oder Magnetpartikel-gekoppeltem PLA₁B korrelierte gut mit dem PLA₁B-spezifischen IgE im Serum, war also klar abhängig von der Stärke der Beladung der basophilen Granulozyten mit PLA₁B-spezifischem IgE (Daten nicht gezeigt). (3) Die durchflußzytometrische Frequenzbestimmung angereicherter rTT.C-, PLA₁B-, NC16A- und TPO-spezifischer B-Zellen stimmte mit der Frequenzbestimmung mittels in vitro Proliferation und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen unter limitierender Verdünnung überein. Die Spezifität dieser in der Kultur produzierten Antikörper wurde auf mehrfache Weise nachgewiesen: rTT.C-, PLA₁B-, NC16A- und TPO-spezifisches IgG wurden mit einem ELISA analysiert, wobei das jeweilige Antigen an die ELISA-Platte gebunden wurde. TPO-spezifisches IgG wurde zusätzlich mit einem ELISA detektiert, bei dem natives, aufgereinigtes Antigen aus der Schilddrüse an die ELISA-Platte gebunden wurde. NC16A-spezifisches IgG

wurde zusätzlich mittels Western Blotting detektiert und dazu verwendet natives Antigen in humanen Hautschnitten anzufärben. (4) Außerdem wurde die durchflußzytometrische Analyse NC16A- und TPO-spezifischer B-Zellen durch eine parallel durchgeführte, individuelle Anreicherung mit einem irrelevanten Antigen kontrolliert. Diese Kontrollanreicherung diente bei der Anreicherung von TPO-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen ebenfalls dazu stringente Grenzwerte für: (a) die minimal nachweisbare Frequenz TPO-spezifischer IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen in der immunomagnetisch angereicherten Fraktion, (b) die minimale Anzahl der tatsächlich detektierten TPO-bindenden IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen, und (c) die minimale Differenz zwischen der Frequenz TPO-bindender IgG⁺ B-Zellen in der mit PLA₂-Magnetpartikeln angereicherten Kontrollfraktion und der mit TPO-Magnetpartikeln angereicherten Fraktion festzulegen. Dieser Ansatz war sehr zuverlässig: die Einteilung der Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und der normalen Blutspender in „positiv“ und „negativ“ anhand der durchflußzytometrisch ermittelten Frequenzen der Antigen-spezifischen B-Zellen war in 100%iger Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Analyse mittels limitierender Verdünnung.

4.3 Immunophänotypisierung Antigen-spezifischer B-Zellen

Die Anreicherung Antigen-spezifischer B-Zellen mittels der beschriebenen Methode ermöglichte eine direkte *ex vivo* Immunophänotypisierung dieser Zellen. Mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie wurden die Zellen hinsichtlich der Ausprägung diverser Oberflächenmoleküle untersucht und immunophänotypisiert.

Der Immunophänotyp angereicherter rTT.C-spezifischer B-Zellen von normalen Blutspendern wurde untersucht um festzustellen, ob es sich bei diesen Zellen tatsächlich um Gedächtnis B-Zellen handelte. Bei einem früheren Versuch Tetanus Toxin-spezifische B-Zellen nach Rosettierung mit großen Antigen-beschichteten immunomagnetischen Partikeln zu isolieren, haben Oshiba et al. (Oshiba 1994) laut ihrer Ergebnisse gezeigt, daß es sich bei Tetanus Toxin-spezifischen B-Zellen aus Blut normaler Spender vorwiegend um Zellen handelte, die Immunglobulin der Klasse IgM auf ihrer Oberfläche ausprägten. Nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen prägte die Isotypen IgG, IgA und IgE aus. Die Spezifität dieser Rosettierungsprozedur ist allerdings aus zwei Gründen zweifelhaft: ungefähr 10% der rosettierten Zellen wurden als CD3⁺ T-Zellen identifiziert, und der

durchschnittliche Prozentsatz Tetanus Toxin-spezifischer B-Zellen unter B-Zellen war mit einem Wert von 0,34% viel höher als bei vergleichbaren Untersuchungen, die die Frequenz von Vorläuferzellen von Tetanus Toxin-spezifischen Antikörperproduzierenden Zellen mittels limitierender Verdünnungs-Methoden analysiert haben (Lanzavecchia 1983). Die Immunophänotypisierung der rTT.C-spezifischen CD19⁺ B-Zellen der hier vorliegenden Arbeit ergab, daß die große Mehrheit dieser Zellen in der Tat die bekannten Kriterien einer Isotyp-gewechselten Gedächtnis B-Zelle aufwies (MacLennan 1994, Kremmidiotis 1995, Liu, Y. J. 1995, Liu, Y. J. 1997). Den Streulichteigenschaften nach zu schließen, handelt es sich bei ihnen um kleine ruhende Lymphozyten und nicht um große aktivierte Blasten. Die Zellen prägten CD19, CD44 und große Mengen von IgG aus, aber weder IgD noch CD38 (MacLennan 1994, Kremmidiotis 1995, Rajewsky 1996, Liu, Y. J. 1997). Sie prägten weder die bekannten Antigene von Keimzentrums B-Zellen CD10 und CD77 (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997) noch die Oberflächenantigene CD5 und CD23 aus, welche typisch für B-Zellen aus der folliculären Mantelregion des Keimzentrum sind (Huang 1987, Murakami 1992, Kantor 1993). Die akzessorischen Moleküle CD80 und CD86 (MacLennan 1994, Liu, Y. J. 1997) wurden nicht oder nur in sehr geringen Mengen ausgeprägt. Zusätzlich verfügen rTT.C-spezifische CD19⁺ B-Zellen über die Fähigkeit nach entsprechender Stimulation Antikörper zu sekretieren.

Die meisten der angereicherten PLA₁B-spezifischen B-Zellen zeigten ebenfalls die Streulichteigenschaften kleiner Lymphozyten und prägten IgG aus, also auch hier ein typisches Merkmal Isotyp-gewechselter Gedächtnis B-Zellen. Es wurden keine IgG4- oder IgE-ausprägenden PLA₁B-spezifischen B-Zellen detektiert. Der Grund dafür könnte generell die zu geringe Frequenz von IgG4- oder IgE-ausprägenden B-Zellen im peripheren Blut sein. Die Vermutung liegt ebenfalls nahe, daß IgE-ausprägende Gedächtnis B-Zellen überhaupt nicht in der Zirkulation existieren, da in Blut von Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom zwar IgE⁺ basophile Granulozyten angereichert und detektiert werden konnten, aber keine einzige IgE⁺ Gedächtnis B-Zelle (Daten nicht gezeigt). Eine andere Möglichkeit ist, daß erst bei der Differenzierung zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle ein Klassenwechsel zu IgE stattfindet und daher keine Gedächtnis B-Zellen nachweisbar sind.

PLA₁B-spezifische IgG⁺ B-Zellen ließen sich stimulieren zu Antikörper-sekretierenden Zellen zu differenzieren und Antikörper der Klasse IgG und IgE zu sekretieren. Sie

sind also generell dazu fähig PLA₁B-spezifisches IgE zu sekretieren. Leider kann das Klassenwechsel-Potential der PLA₁B -spezifischen Gedächtnis B-Zellen nach Kultivierung im Zubler System nicht untersucht werden, da die Kulturbedingungen des Zubler Systems B-Zellen dabei artifiziell beeinflusst.

Zur Detektion NC16A-spezifischer Gedächtnis B-Zellen wurde ebenfalls die IgG-Oberflächenausprägung analysiert. Damit war auch hier eine eindeutige Identifikation Isotyp-gewechselter Gedächtnis B-Zellen möglich. Um den Anteil aktivierter, Keimzentrums-abstammender NC16A-spezifischer IgG⁺ B-Zellen zu bestimmen, wurde die Ausprägung von CD38 analysiert, einem Antigen welches nicht auf naiven oder Gedächtnis B-Zellen, sondern auf B-Zellen im Keimzentrum und Plasmazellen ausgeprägt wird (Liu, Y. J. 1997). Die Ausprägung von IgD, einem Immunglobulin-Isotyp, der nur auf naiven B-Zellen ausgeprägt wird (Rajewsky 1996), wurde ebenfalls analysiert. Die Ergebnisse zeigten, daß die große Mehrheit der NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen alle immunophänotypischen Eigenschaften von Gedächtnis B-Zellen aufwiesen.

Die meisten NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen prägten die IgG1 Unterklasse aus. Interessanterweise wurden keine NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen detektiert, die die IgG4 Unterklasse ausprägten, obwohl dies die dominierende IgG Unterklasse der NC16A-spezifischen Autoantikörper im Serum der Patienten mit bullösem Pemphigoid ist (Soh 1991, Kumar 1996, Dopp 2000, Skaria 2000). Dies läßt darauf schließen, daß die Produktion NC16A-spezifischen Immunglobulins im Serum entweder vollständig unabhängig von NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ist oder mit dem selektiven Immunglobulin Isotyp-Klassenwechsel zu IgG4 bei der Restimulation NC16A-spezifischer IgG⁺ B-Zellen assoziiert ist. Die Beobachtung, daß CD19⁺ B-Zellen im Blut kein IgG4 ausprägen, deutet ebenfalls auf die Möglichkeit hin, daß B-Zellen wie bei IgE beobachtet, nicht zum IgG4 Isotyp wechseln bis sie aktiviert werden und sich zu IgG4 produzierenden Plasmazellen differenzieren. Auch hier kann das Zubler System nicht zur Untersuchung des Klassenwechsel-Potentials der Zellen zu IgG4 benutzt werden, da es sie künstlich beeinflusst.

CLA, ein Antigen, das unter anderem auf T-Zellen zu finden ist, welche in die Haut einwandern (Berg 1991), konnte nur auf einem kleinen Teil der NC16A-spezifischen Gedächtnis B-Zellen detektiert werden. Dies läßt darauf schließen, daß NC16A-spezifische Gedächtnis B-Zellen nicht vorzugsweise in die Haut einwandern. Dies

wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß B-Zellen nur selten in kutanen Läsionen bei Patienten mit bullösem Pemphigoid gefunden werden (Schaller 1990).

TPO-spezifische Gedächtnis B-Zellen wurden ebenfalls durch die Oberflächenausprägung von IgG identifiziert. Um zwischen naiven und Gedächtnis B-Zellen unterscheiden zu können, wurde bei jedem Spender die Oberflächenausprägung von IgD untersucht. Um aktivierte, Keimzentrums-abstammende TPO-spezifische IgG⁺ B-Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde zusätzlich die Ausprägung von CD38 analysiert. So konnte sichergestellt werden, daß nur ruhende, Immunglobulin Isotyp-gewechselte Gedächtnis B-Zellen in die Analyse einbezogen wurden. Zusätzlich wurde bei einigen Spendern die Ausprägung des kostimulatorischen Moleküls CD80 (Liu, Y. J. 1997) auf TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen analysiert. Die durchgehende Ausprägung von CD80 auf diesen Zellen läßt auf eine verstärkte stimulatorische Wirkung auf T-Zellen schließen (Bar-Or 2001).

4.4 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Frequenz Antigen-spezifischer Gedächtnis B-Zellen und Antigen-spezifischem Antikörpertiter

Die Frequenzen rTT.C-spezifischer IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen aus Blut normaler Blutspender lagen im Bereich von $6,5 \times 10^{-6}$ bis $7,81 \times 10^{-5}$ (n = 13), die der PLA₁B-spezifischen IgG⁺ B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen lagen im Bereich von $2,65 \times 10^{-5}$ bis $4,45 \times 10^{-4}$ (n = 7), die der NC16A-spezifischen IgG⁺ B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen reichte von 1×10^{-5} bis $4,30 \times 10^{-4}$ (n = 14), und die der TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen reichte von 5×10^{-6} bis $8,37 \times 10^{-4}$ (n = 32). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, die sich in früheren Untersuchungen Antigen-spezifischer B-Zellen mittels Analysen unter Bedingungen der limitierenden Verdünnung ergaben (Lanzavecchia 1983). Ausgehend davon, daß im Falle der Autoantigene NC16A und TPO das Antigen ständig im Körper präsent ist, während die Persistenz des Vakzins Tetanus Toxoid und dem Allergen PLA₁B zweifelhaft ist, konnte dieses Ergebnis nicht notwendigerweise erwartet werden. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob Autoantigen-spezifische Gedächtnis B-Zellen die gleiche Lebenserwartung wie Gedächtnis B-Zellen mit Spezifität für ein Vakzin haben.

Es wurde keine statistisch signifikante, lineare Korrelation zwischen der Frequenz IgG⁺ Antigen-spezifischer B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen und dem Serumentiter Antigen-spezifischen IgG, weder für rTT.C in normalen Blutspendern, noch für PLA₁B in allergischen Spendern gefunden. Diese fehlende Korrelation bestätigt die Hypothese, daß lang anhaltende Antikörpertiter nicht durch die kontinuierliche Differenzierung langlebiger Gedächtnis B-Zellen in kurzlebige Antikörperproduzierende Plasmazellen aufrechterhalten werden, sondern durch langlebige Plasmazellen (Manz 1997, Manz 1998, Slifka 1998a, Slifka 1998b, Manz 2002).

TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen wurden in 65% der Patienten mit autoimmuner Thyroiditis detektiert, aber nur in 17% der normalen Blutspender. Diese positive Korrelation der Präsenz zirkulierender TPO-spezifischer IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen mit klinisch manifester autoimmuner Thyroiditis zeigt einen kausalen Zusammenhang. Als direkte Vorgänger für Plasmazellen könnten TPO-spezifische IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen kritisch für die anti-TPO Autoantikörperproduktion sein. Es wurde allerdings keine statistisch signifikante lineare Korrelation zwischen der Frequenz TPO-spezifischer IgG⁺ B-Zellen unter CD19⁺ B-Zellen und dem Serumentiter TPO-spezifischen IgG in Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und normalen Blutspendern gefunden. In 4 der 10 normalen Blutspender mit TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen war sogar überhaupt kein TPO-spezifisches IgG im Serum detektierbar. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine entscheidende Rolle der TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen für die anti-TPO Autoantikörperproduktion.

Die fehlende Korrelation unterstützt zusätzlich die Meinung, daß die humorale und die Gedächtnis B-Zell-Immunität zwei unterschiedlich kontrollierte Formen des immunologischen Gedächtnisses darstellen könnten. Allerdings müssen einige Einwände zu dieser Art der Interpretation erhoben werden: (a) wenn Gedächtnis B-Zellen sich an anderen Stellen des Körpers außer dem peripheren Blut akkumulieren, wäre peripheres Blut keine repräsentative Quelle um die Frequenz dieser Zellen zu bestimmen; (b) wenn zusätzlich zu den Gedächtnis B-Zellen andere Zellen wie T-Helfer-Zellen oder folliculäre dendritische Zellen für die Generierung von Antikörperproduzierenden Plasmazellen verantwortlich wären, könnte ebenfalls keine Korrelation gefunden werden; und (c) wenn die Antikörper-Produktionsraten starken Schwankungen von Individuum zu Individuum unterworfen ist, würde der gleiche Titer zirkulierenden Antikörpers nicht notwendigerweise die gleiche Frequenz an Plasmazellen widerspiegeln.

Wenn Gedächtnis B-Zellen tatsächlich nicht benötigt werden um Antikörpertiter über längere Zeit aufrecht zu erhalten, besteht die Frage ob und wie Gedächtnis B-Zellen zu schützender Immunität, Allergien und Autoimmunität beitragen. Langzeitstudien von Hepatitis B Impfungen zeigten, daß Schutz vor Infektion selbst dann noch bestehen kann, wenn die anti-Hepatitis B Antikörpertiter im Serum unter die Nachweisgrenze gesunken waren. Es wurde auch gezeigt, daß eine schnelle anti-Hepatitis B Antikörperantwort in Individuen induziert werden konnte, die keine nachweisbaren Antikörper mehr hatten (Wainwright 1991, Margolis 1993, Tilzey 1995, West 1996). Die beschleunigte Antikörperantwort nach Restimulation mit dem Antigen ist sehr wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Gedächtnis T- und B-Zellen zurückzuführen. Der schützende Mechanismus durch das Zusammenspiel der schnellen B-Zellgedächtnis Antikörperantwort und der zytotoxischen T-Zellantwort dürfte aber sehr viel komplexer, und nicht alleine durch die bloße Anwesenheit von neutralisierendem Antikörper zu erklären sein. Generell zeigen Gedächtnis B-Zellen einige wirkliche Unterschiede zu naiven B-Zellen, welche eine Rolle bei schützender Immunität spielen könnten: sie benötigen weniger stringente Aktivierungsbedingungen (Kindler 1997, Bernasconi 2002), sie differenzieren effizienter zu Plasmazellen (Arpin 1997), und sie haben die Möglichkeit Gewebe wie zum Beispiel Schleimhäute zu kolonisieren, in die Antigene eindringen können (Liu, Y. J. 1995).

Eine besonders große Relevanz könnten Gedächtnis B-Zellen bei der Antigen-Präsentation haben, da sie im Gegensatz zu naiven B-Zellen eine größere Kapazität besitzen T-Zellen Antigen zu präsentieren (Liu, Y. J. 1995). Dies basiert auf der Beobachtung, daß Gedächtnis B-Zellen viel effizienter spezifisches Antigen über ihren B-Zellrezeptor aufnehmen und T-Zellen präsentieren können (Lanzavecchia 1990). Studien in Mäusen zeigten, daß Autoantigen-spezifische B-Zellen in der Tat eine kritische Rolle als Antigen-präsentierende Zellen für die Generierung von autoimmunen T-Zellantworten spielten (Falcone 1998). Zusätzlich zeigte sich bei einer Untersuchung zum Insulin-abhängigem Diabetes, einer T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankung, daß sich diese Krankheit nicht in Nicht-fettleibigen-diabetischen (NOD) Mäusen (dem best-akzeptiertesten Tiermodell dieser Krankheit) entwickelte, wenn diese Mäuse keine B-Zellen besaßen (Serreze 1996, Serreze

1998). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Bar-Or et al. demonstrierte die Anwesenheit einer speziellen Unterpopulation von Gedächtnis B-Zellen in Blut von normalen, erwachsenen Blutspendern (Bar-Or 2001). Diese Population prägte das für T-Zellen kostimulatorische Molekül CD80 aus. Obwohl sich CD80⁺ Gedächtnis B-Zellen in einem ruhenden Zustand befinden, sind sie signifikant bessere Stimulatoren von T-Zellen als CD80⁻ Gedächtnis B-Zellen. Die in dieser Arbeit vorliegenden Analysen von Blut dreier Patienten mit autoimmuner Thyroiditis, zeigen eindeutig, daß CD80 auf den meisten, wenn nicht sogar auf allen TPO-spezifischen IgG⁺ B-Zellen ausgeprägt wird.

5 Zusammenfassung

Gedächtnis B-Zellen bilden zusammen mit den Antikörper-sezernierenden Plasmazellen das B-Zellgedächtnis des Immunsystems. Ihre relative Wichtigkeit bei der Aufrechterhaltung von protektiver Immunität und bei pathologischen Immunreaktionen wie Allergien und Autoimmunerkrankungen ist bisher noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit von Antigen-spezifischen Gedächtnis B-Zellen im peripheren Blut und dem spezifischen Antikörper im Serum untersucht.

Dazu wurde eine Methode zur Anreicherung von humanen Antigen-spezifischen Gedächtnis B-Zellen aus peripherem Blut und deren anschließende durchflußzytometrischen Detektion und Immunophänotypisierung entwickelt. Sie wurde dazu verwendet, B-Zellen mit Spezifität für rTT.C aus Blut von normalen Blutspendern nachzuweisen, B-Zellen mit Spezifität für PLA₁B im Blut von Wespengiftallergikern zu entdecken, B-Zellen mit Spezifität für NC16A aus Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid zu analysieren und B-Zellen mit Spezifität für die TPO aus Blut von Patienten mit autoimmuner Thyroiditis und normalen Blutspendern zu untersuchen. Die Spezifität der angereicherten Zellen wurde durch die Analyse des von ihnen, nach Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, produzierten Antikörpers mit mehreren Methoden nachgewiesen. Die Immunophänotypisierung zeigte, daß es sich bei den angereicherten Antigen-spezifischen B-Zellen um Gedächtnis B-Zellen handelte. Die Analyse einer Abhängigkeit zwischen der Frequenz von Antigen-spezifischen IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen im peripheren Blut und dem Antigen-spezifischen IgG im Serum ergab keine signifikante, lineare Korrelation. Diese fehlende Korrelation läßt auf eine unabhängige Regulation von Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen schließen.

6 Literaturverzeichnis

- Ada, G. L. (1990). Modern vaccines: The immunological principles of vaccination. *The Lancet* 335:523
- Ahmed, R. und D. Gray (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54
- Alt, F. W., T. K. Blackwell und G. D. Yancopoulos (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238:1079
- Arpin, C., J. Banchemreau und Y. J. Liu (1997). Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J. Exp. Med.* 186:931
- Bachmann, M. F., T. M. Kundig, B. Odermatt, H. Hengartner und R. M. Zinkernagel (1994). Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells. *J Immunol* 153:3386
- Bachmann, M. F., B. Odermatt, H. Hengartner und R. M. Zinkernagel (1996). Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183:2259
- Bar-Or, A., E. M. L. Oliveira, D. E. Anderson, J. I. Krieger, M. Duddy, K. C. O'Connor und D. A. Hafler (2001). Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J Immunol* 167:5669
- Benner, R., W. Hijmans und J. J. Haaijman (1981). The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol* 46:1
- Berg, E. L., T. Yoshino, L. S. Rott, M. K. Robinson, R. A. Warnock, T. K. Kishimoto, L. J. Picker und E. C. Butcher (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 174:1461
- Bernasconi, N. L., E. Traggiai und A. Lanzavecchia (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199
- Borradori, L. und A. Sonnenberg (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112:411
- Burnet, F. M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austr J Science* 20
- Dopp, R., E. Schmidt, I. Chimanovitch, M. Leverkus, E. B. Brocker und D. Zillikens (2000). IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 42:577
- Eisen, H. N. und G. N. Siskind (1964). Variations in affinities of antibody during the immune response. *Biochemistry* 3:996
- Engvall, E. und P. Perlmann (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109:129
- Ershler, W. B., A. L. Moore und M. P. Hacker (1982). Specific in vivo and in vitro antibody response to tetanus toxoid immunization. *Clin Exp Immunol* 49:552
- Fahey, J. L. und S. Sell (1965). The immunoglobulins of mice: the metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. *J. Exp. Med.* 122:41
- Falcone, M., J. Lee, G. Patstone, B. Yeung und N. Sarvetnick (1998). B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161:1163
- Frew, A. J. (1994). Conventional and alternative allergen immunotherapy: do they work? are they safe? *Clin Exp Allergy* 24:416
- Gammon, W. R., J. D. Fine, M. Forbes und R. A. Briggaman (1992). Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* 27:79
- Gatalica, B., L. Pulkkinen, K. Li, K. Kuokkanen, M. Ryyanen, J. A. McGrath und J. Uitto (1997). Cloning of the human type XVII collagen gene (COL17A1), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 60:352
- Giudice, G. J., D. J. Emery und L. A. Diaz (1992). Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 99:243
- Giudice, G. J., D. J. Emery, B. D. Zelickson, G. J. Anhalt, Z. Liu und L. A. Diaz (1993). Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 151:5742
- Goodnow, C. C., R. Brink und E. Adams (1991). Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* 352:532
- Gray, D. (1993). Immunological memory: a function of antigen persistence. *Trends Microbiol* 1:39
- Gray, D. und H. Skarvall (1988). B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336:70

- Hartley, S. B., M. P. Cooke, D. A. Fulcher, A. W. Harris, S. Cory, A. Basten und C. C. Goodnow (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72:325
- Hertl, M. (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 122:91
- Hoffmann, D. R. (1994). Allergens in hymenoptera venom. *Int Arch Allergy Immunol* 104:184
- Hopkinson, S. B., K. S. Riddelle und J. C. Jones (1992). Cytoplasmic domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization. *J Invest Dermatol* 99:264
- Huang, H. J., N. H. Jones, J. L. Strominger und L. A. Herzenberg (1987). Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:204
- Irsch, J., N. Hunzelmann, H. Tesch, H. Merk, E. Maggi, A. Ruffilli und A. Radbruch (1995). Isolation and characterization of allergen-binding cells from normal and allergic donors. *Immunotechnology* 1:115
- Kantor, A. B., I. Gibbons, S. Miltenyi und J. Schmitz (1998). Magnetic cell sorting with colloidal superparamagnetic particles. Cell separation methods and applications. D. Recktenwald and A. Radbruch. New York, Marcel Dekker Inc.: 153.
- Kantor, A. B. und L. A. Herzenberg (1993). Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 11:501
- Kato, K. und A. Radbruch (1993). Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 14:384
- Kelsoe, G. (1996). Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4:107
- Kindler, V. und R. H. Zubler (1997). Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J. Immunol.* 159:2085
- Kocks, C. und K. Rajewsky (1988). Stepwise intracloonal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8206
- Korganow, A. S., H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, R. Pelanda, T. Martin, C. Degott, H. Kikutani, K. Rajewsky, J. L. Pasquali, C. Benoist und D. Mathis (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10:451
- Kremmidiotis, G. und H. Zola (1995). Changes in CD44 expression during B cell differentiation in the human tonsil. *Cell. Immunol.* 161:147
- Kumar, V., J. E. Valeski, T. P. Chorzelski und S. Jablonska (1996). Significance of IgG-subclass antibody determinations in bullous pemphigoid. *J Clin Lab Anal* 10:432
- Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8:773
- Lanzavecchia, A., B. Parodi und F. Celada (1983). Activation of human B lymphocytes: frequency of antigen-specific B cells triggered by alloreactive or by antigen-specific T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 13:733
- Leyendeckers, H., N. Hunzelmann, P. Banga und J. Schmitz (2000). Quantification and characterization of antigen-specific memory B cells. *J Lab Med* 24:365
- Leyendeckers, H., M. Odendahl, A. Lohndorf, J. Irsch, M. Spangfort, S. Miltenyi, N. Hunzelmann, M. Assenmacher, A. Radbruch und J. Schmitz (1999). Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* 29:1406
- Lichtenstein, L. M. (1993). Allergy and the immune system. *Sci Amer* 269:117
- Liu, Y. J. und C. Arpin (1997). Germinal center development. *Immunol. Rev.* 156:111
- Liu, Y. J., C. Barthelemy, O. de Bouteiller, C. Arpin, I. Durand und J. Banchereau (1995). Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 2:239
- Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon und I. C. MacLennan (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929
- Liu, Y. J., J. Zhang, P. J. Lane, E. Y. Chan und I. C. MacLennan (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21:2951
- Liu, Z., L. A. Diaz, J. L. Troy, A. F. Taylor, D. J. Emery, J. A. Fairley und G. J. Giudice (1993). A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 92:2480
- MacLennan, I. C. M. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12:117
- MacLennan, I. C. M. (1995). Autoimmunity. Deletion of autoreactive B cells. *Curr Biol* 5:103

- MacLennan, I. C. M., Y. J. Liu und G. D. Johnson (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol. Rev.* 126:143
- Manz, R. A., M. Löhning, G. Cassese, A. Thiel und A. Radbruch (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 10:1703
- Manz, R. A. und A. Radbruch (2002). Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 32:923
- Manz, R. A., A. Thiel und A. Radbruch (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133
- Margolis, H. S. (1993). Prevention of acute and chronic liver disease through immunization: hepatitis B and beyond. *J. Infect. Dis.* 168:9
- Maruyama, M., K. P. Lam und K. Rajewsky (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407:636
- Mather, E., K. Nelson, J. Haimovitch und R. Perry (1984). Mode of regulation of immunoglobulin μ and δ chain expression varies during B-lymphocyte maturation. *Cell* 36:329
- McIntosh, R., P. Watson und A. Weetman (1998). Somatic hypermutation in autoimmune thyroid disease. *Immunol Rev* 162:219
- McLachlan, S. M. und B. Rapoport (2000). Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase - the common autoantigenic denominator. *Intern Rev Immunol* 19:587
- Miltenyi, S., W. Müller, M. Weichel und A. Radbruch (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231
- Mond, J. J., A. Lees und C. M. Snapper (1995). T cell independent antigens type 2. *Ann Rev Immunol* 13:655
- Morell, A., W. D. Terry und T. A. Waldmann (1970). Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J. Clin. Invest.* 49:673
- Murakami, T. und A. Matsuura (1992). Structure and expression of the rat homologue of CD5. *Sapporo Med. J.* 61:13
- Nakamura, M., S. E. Burastero, Y. Ueki, J. W. Larrick, A. L. Notkins und P. Casali (1988). Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with epstein-barr virus. *J Immunol* 141:4165
- Nemazee, D. und K. Burki (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337:562
- Nossal, G. J. V. (1991). B-cell selection and tolerance. *Curr Opin Immunol* 3:193
- Nossal, G. J. V. (1992). Cellular and molecular mechanisms of B lymphocyte tolerance. *Adv Immunol* 52:283
- Nussenzweig, M. C., A. C. Shaw, E. Sinn, D. B. Danner, K. I. Holmes, H. C. Morse und P. Leder (1987). Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin. *Science* 236:816
- Odendahl, M. (1996). Anreicherung und Detektion Tetanus Toxin spezifischer B Zellen. Institut für Genetik. Köln, Universität zu Köln: 87.
- Okayasu, I., Y. Hara, M. Nakamura und N. R. Rose (1994). Racial and age-related differences in incidence and severity of focal autoimmune thyroiditis. *Am J Clin Pathol* 101:698
- Oshiba, A., H. Renz, J. Yata und E. W. Gelfand (1994). Isolation and characterization of human antigen-specific B lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72:342
- Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B-cell activation. *Ann Rev Immunol* 11:331
- Pernis, B., L. Forni und L. Amante (1970). Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J Exp Med* 132:1001
- Quiding Jarbrink, M., M. Lakew, I. Nordstrom, J. Banchereau, E. Butcher, J. Holmgren und C. Czerkinsky (1995). Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing commitments and cell surface differentiation markers. *Eur J Immunol* 25:322
- Radbruch, A., Ed. (1992). Flow cytometry and cell sorting. Scatchard analysis by flow cytometry, Springer Verlag.
- Raff, M. C., M. Sternberg und R. B. Taylor (1970). Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* 225:553
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 10:97
- Rose, N. R. und I. R. MacKay (1992). In: Rose, N. R. and MacKay, I. R.: The immune response in autoimmunity and autoimmune disease. *The Autoimmune Diseases, Academic Press* II:1
- Rudolphi, U., A. Hohlbaum, B. Lang, H. H. Peter und I. Melchers (1993). The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. Frequencies and specificities of peripheral blood B cells reacting with human IgG, human collagens, a mycobacterial heat shock protein and other antigens. *Clin Exp Immunol* 92:404

- Schaller, J., H. W. Niedecken, E. Biwer, J. A. Stefan, H. W. Kreysel und U. F. Haustein (1990). Characterization of lymphocytic infiltrate cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Dermatol Monatsschr* 176:661
- Scheibel, I., M. W. Bentzon, P. E. Christensen und A. Biering (1966). Duration of immunity to diphtheria and tetanus after active immunization. *Acta Path Microbiol Scand* 67:380
- Schmidt, E., K. Obe, E. B. Brocker und D. Zillikens (2000). Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 136:174
- Serreze, D. V., H. D. Chapman, D. S. Varnum, M. S. Hanson, P. C. Reifsnnyder, S. D. Richard, S. A. Fleming, E. H. Leiter und L. D. Shultz (1996). B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med* 184:2049
- Serreze, D. V., S. A. Fleming, H. D. Chapman, S. D. Richard, E. H. Leiter und R. M. Tisch (1998). B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161:3912
- Siebenkotten, G. und A. Radbruch (1995). Towards a molecular understanding of immunoglobulin class switching. *The Immunologist* 3:141
- Simonsen, O., K. Kjelden und I. Heron (1984). Immunity against tetanus and effect of revaccination 25-30 years after primary vaccination. *Lancet* ii:1240
- Simonsson-Lagerkvist, A. C., C. Furebring und C. A. K. Borrebaeck (1995). Single, antigen-specific B cells used to generate Fab fragments using CD40-mediated amplification or direct PCR cloning. *Biotechnology* 18:862
- Skaria, M., F. Jaunin, T. Hunziker, S. Riou, H. Schumann, L. Bruckner Tuderman, M. Hertl, P. Bernard, J. H. Saurat, B. Favre und L. Borradori (2000). IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol* 114:998
- Slifka, M. K. und R. Ahmed (1998a). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Op. Immunol.* 10:252
- Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire und R. Ahmed (1998b). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8:363
- Slifka, M. K., M. Matloubian und R. Ahmed (1995). Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J. Virol.* 69:1895
- Soh, H., H. Hosokawa, H. Miyauchi, H. Izumi und Y. Asada (1991). The distribution of IgG subclass autoantibodies in bullous pemphigoid analysed by immunofluorescence and immunoblotting. *Arch Dermatol Res* 283:400
- Szakai, A. K., M. H. Kosco und J. G. Tew (1989). Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. *Annu. Rev. Immunol.* 7:91
- Talbot, P. J. und M. J. Buchmeier (1987). Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* 60:485
- Tew, J. G., M. H. Kosco, G. F. Burton und A. K. Szakai (1990). Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 117:185
- Tilzey, A. J. (1995). Hepatitis B vaccine boosting: the debate continues. *The Lancet* 345:1000
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575
- Valentine, M. D., K. C. Schuberth, A. Kagey-Sobotka, D. F. Graft, K. A. Kwitrovich, M. Szklo und L. M. Lichtenstein (1990). The value of immunotherapy with venom in children with allergy to insect stings. *N Engl J Med* 323:1601
- Van den Eertwegh, A. J., R. J. Noelle, M. Roy, D. M. Shepherd, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, W. J. Boersma und E. Claassen (1993). In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J Exp Med* 178:1555
- Vieira, P. und K. Rajewsky (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur. J. Immunol.* 18:313
- Wainwright, R. B., B. J. McMahon, L. R. Bulkow, A. J. Parkinson und A. P. Harpster (1991). Protection provided by hepatitis B vaccine in a yupik eskimo population. *Arch. Intern. Med.* 151:1634
- Weetman, A. P. und A. M. McGregor (1994). Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 15:788
- Wen, L., M. Hanvanich, C. Werner-Favre, N. Brouwers, L. H. Perrin und R. H. Zubler (1987). Limiting dilution assay for human B cells based on their activation by mutant EL4 thymoma cells: total and anti-malaria responder B cell frequencies. *Eur. J. Immunol.* 17:887
- West, D. J. und G. B. Calandra (1996). Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine* 14:1019
- Zillikens, D., J. M. Mascaró, P. A. Rose, Z. Liu, S. M. Ewing, F. Caux, R. G. Hoffmann, L. A. Diaz und G. J. Giudice (1997). A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection

- of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 109:679
- Zinkernagel, R. M. (1997). Protective antibody responses against viruses. *Biol. Chem.* 378:725
- Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, T. M. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet und H. Hengartner (1996). On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 14:333
- Zweiman, B. (1993). The late-phase reaction: role of IgE, its receptor and cytokines. *Curr Opin Immunol* 5:950

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis Mai 2002 unter der Betreuung von Prof. Dr. Roswitha Nischt und Dr. Jürgen Schmitz in den Laboratorien der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach angefertigt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Roswitha Nischt für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jürgen Schmitz, da diese Arbeit nur durch seine Betreuung, kritischen Kommentare, wertvolle Diskussionen, Hilfe, moralische Unterstützung sowie Freundschaft erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Mario Assenmacher, Nicolas Hunzelmann, Johannes Irsch, Stefan Miltenyi, Andreas Radbruch, Alexander Scheffold und den Teilnehmern des MACS-Clubs für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Danken möchte ich auch Andrzej Dzionek, Gregor Winkels und Alexander Horst für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Ich möchte mich auch bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die zu dieser Arbeit auf die eine oder andere Weise beigetragen haben. Namentlich bedanke ich mich bei Ute Behrens-Jung, Helmut Brosterhus, Martin Büscher, Anja Cremer, Sabine Cremer, Silke Deppe, Verena Donatz, Julia Duwendag, Anja Fuchs, Gritt Günther, Susanne Höher, Ian Johnston, Sabine Martin, Sandra Kosten, Katja Petry, Stefan Reininghaus, Jürgen Röck, Petra Schmidt, Monika Steinbrecher, Ingrid Trapp, Hafida Zaim und Monika Zysk.

Ich bedanke mich weiterhin bei den Ärzten Eberhard Voth und Harald Schicha, die mir für die vorliegende Arbeit Patientenproben zur Verfügung gestellt haben. Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Walinski für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Hilfe.

Vielen Dank an die Firma Miltenyi Biotec für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung von Reagenzien.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Elisabeth Busch, meinen Eltern Renate und Ernst Leyendeckers, und Frank Overhoff für die moralische und materielle Unterstützung sowie ihre Offenheit, ihrem Rat und ihre Geduld mir gegenüber in verschiedensten Situationen während meines Studiums und meiner Promotion.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv. Doz. Dr. Roswitha Nischt betreut worden.

Teilpublikationen:

1. H. Leyendeckers, M. Odendahl, A. Löhndorf, J. Irsch, M. Spangfort, S. Miltenyi, N. Hunzelmann, M. Assenmacher, A. Radbruch and J. Schmitz (1999): Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. Eur. J. Immunol. 29:1406-1417
2. H. Leyendeckers, N. Hunzelmann, P. Banga and J. Schmitz (2000): Quantification and characterization of antigen-specific memory B cells. J. Lab. Med. 24:365-370
3. H. Leyendeckers, E. Voth, H. Schicha, N. Hunzelmann, P. Banga and J. Schmitz (2002). Frequent detection of thyroid peroxidase-specific IgG+ memory B cells in blood of patients with autoimmune thyroid disease. Eur. J. Immunol. 32:3126-3132
4. H. Leyendeckers, K. Tasanen, L. Bruckner-Tuderman, D. Zillikens, C. Sitaru, J. Schmitz and N. Hunzelmann. Memory B cells specific for the NC16A domain of the 180 kD bullous pemphigoid autoantigen can be detected in peripheral blood of bullous pemphigoid patients and induced in vitro to synthesize autoantibodies. J. Invest. Dermatol. (in press)

Köln, März 2003

Heike Leyendeckers

Abstract

Both, long-lasting specific antibody responses as well as long-lived memory B cells may contribute to long-term protective immunity and to pathological immune reactions like allergies and autoimmune diseases, but the relative importance is not well understood. In this study, potential correlations between the number of antigen-specific memory B cells in peripheral blood and specific antibody in the serum were analyzed.

A new assay combining immunomagnetic enrichment with multiparameter flow cytometric analysis was developed to quantitate and characterize antigen-specific B cells *ex vivo*. The method was used to enumerate B cells with specificity for: (a) rTT.C in blood of normal donors, (b) B cells with specificity for PLA₁B in blood of wasp venom allergic donors, (c) B cells with specificity for NC16A in blood of patients with bullous pemphigoid and normal donors, and (d) B cells with specificity for TPO in blood of patients with autoimmune thyroiditis and normal donors. The specificity of the enriched cells was verified after proliferation and differentiation into antibody-producing plasma cells by the analysis of the secreted antibody.

Immunophenotyping of the antigen-specific B cells showed that the vast majority displayed all the criteria of isotype-switched memory B lymphocytes. No statistically significant linear correlation between the frequency of IgG⁺ antigen-specific memory B cells and the serum titer of antigen-specific IgG in the serum was found. This finding supports the idea that humoral and memory B cell immunity represent independently controlled forms of immunological memory.

Lebenslauf

Heike Christiane Leyendeckers

Palanterst. 32

50937 Köln

Köln, März 2003

- | | |
|-----------------|--|
| 30. Januar 1969 | geboren als Tochter von Renate und Ernst Leyendeckers in Grefrath |
| 1975 – 1979 | Gemeinschaftsgrundschule in Grefrath |
| 1979 – 1988 | Gymnasium der Liebfrauenschule Mülhausen |
| 1988 | Abitur |
| 1988 – 1990 | Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie Köln |
| 1990 – 1992 | Berufstätigkeit als Biologisch-Technische Assistentin bei der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach |
| 1991 – 1997 | Studium der Biologie an der Universität zu Köln |
| 1993 | Vordiplom |
| 1994 | Praxissemester bei der Firma Amcell Corp. in Sunnyvale, Kalifornien, USA |
| 1997 | Diplom im Fach Biologie an der Universität zu Köln |
| 1997 – 2002 | Promotionsstudium an der Universität zu Köln |
| seit 07/2002 | Berufstätigkeit als Projektleiterin in der Forschung & Entwicklungsabteilung der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach |