

**Isolation und Charakterisierung von Plasmazellen aus dem
peripheren Blut mit besonderer Berücksichtigung IgE
sezernierender Plasmazellen**

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

vorgelegt von

Alexander Horst

aus Rotenburg/Fulda

2002

I

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt
Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 13.07.2002

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.

(Goethe über *Iphigenie*, 1787)

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. AUFREINIGUNG VON PBMC	9
2.2. ANTIKÖRPER.....	9
2.2.1. <i>Monoklonale Antikörper (Klon):</i>	9
2.2.2. <i>Polyklonale Antikörper:</i>	10
2.3. MAGNETISCHE ANREICHERUNG CD138 EXPRIERENDER ZELLEN AUS PBMC.	10
2.4. KULTIVIERUNG DER ANGEREICHERTEN ZELLEN	10
2.5. IMMUNGLOBULIN-ELISA.....	10
2.6. PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CD138 ⁺ ZELLEN.....	12
2.6.1. <i>Oberflächenfärbung der Zellen</i>	12
2.6.2. <i>Oberflächen- und intrazelluläre Färbung der Zellen</i>	12
2.7. DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	13
2.8. ZELLULÄRE AFFINITÄTSMATRIX TECHNOLOGIE.....	13
2.8.1. <i>Herstellung und Aufreinigung verschiedener Fang- und Ankerantikörper</i> 15	
2.8.1.1. Zellkultur	15
2.8.1.2. Aufreinigung der AK über Protein A Sepharose	15
2.8.2. <i>Konjugation verschiedener Fang- und Detektionsreagenzien</i>	16
2.8.2.1. Protokoll zur Kopplung von AK an Biotin bzw. DIG	16
2.8.2.2. Protokoll zur AK-AK bzw. AK-Avidin Kopplung.....	17
2.8.2.3. Protokoll zur AK-PE/APC Kopplung	18
2.8.3. <i>Inhibition der Oberflächen Ig Färbung mit freiem anti-Ig Antikörper</i>	18
2.8.4. <i>Test der für den Sekretionsassay benötigten Reagenzien durch künstliche Beladung der Fangmatrix</i>	19
2.8.4.1. Testsystem für den Sekretionsassay mit AK-AK Fangmatrix.....	19
2.8.4.2. Testsystem für den Sekretionsassay mit Biotin Fangmatrix.....	20
2.8.5. <i>Endgültiges Protokoll für die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie</i>	20
2.9. KORRELATION DER HÄUFIGKEIT IGE SEZERNIERENDER PC UNTER PBMC MIT DEN IGE SERUMTITERN IN PATIENTEN- UND NORMALSPENDERBLUT	22
2.9.1. <i>Intrazelluläre IgE Färbung in angereicherten CD138⁺ PC</i>	22
2.9.2. <i>Detektion IgE sezernierender Zellen mit dem Sekretionsassay</i>	23
2.9.3. <i>Berechnung der Häufigkeit IgE⁺ CD138⁺ im PBMC</i>	23
2.10. ANALYSE PLA-SPEZIFISCHER CD138 ⁺ PC IM VERLAUF DER HYPOSENSIBILISIERUNG MIT INSEKTENGIFT.....	24

3. ERGEBNISSE	25
3.1. MAGNETISCHE ANREICHERUNG FUNKTIONELLER PC	25
3.1.1. <i>Magnetische Sortierung von CD138 exprimierenden Zellen</i>	25
3.1.2. <i>Immunglobulinproduktion der angereicherten Zellen</i>	26
3.1.3. <i>Phänotypische Analyse CD138⁺ PC</i>	27
3.2. DETEKTION ALLER AK SEZERNIERENDEN ZELLEN MIT DER ZELLULÄREN AFFINITÄTSMATRIX TECHNOLOGIE	32
3.2.1. <i>Herstellung und Test geeigneter AK-AK Konjugate</i>	33
3.2.2. <i>Sekretionsassays mit AK-AK Konjugaten</i>	35
3.2.3. <i>Sekretionsassay mit Biotinylierung und Avidin-AK Konjugaten</i>	37
3.3. DETEKTION IGE PRODUZIERENDER PC IM BLUT VON NORMALSPENDERN, ATOPIKERN UND EINEM HYPER IGE PATIENTEN	44
3.3.1. <i>Magnetische CD138 Anreicherung</i>	44
3.3.1.1. <i>Intrazelluläre IgE Färbung in CD138 angereicherten PC</i>	44
3.3.1.2. <i>IgE Produktion der angereicherten PC</i>	46
3.3.1.3. <i>Korrelation der Häufigkeit von IgE⁺ CD138⁺ PC mit dem IgE Serumentiter</i>	47
3.3.2. <i>Detektion IgE sezernierender Zellen mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie</i>	48
3.4. PLA SPEZIFISCHE CD138 ⁺ PC IM VERLAUF DER HYPOSENSIBILISIERUNG MIT INSEKTENGIFT.....	50
4. DISKUSSION	58
4.1. ISOLATION CD138 ⁺ PC AUS DEM PERIPHEREN BLUT	58
4.1.1. <i>PC im Blut sind nur eine von vielen verschiedenen PC Populationen</i>	59
4.1.2. <i>Bei CD138⁺ PC im Blut handelt es sich um frühe PC</i>	59
4.1.3. <i>CD138⁺ PC unterscheiden sich in der Expression ihrer Zielfindungsrezeptoren</i>	60
4.2. ETABLIERUNG DER ZELLULÄREN AFFINITÄTSMATRIX TECHNOLOGIE	62
4.2.1. <i>Es gibt mindestens zwei Populationen CD138⁺ PC im Blut</i>	62
4.2.2. <i>Detektion IgG, IgA und IgE sezernierender Zellen im Blut</i>	62
4.2.3. <i>Diskrepanz des Anteils IgA⁺ Zellen unter PC und Gedächtnis B-Zellen</i>	64
4.3. DETEKTION IGE ⁺ CD138 ⁺ PC	64
4.3.1. <i>Die Zahl IgE⁺CD138⁺ PC korreliert mit dem IgE Serumentiter</i>	65
4.4. CD138 ⁺ PC IM VERLAUF EINER SPEZIFISCHEN IMMUNTHERAPIE MIT INSEKTENGIFT.....	66

4.4.1.	<i>IgE und IgG4 AK im Verlauf der Immuntherapie</i>	66
4.4.2.	<i>Die Immuntherapie verändert verschiedene immunologische Faktoren</i>	67
4.4.3.	<i>PLA-spezifische CD138⁺ PC treten nur kurzzeitig im Blut auf.....</i>	69
5.	ZUSAMMENFASSUNG:.....	71
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	73

Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ASC	Antikörper sezernierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter-Immunsorbenttest
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FcR	Fc Rezeptor
FCS	fötale Kälberserm
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
HIE	Hyper IgE
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MACS	Magnetische Zellsortierung
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC	Plasmazelle
PE	Pycoerythrin
PerCP	Perdine Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PLA	Phospholipase
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtsstreulicht

1. Einleitung

Antikörper spielen die zentrale Rolle in humoralen Immunantworten, die beispielsweise durch Bakterien oder Toxine ausgelöst werden. Antikörper kommen entweder in zellmembrangebundener oder in löslicher Form vor und erkennen die native Form des Antigens. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Antikörper wirken können. Bei der Neutralisation binden sie an das Toxin oder Oberflächenstrukturen des Pathogens, die für die Bindung an die Zielzellen nötig sind. Beides führt dazu, dass die Infektion weiterer Zellen verhindert wird. Die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche des Pathogens wird Opsonisierung genannt und ermöglicht zum einen den Verdau durch phagozytierende Zellen oder auch die Lyse des Pathogens durch zytotoxische Zellen (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität). Zum anderen kann die Opsonisierung auch zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Dieses besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen und die Bindung eines Antikörpers an eines dieser Proteine führt zu einer Komplementkaskade. Diese führt entweder zur direkten Abtötung des Pathogens, zum Anlocken inflammatorischer Zellen oder zur Opsonisierung des Pathogens.

Um die Antikörperproduktion in B-Zellen zu induzieren, sind zwei Voraussetzungen nötig. Zunächst müssen die zellmembrangebundenen Antikörper oder Immunglobuline (Ig) durch ihr spezifisches Antigen kreuzvernetzt werden. Dieses Signal alleine würde jedoch zum Tod der B-Zelle führen und erst ein Signal durch T-Zellen mit gleicher Spezifität führt zur Aktivierung der B-Zelle. Bei diesem Signal handelt es sich um CD40-Ligand Bindung an CD40. Während CD40 konstitutiv von B-Zellen exprimiert wird, wird CD40-Ligand auf T-Helferzellen hochreguliert, nachdem diese durch dendritische Zellen aktiviert wurden. Beide Signale gemeinsam führen zur klonalen Expansion der B-Zelle und anschließender Keimzentrumsbildung. Von den T-Zellen während der Aktivierung gebildete Zytokine wie beispielsweise Interleukin (IL)-4 können die klonale Expansion der B-Zellen beeinflussen. Im neu entstandenen Keimzentrum findet die somatische Hypermutation der proliferierenden B-Zellen und ihre anschließende affinitätsgesteuerte Selektion statt. In Abhängigkeit von den Zytokinen, die durch die T-Helferzellen gebildet werden, ändern sich die Produkte des Antikörper-Klassenwechsels.

Die Antigenbindungsstelle der beiden variablen Domänen eines Antikörpers legt die Spezifität der Antikörperantwort fest. Dagegen ist die Antikörperklasse und damit verbunden die Effektorwirkung durch die konstante Region der schweren Kette definiert. So sind Antikörper der Klasse IgM in der Lage, Pentamere zu bilden. Dies bringt in frühen

Immunantworten einen enormen Vorteil, da die noch geringe Affinität der Antikörper zu ihrem Antigen durch Erhöhung der Zahl an Antigenbindungsstellen somit kompensiert werden kann. IgG1 und IgG3 werden vor allem in sekundären Immunantworten gegen Viren gebildet, da beide über die Bindung an Fc-Rezeptoren Makrophagen zur Phagozytose aktivieren können. Zusätzlich spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems. Während IgG2 hauptsächlich in Immunantworten gegen bakterielle Polysaccharide exprimiert wird, dienen IgG4 und IgE Antikörper dem Schutz des Körpers gegen Parasiten. Andererseits spielen sie auch bei Allergien eine entscheidende Rolle (1). IgA1 und IgA2 schließlich sind im Menschen die wichtigsten Antikörperklassen bei Immunantworten in der Mukosa, da sie als einzige Antikörperklasse in der Lage sind, die Basalmembran zu durchqueren.

Wie bereits erwähnt, sind bestimmte Zytokine an der Steuerung des Ig Klassenwechsels beteiligt. So ist mittlerweile bekannt, dass IL-4 beim Menschen den Klassenwechsel zu IgE und IgG4 induziert (2, 3) während TGF- β beispielsweise für den Klassenwechsel zu IgA1 und IgA2 verantwortlich ist (4). Da im Immunsystem viele entgegengesetzt wirkende Zytokine wie IL-4 und IFN- γ bekannt sind, überrascht es auch nicht, dass IFN- γ den durch IL-4 induzierten Klassenwechsel zu IgE und IgG4 inhibiert (5).

Nach erfolgreicher Reifung und Selektion in den Keimzentren verlassen die B-Zellen die Keimzentren entweder als Gedächtnis B-Zellen oder Plasmazellen (PC) (6), deren einzige Aufgabe es ist, große Mengen an Ig zu sezernieren. Der dazugehörige Regulationsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheint es, dass zunächst der Kontakt zwischen CD40 und CD40L nötig ist, um die Zellen zur Proliferation anzuregen. Kommt es anschließend zur CD27-CD70 Interaktion, so induziert dies die Entwicklung zur PC, während die Bindung von CD134 an CD134L die Ig Produktion verstärkt (7, 8). Bleiben die beiden letzten Signale aus, so differenzieren die B-Zellen zu Gedächtnis B-Zellen (7).

Die entstehenden PC wandern anschließend über die Blutbahn in die verschiedenen Gewebe wie Knochenmark, Milz, Haut oder Schleimhäute. IgG sezernierende PC wandern ins Knochenmark, wo sie für 90% der IgG Produktion zuständig sind. Hingegen kommen IgA sezernierende PC in der Lamina Propria der Schleimhäute vor, während in der Haut, der Lunge und im Verdauungstrakt ein Großteil der IgE Produktion stattfindet (113).

Lange Zeit hat man angenommen, dass PC eine relativ kurze Lebensdauer von wenigen Wochen haben und dass lang anhaltende Antikörpertiter im Serum nur durch kontinuierliche Neubildung von PC aus dem Gedächtnis B-Zell Pool aufrechtzuerhalten sind. Dies setzt persistierende Antigene voraus, mit denen die Gedächtnis B-Zellen

restimuliert werden können (9). Die Arbeiten von Manz et al. (10, 11) und Slifka et al. (12) zeigen jedoch deutlich, dass PC eine sehr viel längere Lebenszeit besitzen können als bislang angenommen. Außerdem legen einige Arbeiten neuerer Zeit die Vermutung nahe, dass lang anhaltende Ig Serumtiter auch ohne persistierendes Ag bestehen können (10-13). Im Rahmen der Plasmazellentwicklung kann es jedoch auch zu unangebrachten Immunantworten oder aber Immunreaktionen gegen körpereigene Gewebeantigene kommen. Unangebrachte Immunantworten beispielsweise sind allergische Reaktionen gegen ein an sich harmloses Antigen bzw. Allergen. Allergische Reaktionen reichen von der laufenden Nase bei Heuschnupfen bis hin zum anaphylaktischen Schock, der lebensbedrohend sein kann. Bei allergischen Reaktionen werden beim ersten Kontakt mit dem Allergen T-Helferzellen aktiviert, die, IL-4 sezernierend, in den Allergen-spezifischen B-Zellen den Klassenwechsel zu IgE induzieren, einer Antikörperklasse, die üblicherweise gegen Parasiten gerichtet ist. Das gebildete Allergen-spezifische IgE wird auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen durch hochaffine Fc ϵ -Rezeptoren (Fc ϵ RI) und niedrigaffine Fc ϵ -Rezeptoren (Fc ϵ RII, CD23) gebunden. Bindet das Allergen an diese Antikörper, so werden die Fc ϵ R kreuzvernetzt, was zur Degranulierung der Mastzellen und Basophilen führt. Dabei wird neben Zytokinen und Chemokinen auch in der Granula vorhandenes Histamin freigesetzt, welches gefäßerweiternd wirkt und zu den typischen Schwellungen und Rötungen führt (14, 15). Warum die T-Helferzellen zu Beginn der Immunantwort IL-4 produzieren ist noch ungeklärt. Da IL-4 den Klassenwechsel sowohl zu IgE als auch zu IgG4 induziert, ist es wichtig zu wissen, welche möglicherweise fehlenden Faktoren den Klassenwechsel zu IgG4 induzieren, da dies unter Umständen eine allergische Reaktion verhindern könnte. Es erscheint möglich, dass die IL-4 Konzentration eine wichtige Rolle spielt und dass geringe IL-4 Konzentrationen den Klassenwechsel zu IgG4 induzieren (16).

Bis heute gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit der Analyse von PC aus dem peripheren Blut beschäftigen. Dies hat zum einen den Grund, dass die Häufigkeit der PC im Blut sehr gering ist. In gesunden Personen, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine humorale Immunantwort existiert, liegt diese um $1 \cdot 10^{-4}$. Im Knochenmark oder den Schleimhäuten hingegen liegt die Häufigkeit etwa um den Faktor 10-100 höher, was die Analyse der Zellen sehr erleichtert und dazu geführt hat, dass PC in diesen Geweben sehr gut charakterisiert sind. Allerdings ist Blut sehr viel leichter erhältlich als Proben von Knochenmark, Tonsillen oder Schleimhäuten, so dass Blut eine unverzichtbare Quelle für PC darstellt. Zu Beginn standen, bedingt durch die niedrige PC Häufigkeit, Erkrankungen

im Mittelpunkt des Forscherinteresses, bei denen die Zahl der PC stark erhöht ist, wie beispielsweise das Multiple Myelom und das Reaktive Plasmazytom.

Beim Multiplen Myelom handelt es sich um einen Tumor der zur krankhaften Vermehrung von reifen mono- oder oligoklonalen PC, die letztendlich zur Zerstörung des Knochenmarks und damit zum Tode führt. Im Verlauf der Krankheit gelangen große Mengen an PC aus dem Knochenmark ins Blut, wo sie sehr leicht analysiert werden können (17-19). Der Nachteil dieser Untersuchungen ist jedoch die Tatsache, dass es sich bei den untersuchten Zellen um pathologische Zellen handelt, die sich vom Phänotyp erheblich von ihrem gesunden Gegenpart unterscheiden (20, 21) und somit keine Rückschlüsse auf die PC einer gesunden Person zulassen.

Kürzlich untersuchten Jago et al. PC aus dem Blut von Patienten mit Reaktivem Plasmazytom (22, 23). Hierbei treten verstärkt gutartige, polyklonale Plasmablasten und Plasmazellen auf.

Eine Methode zum Nachweis Antikörper-sezernierender Zellen (ASC) ist der ELISPOT Assay. Dabei wird ein sich in einem Kulturgefäß befindliches Filterpapier mit Antikörpern gegen Ig beschichtet. Anschließend werden entweder komplette mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oder aufgereinigte B-Zellen für mehrere Tage auf dem Filterpapier kultiviert und zur Antikörperproduktion stimuliert. Das sezernierte Ig bindet an der Stelle, an der sich die produzierende B-Zelle befindet, an den Antikörper auf dem Filter. Gibt man nun erst einen an Enzym gekoppelten anti-Ig Antikörper und anschließend Substrat hinzu, so erfolgt eine Farbreaktion, die zu charakteristischen Flecken auf dem Filterpapier führen. Diese werden anschließend ausgezählt, wobei jeder Fleck eine sezernierende B-Zelle repräsentiert. Diese Methode war lange Zeit die beste Möglichkeit ASC bzw. PC im Blut auch von Normal Spendern nachzuweisen und zu quantifizieren (24, 25, 26, 27). Leider ist es mit dem ELISPOT nicht möglich, eine detaillierte phänotypische Analyse der Zellen vorzunehmen, weshalb einige Arbeitsgruppen versuchten, PC aus dem Blut durchflusszytometrisch zu charakterisieren (28, 29).

Die Durchflusszytometrie am FACS erlaubt zwar die Multiparameteranalyse und damit die detaillierte Analyse von PC, jedoch ist dies aufgrund der schon erwähnten sehr niedrigen Zellhäufigkeit im Blut ohne vorherige Anreicherung nur schwer möglich. Es gibt zwar einige Oberflächenmarker wie CD38 und CD27, die auf PC hochreguliert werden, sie eignen sich jedoch nicht als Marker für die direkte Anreicherung von PC, da diese auch auf anderen Zelltypen vorkommen.

Syndekan-1 bzw. CD138 hingegen wird im Blut ausschließlich auf PC und ansonsten lediglich auf Epithelzellen exprimiert. Es wurde auf PC im Knochenmark und im Blut,

nicht jedoch auf prä-Keimzentrums B-Zellen nachgewiesen (21, 30). Syndekan-1 ist ein Heparansulfat-Proteoglykan, das die Adhäsion an Kollagen vom Typ I vermittelt (31, 32) und scheinbar eine wichtige Rolle für die Adhäsion vom PC an Stromazellen im Knochenmark spielt (33, 34).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich CD138 für die direkte Anreicherung von PC aus dem peripheren Blut von Normal Spendern eignet. Dazu wurde der CD138 Antikörper an superparamagnetische Mikropartikel gekoppelt. Anschließend wurde versucht, mit den CD138-Mikropartikeln PC aus dem Blut über das MACS System magnetisch anzureichern. Die isolierten Zellen wurden einer detaillierten phänotypischen Analyse und funktionellen Tests unterzogen, womit gezeigt werden konnte, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um funktionelle PC handelt. Da nicht alle ASC CD138 exprimieren (22, 35), wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit versucht, alle ASC im Blut zu identifizieren und anschließend zu charakterisieren. Dazu wurde die von Manz et al. entwickelte Methode der zellulären Affinitätsmatrix Technologie benutzt (36) und versucht, diese auf die in diesem Fall vorhandenen Erfordernisse anzupassen. Prinzipiell handelt es dabei um einen ELISA auf der Zelloberfläche. PBMC werden mit einer künstlichen Matrix bestückt, die in der Lage ist, von den Zellen sezernierte Moleküle, wie z.B. Zytokine einzufangen. Damit es nicht zu unspezifischen Hintergrundfärbungen kommt, sind die Bedingungen so zu wählen, dass nur die Zelle das Molekül einfangen kann, die es sezerniert hat. Die eingefangenen Moleküle können dann mit Fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Somit ist man in der Lage, auf Einzelzellniveau lebende Zellen zu charakterisieren und falls erwünscht auch weiterzuverwenden. In dieser Arbeit wurde die Matrix und das Detektionssystem so konzipiert, dass alle Zellen, die spontan, ohne weiteren Stimulus Ig sezernieren, identifiziert werden können. Mit geeigneten Detektionssystemen hat man beispielsweise die Möglichkeit, spezifisch IgA, IgG oder IgE sezernierende Zellen zu untersuchen oder gar Antigen-spezifische Zellen nachzuweisen, indem man den spezifischen Antikörper mit seinem markierten Antigen färbt. Letztendlich sollte es auch möglich sein, mit an Mikropartikel gekoppelten Detektionsantikörpern sezernierende Zellen magnetisch anzureichern. Als größtes Hindernis bei der Etablierung dieser Methode stellte sich die Tatsache dar, dass Zellen mit Oberflächen Ig oder Zellen mit Fc Rezeptoren, die Ig binden können, natürlich auch von den Detektionsantikörpern angefärbt werden. Diese stellen somit eine sehr große Population von Zellen dar, die einen unerwünschten Hintergrund bilden, in dem die kleine Population sezernierender Zellen nicht ohne weiteres detektierbar ist. Aus diesem Grunde wurden einerseits zu Beginn des

Versuchs hintergrundbildende Zellen so weit wie möglich depletiert. Andererseits musste erreicht werden, dass durch geeignete Wahl der Detektions- und Fangantikörper und gute Konjugate die spezifische Färbung deutlich heller als die Hintergrundfärbung ist.

Nachdem gezeigt wurde, dass man sowohl mit der magnetischen CD138 Anreicherung als auch mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie funktionelle PC isolieren bzw. detektieren kann, stellte sich die Frage, welche Rolle diese Zellen bei Allergien spielen. Der kritische Schritt auf dem Weg zu einer allergischen Reaktionen ist die fälschlicherweise eingeleitete Produktion von IgE Antikörpern. Bei Atopikern, Personen, die an einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I leiden, findet man IgE Serumtiter vor, welche die normalen Werte um ein 10-1000-faches überschreiten (37-39). Vergleichbares findet man auch in Patienten mit Hyper IgE Syndrom (HIE), die an immer wieder auftretenden Infektionen, Abzessen der Haut und Atemwege sowie einem typischen Gesichts-Phänotyp leiden und meist extrem erhöhte IgE Titer aufweisen (40-42). Die in Allergien stark erhöhten Serumtiter sind über Monate und Jahre vorhanden und es ist noch umstritten, ob für die Aufrechterhaltung des Titers persistierendes Antigen notwendig ist. Es gibt jedoch einige Publikationen, die zeigen, dass dies auch ohne persistierendes Antigen möglich ist (10-13).

Trotz der großen Bedeutung von IgE für allergische Reaktionen ist der Mechanismus, der zur Aufrechterhaltung des IgE Serumtiters führt, bislang noch wenig untersucht. Es gibt einige Arbeitsgruppen, die in der Lage waren, spontan IgE sezernierende Zellen im Blut von Patienten mit IgE vermittelten Erkrankungen nachzuweisen (37-39, 43-47). Mittels ELISPOT und ELISA wiesen sie IgE sezernierende B-Zellen in Patienten mit HIE und atopischer Dermatitis, jedoch nur vereinzelt in Normalspendern nach. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der detektierten Zellen mit dem IgE Serumtiter korreliert.

In dieser Arbeit wurden PC aus dem Blut von Normalspendern, Atopikern und einem Patienten mit HIE mittels CD138-Mikropartikeln angereichert. Um eine detaillierte Analyse der sehr seltenen Zellen aus den relativ geringen Mengen an Patientenblut zu ermöglichen, wurde eine verbesserte Färbetechnik entwickelt. Dabei wurden die Zellen auf der zweiten Anreicherungssäule, auf der sie magnetisch immobilisiert waren, mehrfach auf der Oberfläche sowie intrazellulär gefärbt und gewaschen. Diese Methode hat den Vorteil, dass es so gut wie keine Zellverluste gibt, die normalerweise durch Waschschriffe in Reaktionsgefäßen auftreten. Durch eine intrazelluläre IgE Färbung wurde die genaue Häufigkeit der CD138⁺ IgE⁺ Zellen bestimmt und mit den gefundenen IgE Serumtitern korreliert. Zusätzlich wurde mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie die Häufigkeit aller IgE sezernierenden PC bestimmt. Diese Ergebnisse wurden mit denen aus der

intrazellulären Färbung verglichen und es wurde ermittelt, wie viele der sezernierenden Zellen tatsächlich CD138 exprimieren.

Eine häufig angewandte Methode, Insektengiftallergien zu behandeln ist die Hyposensibilisierung (48, 49). Sie setzt bei der Ursache der Allergie an und versucht, die Toleranz gegenüber dem Allergen zu steigern. Dabei wird das Insektengift in festgelegten Zeitabständen subkutan gespritzt. Die Dosis des Insektengifts wird mit jeder Injektion langsam bis zu einer maximal verträglichen Dosis gesteigert. Die Behandlung führt zwar nicht dazu, dass die Allergie verschwindet, sie bewirkt jedoch in den meisten Fällen, dass sich der Körper langsam an das Allergen gewöhnt, also hyposensibler wird und bei einem Insektenstich nicht mehr übertrieben reagiert. Die Gesamtdauer der Behandlung beträgt mehrere Jahre, wobei meist bereits nach mehreren Monaten eine Sensibilisierung erreicht wird.

Noch ungeklärt sind die genauen immunologischen Grundlagen für den Erfolg der Hyposensibilisierung, da es Fälle gibt, in denen nach einer Behandlung der spezifische IgE Serumtiter unverändert hoch war, aber nach einem Insektenstich dennoch keine allergische Reaktion erfolgte. Möglicherweise werden durch die zunehmend höheren Dosen von Insektengift die T-Zellen anergisiert. In einigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen bereits einige Wochen nach Beginn der Hyposensibilisierung nach Stimulation mit dem jeweiligen Allergen weder IL-4 noch IFN- γ sezernieren (50, 51). Weitere Studien wiesen die Produktion großer Mengen IL-10 durch die Allergen-spezifischen T-Zellen nach (52-55), ein Zytokin, was für seine inhibitorische Wirkung bekannt ist (56, 57). Eine weitere diskutierte Möglichkeit ist die Verschiebung des IL-4:IFN- γ Verhältnisses hin zu IFN- γ (54, 58-61). Dies könnte zur Bildung anderer Antikörperklassen als IgE führen. So wurde schon mehrfach gezeigt, dass die Bildung von Allergen-spezifischem IgG4 ein Schlüssel zum Erfolg der Therapie ist, indem es IgE Antikörper verdrängt und damit die IgE vermittelte allergische Reaktion unterbinden kann (50, 62-66). IgG4 ist, wie bereits erwähnt, ein Ig, zu dessen Klassenwechsel, wie auch für IgE, IL-4 nötig ist (2, 3). Welche Faktoren letztendlich zur Bildung von Allergen-spezifischem IgG4 führen, ist noch ungeklärt. Aus diesem Grunde beschäftigt sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung von Allergen-spezifischen PC während der Hyposensibilisierung von Bienen- und Wespengiftallergikern. Als Allergen zur Detektion von spezifischen PC wurden Phospholipase A2 (PLA2) bzw. Phospholipase A1b (PLA1b) benutzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung wurden aus 40 ml Patientenblut PC isoliert und auf PLA2- bzw. PLA1b-spezifische Antikörper der Klassen IgE, IgG und IgG4 untersucht. Ziel war es, zu analysieren, ob im Verlauf der Therapie

weniger Allergen-spezifisches IgE sezernierende PC und statt dessen mehr Allergen-spezifisches IgG4 oder IgG sezernierende PC gebildet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Aufreinigung von PBMC

Buffy coats wurden vom Institut für Transfusionsmedizin (Städtisches Krankenhaus Mehrheim) oder der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Köln besorgt. Aus diesen 50-70 ml Erythrozyten- und Lymphozytenkonzentrat wurden PBMC mittels LeucoSep Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) und Ficoll-Gradientenzentrifugation (Pharmacia, Uppsala, Schweden) isoliert. In Experimenten mit Patientenblut dienten 40 ml Vollblut mit Heparin als Antikoagglutinant als Ausgangsmaterial. Soweit erforderlich wurden die Seren bei -20°C eingefroren. Alle Patienten wurden über Sinn und Zweck der Versuche informiert und erklärten sich mit einer Blutspende einverstanden.

2.2. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden während dieser Arbeit für durchflusszytometrische Analysen und ELISAs benutzt:

2.2.1. Monoklonale Antikörper (Klon):

CD3 (OKT3) von Ortho Biotech Products (South Raritan, NJ); CD14 (M \square P9), CD20 (Leu-16), CD27 (L128), CD69 (L78), CD71 (L01.1) und anti-IgD (TA4.1) von BD Biosciences (San Jose, CA, USA); CD14 (TÜK4), CD19 (SJ25-C1), CD138 (B-B4), CD45 (5B1), anti-HLA-DR (910/D7) und anti-NP von Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland); CD123 (AC145) von Amcell (Sunnyvale, CA, USA); CD21 (B-ly4), CD28 (CD28.2), CD40 (5C3), CD44 (G44-26), anti-VLA-4/CD49d (9F10), anti- \square 7 Integrin (FIB504), anti-IgA (G18-1), anti-IgA (G20-359), anti-IgE (G7-18), anti-IgE (G7-26), anti-IgM (JDC-15) und anti-IgM (G20-127) von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-VLA-5/CD49e (SAM-1), anti-IgG (JDC-10) und anti-IgM (SA-DA4) von SBA (Birmingham, AL, USA); CD22 (6B11) und CD86 (HA5.2B7) von Coulter-Immunotech (Marseilles, Frankreich); CD80 (DAL-1) von CLB (Amsterdam, Niederlande); anti-IgG (TM15) von Serotec (Oxford, Großbritannien); anti-CLA (HECA-452) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Butcher (Department of Pathology, Stanford University, Stanford, CA, USA); CD25 (4E3) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Knapp (Institut für Immunologie, Universität zu Wien, Wien, Österreich).

2.2.2. Polyklonale Antikörper:

Ziege F(ab')₂ anti-human IgG.Biotin (SBA)

2.3. Magnetische Anreicherung CD138 exprimierender Zellen aus PBMC

PBMC wurden bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ /ml für 30 min bei 4°C mit CD138-Mikropartikeln (Titer 1:5) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen auf eine mit PBS/EDTA/BSA äquilibrierte MS Säule gegeben, die sich im Magnetfeld eines Permanentmagneten befand, und dreimal mit 0,5 ml PBS/EDTA/BSA gewaschen. Die auf der Säule zurückgehaltenen Zellen wurden mit 1 ml PBS/EDTA/BSA außerhalb des Magnetfelds von der Säule gespült und direkt auf die zweite MS Säule gegeben, wo ein weiterer Anreicherungschrift zur Erhöhung der Reinheit erfolgte. Soweit erforderlich, wurden vor der Anreicherung etwa $1 \cdot 10^6$ PBMC zur Bestimmung der Häufigkeit CD138⁺ Zellen entnommen.

2.4. Kultivierung der angereicherten Zellen

Um zu testen, ob es sich bei den angereicherten Zellen um funktionelle PC handelt, wurden unseparierte PBMC, CD138 depletierte PBMC und CD138 angereicherte Zellen für 48 h in Kultur genommen. Dies geschah mit RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Groß Britannien) unter Zugabe von 10% FCS (Life Technologies), 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Life Technologies), 1 μ M L-Alanyl-Glutamin (Life Technologies), 0,05 mM β -Merkaptoethanol (Life Technologies) und 1 mM Pyruvat (Life Technologies). Die Zellen wurden bei einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^4$ /ml kultiviert und die Überstände bis zur Ig Bestimmung mittels ELISA bei -70°C eingefroren.

2.5. Immunglobulin-ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunosorbenttest (ELISA) basiert auf der spezifischen Antigenerkennung von Antikörpern. Beim hier verwendeten Sandwich-ELISA wird der Primärantikörper auf einem Kunststoffträger, einer 96-Loch Polystyren-Mikrotitrationsplatte, immobilisiert. Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit einem inerten Protein, hier BSA, wird das gelöste Antigen (Standard und Proben)

hinzugegeben. Der quantitative Nachweis von gebundenem Antigen erfolgt in mehreren Schritten über eine Farbreaktion. Das Antigen wird durch einen biotinylierten Sekundärantikörper und enzymgekoppeltes Streptavidin, hier Streptavidin-Alkalische Phosphatase, markiert. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat, 4-Nitrophenylphosphat, in ein farbiges Produkt, Nitrophenol, um, das photometrisch bei 405 nm quantifiziert wird.

	1° Antikörper	2° Antikörper (Biotin)
IgG-ELISA	JDC-10	Ziege F(ab') ₂ anti-human IgG
IgA-ELISA	G18-1	G20-359
IgM-ELISA	JDC-15	G20-127
IgE-ELISA	G7-18	G7-26

Rekombinate Standards:

Als rekombinante Standards wurden folgende Proteine benutzt. Aufgereinigtes humanes IgA aus Plasma (Calbiochem, San Diego, CA), aufgereinigtes IgE aus Myelomplasma (Calbiochem), aufgereinigtes IgM aus Plasma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) und Fc Receptor Blocking Reagent (Miltenyi Biotec), was aus aufgereinigtem IgG besteht.

Die 96-Loch-Mikrotitrationsplatte (Greiner) wurde mit 50 µl/Loch des 1° Antikörpers (2 - 5 µg/ml) in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,2 bei 4°C über Nacht beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl/Loch 0,05% Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat, Sigma-Aldrich) in PBS (PBST) wurde 30 min bei RT mit 200 µl/Loch PBST/BSA/Azid blockiert. Verdünnungsreihen von Standards und Kulturüberständen in PBST/BSA/Azid wurden erstellt und 50 µl in jedes Loch gegeben. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C. Dann wurde die 96-Lochplatte dreimal mit 200 µl/Loch PBST gewaschen und anschließend mit biotinyliertem 2° Antikörper bei einer Konzentration von 2 - 5 µg/ml in PBST/BSA/Azid für 60 min bei 37°C inkubiert. Wieder wurde dreimal mit 200 µl/Loch PBST gewaschen und 50 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:3000) (Boehringer Mannheim, Mannheim) in PBST/BSA/Azid für 60 min bei 37°C in jedes Loch gegeben. Nach fünfmaligem Waschen mit 200 µl/Loch PBST wurde mit 50 µl/Loch Substrat (Natrium-p-Nitrophenylphosphat, 0,4 mg/ml, Boehringer Mannheim) in Substratpuffer (Boehringer Mannheim) bei RT inkubiert. Nach ca. 1 h wurde die Extinktion bei 405 nm in einem Filter-Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gemessen.

2.6. Phänotypische Charakterisierung der CD138⁺ Zellen

Aufgrund der zum Teil sehr geringen Zellzahlen, insbesondere in Proben von Patienten, wurde eine neue Methode zur Färbung der angereicherten Zellen entwickelt. Diese hat den Vorteil, dass man, im Gegensatz zu herkömmlichen Färbemethoden in Eppendorfgläsern, nur sehr geringe Zellverluste hat, da alle Färbeschritte und insbesondere die Waschschriffe auf der zweiten Anreicherungssäule vor der Elution der Zellen stattfinden. Für jeden Färbeansatz wird hierbei eine MS Säule benötigt.

2.6.1. Oberflächenfärbung der Zellen

Die Zellen wurden nach der Elution von der ersten MS Säule auf die zweiten Säulen verteilt und einmal mit 500 μ l PBS/EDTA/BSA gewaschen. Dann wurde 100 μ l Färbelösung auf die Zellen gegeben und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Fall von indirekten Färbesystemen wie Biotin oder Digoxigenin (DIG) erfolgte nun ein weiterer Waschschriff mit PBS/EDTA/BSA, gefolgt von einer weiteren Inkubationsphase mit dem entsprechenden Sekundärantikörper. In jedem Fall müssen vor der Elution der angereicherten und gefärbten Zellen mit 500 μ l PBS/EDTA/BSA mindestens drei Waschschriffe erfolgt sein.

2.6.2. Oberflächen- und intrazelluläre Färbung der Zellen

Um Zellen intrazellulär färben zu können, wurden diese zuerst mit Inside Fix (Miltenyi Biotec) fixiert und dann mit Inside Perm (Miltenyi Biotec) permeabilisiert. Aufgrund der Fixierung mussten die Zellen mit PBS/EDTA von der ersten Säule eluiert werden und die zweite Säule musste nach Äquibrierung mit PBS/EDTA/BSA mit PBS/EDTA gespült werden. Ansonsten würde das durch die Fixierung kreuzvernetzte BSA die Zellen verkleben. Nach der 20 minütigen Fixierung wurden die Zellen direkt auf die zweite Säule gegeben und einmal mit 500 μ l PBS/EDTA gewaschen. Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte, wie bereits in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, mit PBS/EDTA/BSA. Für die anschließende intrazelluläre Färbung musste während der gesamten Prozedur Inside Perm benutzt werden. Abschließend wurde noch einmal mit PBS/EDTA/BSA gespült, um das in Inside Perm vorhandene Saponin aus der Zellmembran zu waschen. Danach wurden die Zellen eluiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.7. Durchflusszytometrie

Die Prinzipien der Durchflusszytometrie sind anderweitig ausführlich beschrieben (114). In dem in dieser Arbeit verwendeten FACScalibur (BD Biosciences) passieren die fluoreszent markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander 2 Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Diodenlaser. Zum einen werden hierdurch geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in geringem Winkel (3° – 10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC), das in erster Näherung mit der Zellgröße korreliert, und das um 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht (SSC), das mit der Granularität und Membranfaltung korreliert, gemessen. Zur Messung von Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen stehen zudem 4 Systeme aus Bandpassfiltern und Photoröhren zur Verfügung. Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlänge 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3) und über die Anregung des Diodenlasers zusätzlich die Fluoreszenz der Wellenlänge 661 nm (FL4) gemessen werden. Damit ist bei einer großen Zahl von Zellen eine schnelle, quantitative, 6 Parameter umfassende Analyse möglich. FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, Fluoreszenz-Signale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. In Abhängigkeit der Frequenzen positiver Zellen wurden alle isolierten Zellen gemessen und mit dem CellQuest-Programm (BD Biosciences) analysiert. Die Daten wurden entweder als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale Punktfeld-Analysegraphen, bei denen jeder Punkt einer Zelle entspricht, dargestellt. Als Fluorochrome wurden FITC (FL1), PE (FL2), PerCP, Propidiumiodid (beide FL3) und APC sowie Cy5 (beide FL4) verwendet. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden über die Streulichteigenschaften und zusätzlich, solange keine intrazellulären Färbungen durchgeführt wurden, mit Propidiumiodid (PI) ausgegrenzt.

2.8. Zelluläre Affinitätsmatrix Technologie

Die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie, oder im folgenden auch kurz Sekretionsassay genannt, wurde von Manz et al. ursprünglich entwickelt um Zytokin sezernierende T-Zellen und Ig sezernierende Hybridomzellen nachzuweisen (36). Dazu wurden alle Zellen zuerst biotinyliert und dann eine IFN- γ spezifische Fangmatrix auf die Zellen aufgebracht. Dies geschah durch Inkubation mit einem Avidin-IFN- γ Konjugat. Die Zellen wurden anschließend für einige Zeit in Kultur gebracht, um sie sezernieren zu lassen. Das

sezernierte IFN- γ wurde dann auf der Matrix eingefangen und konnte mittels eines Fluoreszenz-markierten anti-IFN- γ -Detektionsantikörpers nachgewiesen werden.

Die Benutzung von Antikörper-Antikörper Konjugaten führte zu einer starken Vereinfachung dieser Methode. Hierbei wurde beispielsweise ein CD45 Antikörper an einen anti-IFN- γ Antikörper gekoppelt. Auf diese Weise lässt sich die zeitaufwändige Biotinylierung vermeiden, da die IFN- γ Fangmatrix über den CD45 AK an die Zellen gebunden wird.

Das größte Problem beim Versuch, AK sezernierende Zellen zu detektieren ist die Tatsache, dass einer sehr großen Zahl von Hintergrund produzierenden Zellen nur sehr wenige AK sezernierende Zellen gegenüberstehen. Hintergrund produzierende Zellen sind beispielsweise alle FcR exprimierenden Zellen wie Monozyten oder Basophile, sowie B-Zellen, die membranständiges Ig besitzen. Im Laufe dieser Arbeit wurden mehrere Methoden ausgetestet, um dieses Problem zu lösen. Anfangs wurde versucht, das vor der Sekretion vorhandene Ig mit einem Überschuss von freiem Detektionsantikörper zu blockieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Säureelution des an die FcR gebundenen Ig. Dies würde zumindest einen Teil des Hintergrundes eliminieren. Weiterhin wurde versucht, Antikörper zu finden, die ausschließlich oder zumindest deutlich besser an eingefangenes bzw. sezerniertes Ig als an membranständiges Ig binden. Die letztendlich erfolgreichste Methode war die magnetische Depletion FcR exprimierender Zellen mittels für den jeweiligen Zelltyp spezifische AK. Dies ist jedoch für Hintergrund bildende B-Zellen nicht ohne weiteres möglich, da die im Blut vorkommenden frühen PC die meisten der für B-Zellen typischen Oberflächenmarker ebenfalls noch exprimieren.

Daraus ergibt sich das zweite große Problem bei der Etablierung dieser Methode. Da es nicht möglich ist, den kompletten Hintergrund zu eliminieren, musste versucht werden, die Fangmatrix und das Detektionssystem so zu optimieren, dass die resultierende Färbung des sezernierten Ig deutlich, d.h. etwa eine Dekade heller ist, als die sowieso schon ziemlich starke Hintergrundfärbung. Dies führte dazu, dass eine Vielzahl verschiedener anti-Kappa und anti-Lambda AK produziert oder gekauft und eine noch größere Zahl verschiedener Konjugate hergestellt und getestet werden musste.

2.8.1. Herstellung und Aufreinigung verschiedener Fang- und Ankerantikörper

2.8.1.1. Zellkultur

Folgende Maushybridome wurden zur AK Produktion verwendet:

Hybridom	Spezifität	Isotyp
HP6053	anti-human Kappa	IgG2a
HP6054	anti-human Lambda	IgG2a
TB28-2	anti-human Kappa	IgG1
141PF11	anti-human Kappa	IgG1
Hermes-3	anti-human CD44	IgG2a

Von jedem Hybridom wurden 5 Petrischalen mit 10 ml Zellsuspension in DMEM oder RPMI 1640 mit 10% FCS angezchtet. Je nach Hybridom zusätzlich 1 μ M L-Alanyl-Glutamin (Life Technologies), 0,05 mM β -Merkaptoethanol (Life Technologies), 10 mM HEPES oder 1 mM Pyruvat (Life Technologies) zugegeben. Nachdem die Zellen dicht genug gewachsen waren, wurden sie in eine 2 Liter Rollerflasche gegeben und so lange kultiviert und weiterverdünnt, bis nach etwa 2 Wochen 2 Liter dichte Zellsuspension vorhanden waren. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Kulturüberstand mit 40 μ m Filtern filtriert und anschließend der sezernierte AK mittels Protein A Sepharose aufgereinigt.

2.8.1.2. Aufreinigung der AK über Protein A Sepharose

Die Aufreinigung des produzierten AK aus dem Zellkulturmedium erfolgte über eine mit 5 ml Protein A Sepharose gefüllte Säule mittels einer Säulenchromatographieanlage (Pharmacia). Protein A Sepharose besteht aus Sepharose, an die kovalent Protein A von *Staphylococcus aureus* gekoppelt ist. Protein A hat die Eigenschaft, unter bestimmten Bedingungen, die hauptsächlich vom pH-Wert abhängen, humanes oder Maus Ig über den Fc Teil des Antikörpers zu binden. Das verwendete Protein A Sepharosegel hatte eine Bindungskapazität von 30 mg AK pro ml Gel.

Bei Maus AK vom Isotyp IgG1 wurde der Kulturüberstand mit NaCl auf 4M gebracht. Die hohe Salzkonzentration bewirkt, dass der AK an das Protein A binden kann. Für IgG2 AK ist dies nicht nötig. Anschließend wurde der pH des Überstands auf 9,0 eingestellt, da bei diesem pH-Wert die Bindung an die Säulenmatrix erfolgt. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit CBP + Salz-Puffer bzw. CBP-Puffer pH 9,0 wurde der Überstand zyklisch aufgetragen. Dies bedeutet, dass der Überstand nach dem Durchlaufen der Säule wieder

aufgefangen wird, so dass er die Säule in 36 Stunden mehrfach durchläuft, was die Ausbeute erhöht. Anschließend wurde mit dem 5 fachen Gelbettvolumen an Äquilierungspuffer gewaschen, und schließlich mit etwa 10 ml eines 1:1 Gemischs aus CBP Puffer pH 9,0 und CBP Puffer pH 2,5 der AK von der Säule eluiert. Unmittelbar nach der Elution muss der AK mit Tris-Puffer pH 7,0 im neutralen Bereich gehalten werden. Nach vollständiger Elution wurde der AK über eine PD10 Säule in PBS/EDTA/Azid umgepuffert und bei -70°C aufbewahrt.

2.8.2. Konjugation verschiedener Fang- und Detektionsreagenzien

Den folgenden Methoden zur Kopplung von Antikörpern an Fluorochrome, Haptene oder andere Antikörper ist gemeinsam, dass auf der Seite der Antikörper primäre Aminogruppen direkt oder indirekt, über Derivatisierung, an der Kopplungsreaktion beteiligt sind. Aus diesem Grunde darf der Reaktionsansatz keine weiteren Amine enthalten.

Der Kopplung von Biotin und Digoxigenin an Antikörper liegt eine Reaktion von N-hydroxysuccinimidestern mit primären Aminen der Antikörper zugrunde. Hierbei handelt es sich um einen nukleophilen Angriff des deprotonierten Amins auf eine Esterbindung, Verdrängung des N-hydroxysuccinimids und Bildung einer Amidbindung. Diese nukleophile Substitution wird durch einen alkalischen pH-Wert begünstigt, da dieser die deprotonierte Form der Amine stabilisiert.

Für die Kopplung von Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Avidin und Antikörpern an Antikörper werden die SH-Gruppen des zu koppelnden AK reduziert und an den jeweiligen Reaktionspartner Maleimidgruppen gekoppelt. In der eigentlichen Kopplungsreaktion reagieren Maleimide mit den reduzierten Thiolen unter Bildung stabiler Thioetherbindungen. Um eine Hydrolyse der Maleimide zu vermeiden und die Thiole in reduziertem Zustand zu stabilisieren, findet die Reaktion bei pH 7,5 statt.

Grundsätzlich gilt für alle Kopplungen, dass Fluorochrome und deren Konjugate vor Lichteinwirkung geschützt werden müssen, um das Ausbleichen zu vermeiden.

2.8.2.1. Protokoll zur Kopplung von AK an Biotin bzw. DIG

Sulfo-NHS-LC-Biotin Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat

Digoxigenin Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-e-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (Boehringer Mannheim)

- I. Der AK wurde über eine NAP5 Säule (Pharmacia Biotech) in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,2-8,4 umgepuffert.
- II. Anschließend wurde eine AK-Konzentration von 2,5 mg/ml eingestellt.
- III. Das in DMSO gelöste Biotin bzw. DIG wurde unter starkem Rühren zu dem AK gegeben. Auf ein Mol AK wurden 15 Mol Biotin bzw. 20 Mol DIG gegeben.
- IV. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 20°C im Dunkeln inkubiert.
- V. Über eine PD10 wurde der gekoppelte AK in PBS/EDTA/Azid umgepuffert.
- VI. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und auf 100 µg/ml eingestellt.

2.8.2.2. *Protokoll zur AK-AK bzw. AK-Avidin Kopplung*

- I. 0,5 mg des ersten AK wurden auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt.
- II. Danach wurde 1/4 des AK-Volumens an MES Puffer pH 6,0 zugegeben.
- III. Um die SH-Gruppen der Antikörper zu reduzieren, wurden je ml AK 20 µl 1M DTT zugegeben.
- IV. Es wurde 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert
- V. Anschließend wurde der AK über eine NAP10 Säule in PBS/EDTA umgepuffert.
- VI. 1,5 mg des zweitens AK bzw 0,5 mg Avidin wurden auf eine Konzentration von 5µg/ml eingestellt.
- VII. Anschließend wurde der AK bzw. das Avidin über eine NAP5 Säule in PBS/EDTA umgepuffert.
- VIII. Zur Einführung von Maleimidgruppen wurde je mg AK mit 15 µg SMCC aktiviert.
- IX. Es wurde 1 h bei RT inkubiert.
- X. Danach wurde der AK über eine NAP10 Säule in PBS/EDTA umgepuffert.
- XI. Die anschließende Kopplung der beiden Reaktionspartner erfolgte für 30 min bei 20°C im Dunkeln. Das molare Kopplungsverhältnis betrug 1 Mol erster AK zu 3 Mol zweiter AK bzw. 1 Mol erster AK zu 2 Mol Avidin. Die Gesamtproteinkonzentration bei der Kopplung betrug 0,8 mg/ml bzw. 0,6 mg/ml im Falle des Avidins.
- XII. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β-Merkaptoethanol und N-Ethylmaleimid mit jeweils 15-minütiger Inkubation abgestoppt.
- XIII. Danach wurde das Konjugat über eine PD10 Säule in PBS/EDTA/Azid umgepuffert.
- XIV. Abschließend wurde die Konzentration des Konjugates auf 200 µg/ml eingestellt.

2.8.2.3. *Protokoll zur AK-PE/APC Kopplung*

- I. 4 mg PE bzw. 1,5 mg APC wurden 15 min bei 13000 g abzentrifugiert und in PE-Kopplungspuffer pH 6,8 resuspendiert.
- II. Anschließend wurden Fluorochrome über eine NAP5 Säule in PE-Kopplungspuffer umgepuffert.
- III. Zur Einführung von Maleimidgruppen wurde je mg AK mit 14 μ g SMCC aktiviert.
- IV. Es wurde 1 h im Dunkeln bei RT auf dem Schüttler inkubiert.
- V. Danach wurden die Fluorochrome über eine NAP10 Säule in PE Kopplungspuffer umgepuffert.
- VI. 0,5 mg AK wurden auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt.
- VII. Danach wurde 1/4 des AK-Volumens an MES Puffer pH 6,0 zugegeben.
- VIII. Um die SH-Gruppen der Antikörper zu reduzieren, wurden je ml AK 20 μ l 1M DTT zugegeben.
- IX. Es wurde 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert.
- X. Anschließend wurde der AK über eine NAP10 Säule in PE-Kopplungspuffer umgepuffert.
- XI. Die anschließende Kopplung der beiden Reaktionspartner erfolgte für 1 h bei 20°C in Dunkeln. Das molare Kopplungsverhältnis betrug 1 Mol AK zu 2 Mol Fluorochrom. Die Gesamtproteinkonzentration bei der Kopplung betrug 0,4 mg/ml.
- XII. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β -Merkaptoethanol und N-Ethymaleimid mit jeweils 15-minütiger Inkubation abgestoppt.
- XIII. Danach wurde das Konjugat über eine PD10 Säule in PBS/EDTA/Azid umgepuffert.
- XIV. Abschließend wurde die Konzentration des Konjugates auf 100 μ g/ml eingestellt.

2.8.3. Inhibition der Oberflächen Ig Färbung mit freiem anti-Ig Antikörper

Zur Inhibition der Färbung von vorhandenem Oberflächen Ig wurden die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit einem Überschuss von ungekoppeltem Detektions-AK inkubiert. Je nach Affinität des AK sind dazu unterschiedliche Mengen von freiem AK nötig und deshalb wurden für jeden AK Titrationsversuche unternommen. Dabei wurden Überschüsse von 5-fach bis 100-fach getestet.

2.8.4. Test der für den Sekretionsassay benötigten Reagenzien durch künstliche Beladung der Fangmatrix

Um die Qualität der hergestellten Reagenzien zu testen, wurde der Sekretionsassay leicht abgewandelt. So wurde beispielsweise die Sekretion bei 37°C durch eine künstliche Beladung der Fangmatrix mit 10 µg/ml aufgereinigtem Ig ersetzt. Je nach Test wurde hierbei IgG oder IgA verwandt. Zur Differenzierung von bereits vorhandenem und beladenem Ig wurden die Zellen zu Beginn mit FITC-gekoppeltem Detektionsreagenz gefärbt. Demgegenüber erfolgte der Nachweis des zugegebenen Ig mit PE oder APC-gekoppelten Detektionsantikörpern. Somit sollten B-Zellen und FcR⁺ Zellen mit FITC gefärbt sein und alle Zellen nach der Beladung zusätzlich mit PE oder APC gefärbt. Je heller die PE Färbung gegenüber der FITC Färbung ausfiel, desto besser waren die Reagenzien. Da mitunter mehrere Reagenzien, wie z.B. Fang- und Detektionsantikörper gleichzeitig getestet wurden, war es nötig, alle Reagenzien auch unabhängig voneinander zu testen. Dies geschah mit Ratte anti-Maus Antikörpern, die gegen die Einzelkomponenten der Fangmatrix gerichtet waren.

2.8.4.1. Testsystem für den Sekretionsassay mit AK-AK Fangmatrix

- I. Um vorhandenes Immunglobulin anzufärben wurden $5 \cdot 10^7$ PBMC für 10 min mit anti-IgG.FITC oder anti-IgA.FITC in PBS/EDTA/BSA bei 4°C inkubiert.
- II. Nach einem Waschschrift erfolgte das Aufbringen der Fangmatrix durch eine 10-minütige Inkubation mit dem AK-AK Konjugat bei 4°C in PBS/EDTA/BSA.
- III. Ein kleiner Teil der Zellen wurde zum Test der Helligkeit der Fangmatrix mit Ratte anti-Maus Isotyp AK gefärbt. Besaßen die beiden AK im AK-AK Konjugat unterschiedliche Isotypen, so wurden beide Komponenten einzeln nachgewiesen.
- IV. Die übrigen Zellen wurden erneut mit PBS/EDTA/BSA gewaschen und dann mit 10 µg/ml aufgereinigtem IgG oder IgA beladen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C.
- V. Das beladene Ig wurde nach dem Waschen mit anti-IgG.PE oder anti-IgA.PE nachgewiesen. Die Färbung erfolgte für 10 min bei 4°C in PBS/EDTA/BSA.
- VI. Bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden 10000 Zellen aufgenommen.

2.8.4.2. *Testsystem für den Sekretionsassay mit Biotin Fangmatrix*

- I. $5 \cdot 10^7$ PBMC wurden in PBS gewaschen.
- II. Die Biotinylierung der Zellen erfolgte durch Resuspension der PBMC in 2 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin in 2 ml PBS. Die Zellen wurden für 10 min bei 37°C inkubiert.
- III. Nach der Inkubation wurden 2 ml vorgewärmtes RPMI 1640 Medium mit 10% FCS zu den Zellen gegeben und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Dies dient dazu, freies Biotin durch das FCS zu binden.
- IV. Die Zellen wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit PBS/EDTA/BSA gewaschen.
- V. Die Zellen wurden noch zweimal in einem Eppendorfröhrchen gewaschen, wobei zwischen den Waschsritten das Gefäß gewechselt wurde, um kein freies Biotin zu verschleppen.
- VI. Ein kleiner Teil der Zellen wurde zum Test der Biotinylierung mit Streptavidin.PE gefärbt.
- VII. Um vorhandenes Immunglobulin anzufärben wurde der PBMC für 10 min mit anti-IgG.FITC oder anti-IgA.FITC in PBS/EDTA/BSA bei 4°C inkubiert.
- VIII. Nach einem Waschschrift erfolgte das Aufbringen der Fangmatrix durch eine 10-minütige Inkubation mit dem anti-Avidin-AK Konjugat bei 4°C in PBS/EDTA/BSA.
- IX. Ein kleiner Teil der Zellen wurde zum Test der Helligkeit der Fangmatrix mit Ratte anti-Maus Isotyp AK gefärbt.
- X. Die übrigen Zellen wurden erneut mit PBS/EDTA/BSA gewaschen und dann mit 10 μ g/ml aufgereinigtem IgG oder IgA beladen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C.
- XI. Das beladene Ig wurde nach dem Waschen mit anti-IgG.PE oder anti-IgA.PE nachgewiesen. Die Färbung erfolgte für 10 min bei 4°C in PBS/EDTA/BSA.
- XII. Bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden 10000 Zellen aufgenommen.

2.8.5. **Endgültiges Protokoll für die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie**

- I. Um Hintergrund produzierende Zellen wie Monozyten und Basophile sowie T-Zellen zu depletieren, wurde der PBMC mit CD14.Biotin, CD123.Biotin und CD3.Biotin für 10 min bei 4°C in PBS/EDTA/BSA inkubiert.
- II. Nach dem Waschen mit PBS/EDTA/BSA wurden die Zellen für 15 min bei 4°C mit anti-Biotin.Mikropartikeln (Miltenyi Biotec GmbH) in PBS/EDTA/BSA inkubiert.

- III. Monozyten, Basophile sowie T-Zellen wurden anschließend auf einer LD Säule (Miltenyi Biotec GmbH), die speziell für magnetische Depletionen geeignet ist, von den übrigen PBMC abgetrennt.
- IV. Die restlichen PBMC wurden mit PBS gewaschen.
- V. Die Biotinylierung der Zellen erfolgte durch Resuspension der PBMC in 2 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin in 2 ml PBS. Die Zellen wurden für 10 min bei 37°C inkubiert.
- VI. Nach der Inkubation wurden 2 ml vorgewärmtes RPMI 1640 Medium mit 10% FCS zu den Zellen gegeben und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert.
- VII. Die Zellen wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit PBS/EDTA/BSA gewaschen.
- VIII. Die Zellen wurden noch zweimal in einem Eppendorfröhrchen gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten das Gefäß gewechselt wurde.
Alle weiteren Inkubations- und Waschschriffe erfolgten im weiteren Verlauf mit eiskaltem PBS/EDTA/BSA und auf Eis, sowie in einer gekühlten Zentrifuge. Dies sollte verhindern, dass die Zellen bereits zu diesem Zeitpunkt sezernieren oder auf der Oberfläche gebundene Antikörper internalisieren.
- IX. Um bereits vorhandenes Oberflächen Ig zu blockieren, wurden die Zellen für 10 min mit einem Überschuss an freiem Detektionsantikörper inkubiert und anschließend gewaschen.
- X. Danach wurden die PBMC für 5 min mit einem Überschuss an freiem anti-Kappa und anti-Lambda AK inkubiert. Dies sollte einerseits verhindern, dass die anti-Kappa und anti-Lambda AK der Fangmatrix an Ig auf der Zelloberfläche binden, was diese als Fangmatrix unbrauchbar machen würde. Andererseits können sie während der Sekretionsphase sezerniertes und nicht von der Fangmatrix eingefangenes Ig binden und somit verhindern, dass dieses unspezifisch an benachbarte Zellen bindet.
- XI. Anschließend wurde, ohne zu waschen, die Fangmatrix durch Zugabe von Avidin-anti-Kappa und Avidin-anti-Lambda in eiskaltem PBS/EDTA/BSA aufgetragen. Es folgte eine 10-minütige Inkubationsphase auf Eis.
Zu einem Drittel der Zellen wurde keine Fangmatrix zugegeben. Diese Zellen wurden im weiteren Verlauf ansonsten gleich behandelt und dienten als Negativkontrolle.
- XII. Danach wurden die Zellen, wiederum ohne zu waschen, in vorgewärmtes RPMI 1640 Medium mit 10% FCS gegeben. Die Zellkonzentration betrug $2 \cdot 10^5$ /ml. Bei höheren Zellkonzentrationen steigt die Gefahr, dass sezerniertes Ig von benachbarten Zellen unspezifisch eingefangen wird. Den Zellen wurde nun 30 min Zeit gelassen, bei 37°C Ig zu sezernieren. Damit sich die Zellen während dieser Zeit nicht am Boden

- absetzen, was ebenfalls zu unspezifischer Ig Bindung führen würde, rotierten die Inkubationsgefäße während der gesamten Sekretionsphase langsam.
- XIII. Nach der Sekretion wurden die Inkubationsgefäße mit eiskaltem PBS/EDTA/BSA aufgefüllt und dann für 10-20 min auf Eis gestellt. Dies diente dazu, die Zellen wieder zu inaktivieren, da im anschließend folgenden Waschschrift die Zellen pelletiert wurden, was bei noch fortlaufender Sekretion von Ig zu einem starken, unspezifischen Hintergrund führen würde.
- XIV. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 10 min mit Dig markiertem Detektionsantikörper auf Eis inkubiert. Dabei kann es sich um Ig Isotyp Färbungen oder auch um Antigen-spezifische Färbungen handeln.
- XV. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend mit anti-Dig.APC, CD20.PerCP und PI fluoreszent markiert. CD20.PerCP diente zur Ausgrenzung eines Teils der Hintergrund bildenden B-Zellen und wurde zusammen mit PI im FL3 Kanal gemessen. Zusätzlich können die Zellen zur weiteren Charakterisierung mit beispielsweise CD38, CD138 oder anderen AK gefärbt werden.
- XVI. Bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden alle Zellen aufgenommen.

2.9. Korrelation der Häufigkeit IgE sezernierender PC unter PBMC mit den IgE Serumtitern in Patienten- und Normalspenderblut

Im Laufe dieser Arbeit wurde Blut von 22 Atopikern, 1 Hyper IgE Patienten und 24 Normalspendern untersucht. Die Aufbereitung der PBMC erfolgte wie in Abschnitt 2.1 beschrieben. Mit den bei der Aufbereitung gewonnenen Seren wurden ein IgE ELISA durchgeführt. Die gemessenen IgE Konzentrationen wurden dann mit der berechneten Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ Zellen korreliert.

2.9.1. Intrazelluläre IgE Färbung in angereicherten CD138⁺ PC

Die magnetische Anreicherung von CD138 exprimierenden PC erfolgte über 2 MS Säulen, mit der Färbung der Zellen auf der zweiten Anreicherungssäule, wie in Abschnitt 2.6.2 ausführlich beschrieben. Die Zellen wurden dabei zunächst auf der Oberfläche mit CD138 sowie CD19 und anschließend intrazellulär mit anti-IgE gefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität der IgE Färbung wurde der anti-IgE AK für 30 min mit einem 1000-fachen

Überschuss an IgE vorinkubiert. Somit sollte der anti-IgE AK nicht mehr in der Lage sein, in den Zellen vorhandenes IgE spezifisch zu binden.

2.9.2. Detektion IgE sezernierender Zellen mit dem Sekretionsassay

Um zu untersuchen, inwiefern die mit der CD138 Anreicherung gewonnenen Daten zur Häufigkeit IgE sezernierender Zellen mit der tatsächlichen Häufigkeit unter allen PC im Blut korreliert, wurde bei drei Atopikern ein IgE Sekretionsassay durchgeführt. Als Fangmatrix wurde Avidin-Lambda benutzt und sezerniertes IgE wurde mit anti-IgE.Dig sowie anti-Dig.APC nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD38.FITC, CD138.PE und PI angefärbt. Als Negativkontrolle wurde ein Drittel der Zellen ohne Fangmatrix bei 37°C inkubiert, d.h. es wurde kein Avidin-Lambda zugegeben. Für die anschließende durchflusszytometrische Analyse wurden alle Zellen gemessen, was je nach Spender zwischen $5 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^6$ Zellen waren.

2.9.3. Berechnung der Häufigkeit IgE⁺ CD138⁺ im PBMC

Es wurden zwei Ansätze zur Berechnung der Häufigkeit von IgE⁺ CD138⁺ Zellen in PBMC benutzt:

- a) Die Gesamtzahl der IgE⁺ CD138⁺ Zellen in der positiven Fraktion nach magnetischer CD138 Anreicherung wurde durch die Gesamtzahl von PBMC vor der Separation geteilt.
- b) Die Häufigkeit von IgE⁺ Zellen unter CD138⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch in der positiven Fraktion nach CD138 Anreicherung bestimmt. Die Häufigkeit von CD138⁺ Zellen in PBMC wurde durchflusszytometrisch vor der Separation bestimmt. Hierfür wurden PBMC mit CD38.FITC, CD138.PE, CD14.PerCP und CD19.APC gefärbt und anschließend 500.000 Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Zellen, die CD138⁺, CD14⁻, CD19⁺, CD38⁺⁺ und zusätzlich die für PC richtigen Streulichteigenschaften besitzen, gelten als CD138⁺ PC. Die so erhaltene Anzahl wurde dann auf die Gesamtzellzahl im PBMC hochgerechnet.

Für die Experimente, die in Abbildung 16 dargestellt sind, wurde letztere Methode verwendet.

2.10. Analyse PLA-spezifischer CD138⁺ PC im Verlauf der Hyposensibilisierung mit Insektengift

In Rahmen einer Insektengift Hyposensibilisierung werden den Allergikern kontinuierlich steigende Dosen Insektengift subkutan gespritzt. Dies läuft nach dem folgenden Schema ab.

Tag	0	1	2	3	4	1 Woche	2 Wochen	1 Monat	monatlich
Dosis (ng)		0,1	1	10		100	100	100	100
		0,4	4	30	70				
		0,7	7	50	100				
	▲			▲		▲	▲	▲	

In den ersten Tagen erhält der Patient mehrere Injektionen pro Tag mit stetig steigender Allergenkonzentration. Später werden die Injektionen dann monatlich verabreicht.

Bei den Allergikern handelt es sich sowohl um Bienengift-, als auch um Wespengiftallergiker. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie wurden den Patienten 40 ml Blut entnommen und anschließend eine Anreicherung CD138⁺ Zellen durchgeführt. Die geplanten Entnahmezeitpunkte sind im oben gezeigten Schema mit Dreiecken gekennzeichnet. Die Blutentnahme erfolgte prinzipiell immer an Tagen, an denen die Patienten eine Injektion erhalten sollten, und zwar stets vor der Injektion des Insektengifts. Das bei der PBMC Aufbereitung gewonnene Serum wurde bei -20°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt auf gesamt IgE und PLA-spezifisches IgE untersucht.

Die isolierten Zellen wurden in den ersten Experimenten auf der Oberfläche gegen CD138 und intrazellulär gegen PLA und IgE sowie IgG gefärbt. Als sich dabei zeigte, dass sich genügend PC isolieren lassen, wurde eine weitere Färbung durchgeführt, und zwar wurde zusätzlich zu IgE und IgG noch gegen IgG4 gefärbt. Bei Bienengiftallergikern wurde mit PLA2 und bei den Wespengiftallergikern mit PLA1b gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Magnetische Anreicherung funktioneller PC

PC sind eine essentielle Komponente in humoralen Immunantworten und Allergien. Die geringe Häufigkeit von PC im Blut von 0,01-0,1% erschwert jedoch die detaillierte Analyse dieser Zellen. Aus diesem Grunde benutzten wir die magnetische Zellseparation um PC aus dem peripheren menschlichen Blut anzureichern.

3.1.1. Magnetische Sortierung von CD138 exprimierenden Zellen

PC verlieren im Laufe ihrer Reifung einen großen Teil ihrer Oberflächenmoleküle. Dies erschwert die direkte Anreicherung von PC aus PBMC anhand spezifischer Oberflächenmarker. Es gibt zwar einige Moleküle wie CD38 und CD27, die auf PC im Vergleich zu anderen Blutzellen hochreguliert werden, jedoch reichen diese Unterschiede nicht aus, um PC anhand dieser Moleküle einfach und direkt isolieren zu können. Im Gegensatz dazu ist CD138 oder Syndekan-1 ein Oberflächenmarker, der unter Blutzellen exklusiv auf PC vorhanden ist (21, 30). Aus diesem Grunde benutzen wir einen monoklonalen AK gegen CD138 um PC magnetisch aus dem Blut anzureichern. Hierzu wurde der AK chemisch an superparamagnetische Mikropartikel gekoppelt. Mit diesem CD138-Mikropartikeln lassen sich CD138⁺ PC aus PBMC isolieren. PBMC von Normal Spendern wurden mit den CD138-Mikropartikeln inkubiert und anschließend mit dem MACS System nacheinander magnetisch über zwei MS Säulen angereichert. Diese sind in der Lage bis zu $1 \cdot 10^7$ positive Zellen zu binden. Die auf der Säule zurückgehaltenen Zellen wurden mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten AK gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

In Abbildung 1 ist eine typische CD138 Anreicherung aus dem Blut eines Normal spenders gezeigt. Vor der Anreicherung ist das für PBMC bezüglich der Streulichteigenschaften typische heterogene Bild zu erkennen. In der Darstellung von CD138 gegen CD19 sind nur vereinzelte CD138⁺ Zellen zu erkennen. Nach der Anreicherung jedoch zeigt sich ein relativ homogenes Streulichtbild. Die angereicherten Zellen sind größtenteils CD138⁺ und CD19^{dim}. Vergleicht man die CD19 Intensität der CD138⁺ Zellen mit denen reifer, ruhender B-Zellen, die einen Großteil der Verunreinigung ausmachen, so erkennt man, dass CD138⁺ Zellen CD19 schwächer exprimieren als reife, ruhende B-Zellen. Weiterhin kann man anhand des Vorwärtsstreulichts, das ja wie bereits erwähnt ein Maß für die

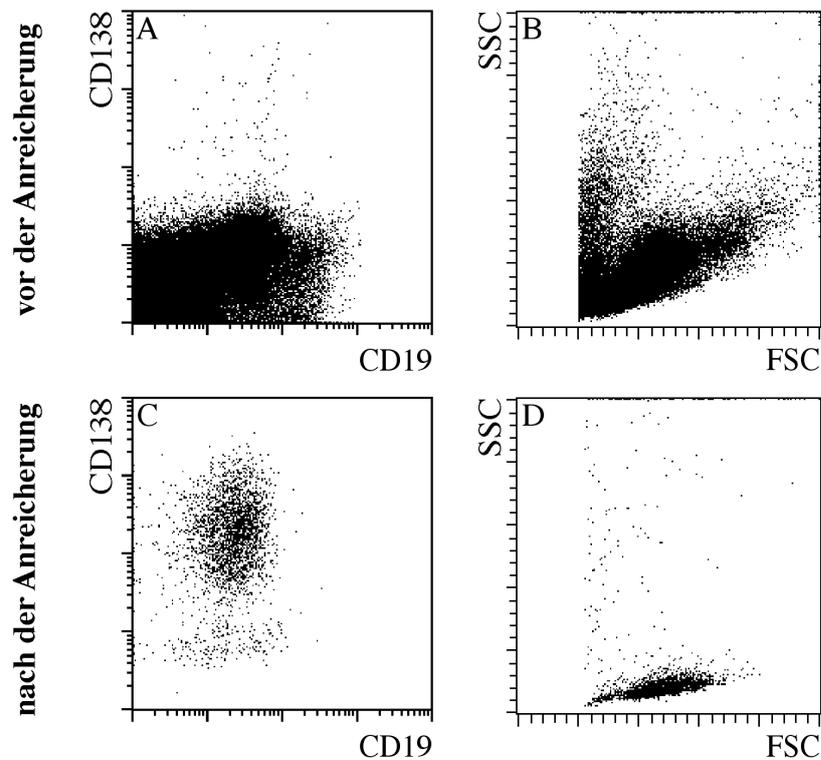


Abb. 1 Magnetische Anreicherung CD138⁺ Zellen aus dem peripheren Blut.

PBMC wurden mit CD138.Mikropartikeln inkubiert und anschließend mit CD138.PE und CD19.FITC gefärbt. Die Anreicherung erfolgte über 2 MS-Säulen. Die Darstellungen (A) und (C) wurden mittels Streulichteigenschaften und PI-Fluoreszenz auf lebende Lymphozyten beschränkt. Vor der CD138 Anreicherung (A,B) sind nur wenige CD138 exprimierende Zellen zu erkennen. Hierbei wurden 100000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die angereicherten Zellen exprimieren CD19 (C) und zeigen charakteristische Streulichteigenschaften (D).

Größe der Zellen ist, erkennen, dass die CD138⁺ Zellen größer als normale B-Zellen sind (Abb. 1, D). Dies sind alle Eigenschaften, die dafür sprechen, dass es sich bei den angereicherten CD138⁺ Zellen tatsächlich um PC handelt.

Die durchschnittliche Reinheit der positiven Fraktion nach 2 MS Säulen betrug etwa 80% bei hoher Lebensfähigkeit der Zellen. Die Ausbeute der Anreicherung ist, wie zuvor diskutiert, nicht ganz einfach zu berechnen. Legt man jedoch die vor der Anreicherung mit einer Multiparameteranalyse (siehe Abschnitt 2.9.3) bestimmten Frequenzen zu Grunde, so erhält man ausreichend genaue Werte, die es einem erlauben, die Häufigkeit IgE⁺ oder Antigen-spezifischer PC zu berechnen.

3.1.2. Immunglobulinproduktion der angereicherten Zellen

Um zu zeigen, dass es sich bei den isolierten Zellen um funktionelle PC handelt, wurden sie für 48 h in Kultur genommen. PC sollten, im Gegensatz zu Gedächtnis B-Zellen, in der

Lage sein, spontan und ohne weiteren Stimulus Ig zu sezernieren. Zusätzlich zu den angereicherten CD138⁺ Zellen wurde die CD138 depletierte negative Fraktion mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert. In den Kulturüberständen wurde anschließend mittels ELISAs sezerniertes Ig gemessen. Neben IgG wurden in den Kulturüberständen auch die Konzentration von IgA und IgM bestimmt.

CD138 depletierte Fraktion			CD138 angereicherte Fraktion		
IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
<15 ng/ml	<15 ng/ml	<10 ng/ml	1577 ng/ml	1312 ng/ml	418 ng/ml
			48%	40%	12%

Tabelle 1 Mit CD138 angereicherte PC sezernieren große Mengen IgA, IgG und IgM.

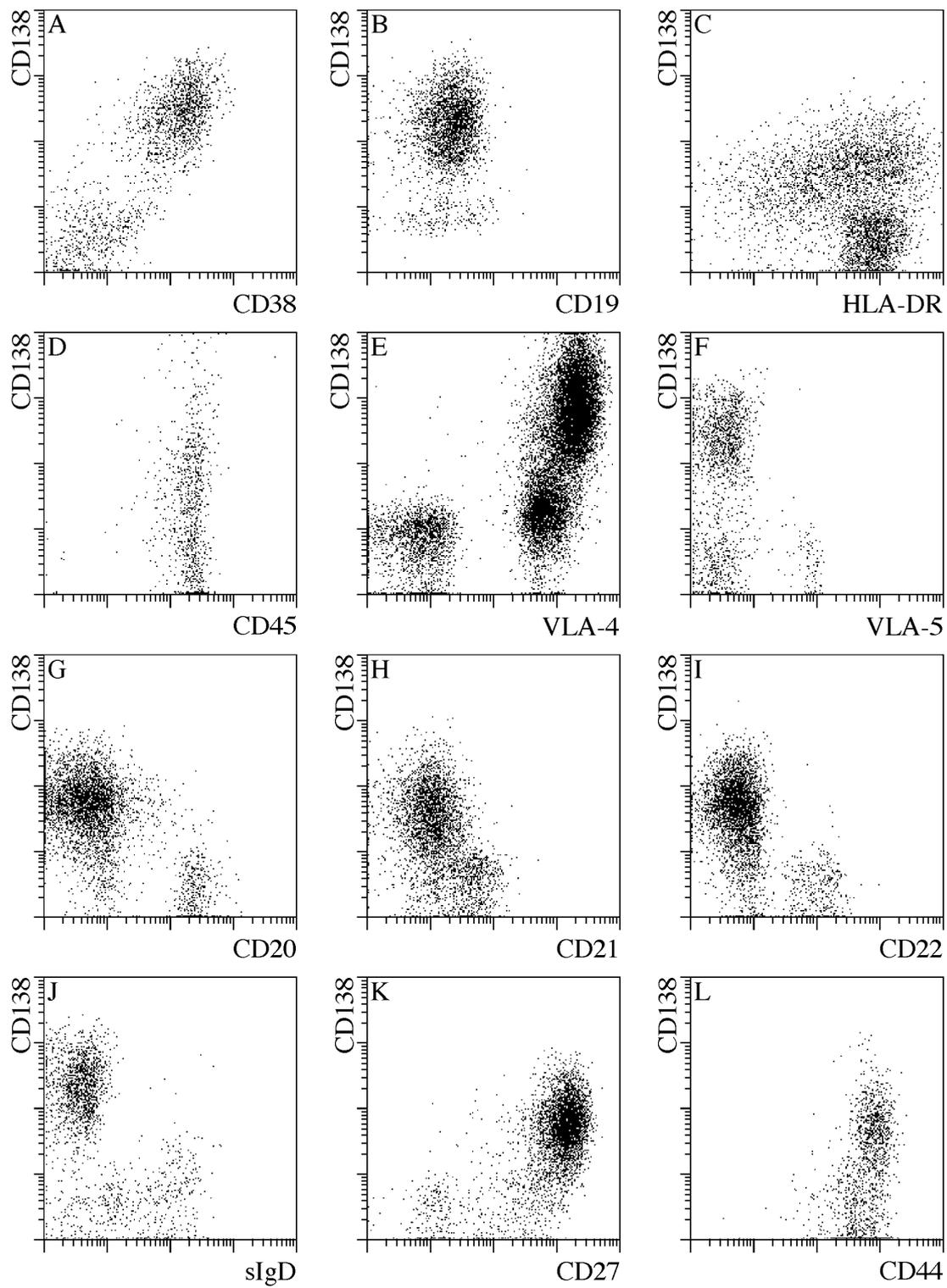
Angereicherte CD138⁺ PC und CD138 depletierte PBMC aus Normalspendern wurden für 48 Stunden ohne weitere Stimuli in Kultur genommen. Die Ig Mengen im Überstand wurden durch einen IgA, IgG oder IgM ELISA bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen sind Durchschnittswerte aus 6 Patienten und basieren auf einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml.

Tabelle 1 zeigt die Durchschnittswerte aus 6 Normalspendern. In der CD138 depletierten Fraktion lag die Ig Konzentration für IgA, IgG und IgM stets unter dem Detektionslimit von 15 ng/ml bzw 10 ng/ml. Im Gegensatz dazu ließen sich in den CD138 angereicherten Fraktionen große Mengen an IgA, IgG und IgM nachweisen. Die in der untersten Zeile angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil des jeweils gemessenen Ig bezüglich der Gesamtmenge an sezerniertem Ig und lassen möglicherweise einen Schluss auf die Verteilung der Subklassen bei CD138⁺ PC zu.

3.1.3. Phänotypische Analyse CD138⁺ PC

Bei der Differenzierung von reifen B-Zellen zu PC ändert sich die Expression einer Vielzahl verschiedener Moleküle mit unterschiedlicher Kinetik. Viele Moleküle werden herunterreguliert, andere neu oder stärker exprimiert. Zudem unterscheiden sich auch ausgereifte PC, z.B. in der Expression unterschiedlicher Zielfindungs (Homing)-Rezeptoren, die das Zielgewebe der PC bestimmen.

Im Rahmen der phänotypischen Analyse wurden Marker untersucht, von denen man aufgrund bestehender Untersuchungen bereits wusste, dass ihr Vorhandensein oder Fehlen charakteristisch für PC sind, oder die Rückschlüsse auf das Reifungsstadium der PC zulassen. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 2 zu sehen.



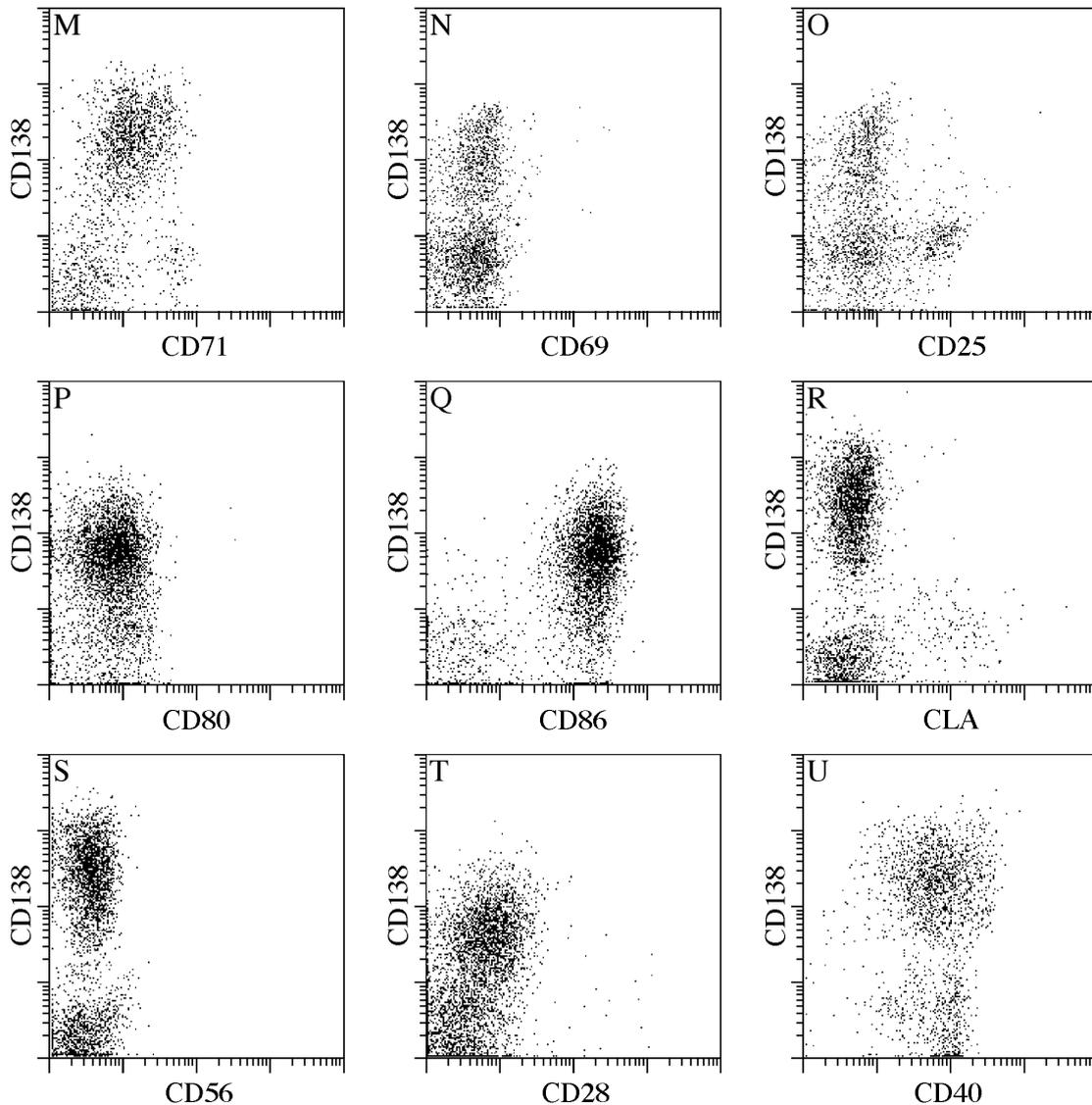


Abb. 2 Phänotypische Charakterisierung CD138⁺ PC aus dem peripheren Blut von Normal Spendern.

CD138 exprimierende PC wurden magnetisch angereichert und auf der zweiten Anreicherungssäule gegen die verschiedenen Marker gefärbt. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden ausgegrenzt. Es wurden für jeden Marker mindestens 3 Färbungen durchgeführt.

CD38 ist ein Molekül, das auf allen PC stark exprimiert wird. Je weiter die PC gereift ist, desto stärker wird CD38 exprimiert und auf reifen PC, z.B. im Knochenmark, erreicht es die maximale Expression (67, 68). Unsere Färbung zeigt deutlich, dass alle CD138⁺ Zellen auch CD38 stark exprimieren (Abb. 2, A), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass alle CD138⁺ Zellen PC sind. Aufgrund des Mangels an Knochenmarkproben konnten wir die CD38 Expression auf Blut CD138⁺ PC nicht mit Knochenmark CD138⁺ PC vergleichen. Dies hätte Aufschluss über den Reifungsgrad der CD138⁺ PC im Blut gegeben. Dieser Vergleich wurde jedoch von einer Arbeitsgruppe des DRFZ (Sergio Arce, Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin) mit der wir eng zusammenarbeiten, unternommen. Es

zeigte sich, dass Blut PC CD38 nicht so stark exprimieren wie Knochenmark PC, was ein Hinweis darauf ist, dass die PC im Blut noch nicht völlig ausgereift sind. Des Weiteren werden die Moleküle CD19, CD45, HLA-DR, VLA-4 und membranständiges Ig auf reifen PC vollständig herunterreguliert. Die Färbungen in Abbildung 2 zeigen jedoch deutlich, dass die isolierten Blut PC noch CD19, CD45 und HLA-DR exprimieren, wenngleich auch schon eine Abnahme im Vergleich zu den reifen B-Zellen zu erkennen ist (Abb. 2, B-D). Die Expression der Marker VLA-4 und VLA-5 ist ebenfalls für den Übergang zu reifen PC im Knochenmark interessant. Während Knochenmark PC VLA-4⁻ und VLA-5⁺ sind, zeigt sich bei den CD138⁺ Blut PC genau das entgegengesetzte Bild (Abb. 2, E,F). Weitere B-Zell Marker, die während der B-Zell Reifung zu PC verschwinden, sind CD20, CD21 und CD22. Diese Marker sind auf CD138⁺ PC im Blut ebenso schon verschwunden oder zumindest nur noch sehr schwach vorhanden (Abb.2 G-I). Ebenfalls schwächer, aber noch deutlich zu erkennen ist die Expression von membranständigem Ig der Klassen IgG, IgA und IgM (Abbildung 3). IgD, das auf naiven B-Zellen exprimiert wird, konnte auf den PC nicht nachgewiesen werden (Abb. 2, J). Diese Daten deuten stark darauf hin, dass es sich bei den CD138⁺ PC im Blut um frühe, noch nicht völlig ausgereifte PC handelt.

Odendahl et al. zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass in Patienten, die unter Systemischen Lupus Erythematodes leiden, die Zahl an PC im Blut stark erhöht ist und dass sich diese PC durch eine sehr starke CD27 Expression auszeichnen. In Abbildung 2 ist zu erkennen, dass auch CD138⁺ PC aus dem Blut von Normal Spendern eine deutlich stärkere CD27 Expression aufweisen als reife B-Zellen (Abb. 2, K). Die Expression von CD44, ein auf Blutlymphozyten fast ubiquitär vorhandenes Molekül, von dem bekannt ist, dass es auf allen PC vorkommt, ist ebenfalls sehr hoch (Abb. 2, L). Von den Molekülen CD71, CD69 und CD25, die als Aktivierungsmarker bekannt sind, wird nur CD71 schwach auf PC exprimiert (Abb. 2, M-O). CD80 und CD86 werden auf aktivierten B-Zellen hochreguliert und dienen unter anderem als kostimulatorische Moleküle bei der T-Zell Aktivierung. Auf den isolierten PC ist lediglich CD86 vorhanden (Abb. 2, P,Q). Während des B-Zell T-Zell Kontaktes wird auf Seiten der B-Zelle CD40 hochreguliert, ein Marker, der für die B-Zell Proliferation und die weitere Entwicklung zu Gedächtnis B-Zellen oder PC eine entscheidende Rolle spielt. CD40 wird, wie in Abb. 2, U gezeigt, auch auf CD138⁺ PC exprimiert. CD56 und CD28 sind zwei Moleküle, von denen gezeigt wurde, dass sie auf malignen PC in Patienten mit Multiplem Myelom vorkommen. Beide kommen jedoch auf gesunden CD138⁺ PC nicht vor (Abb. 2, S,T). CLA, von dem angenommen, dass es für die Einwanderung in die Haut benötigt wird (69, 70), ist auf CD138⁺ PC nicht vorhanden (Abb.2 , R).

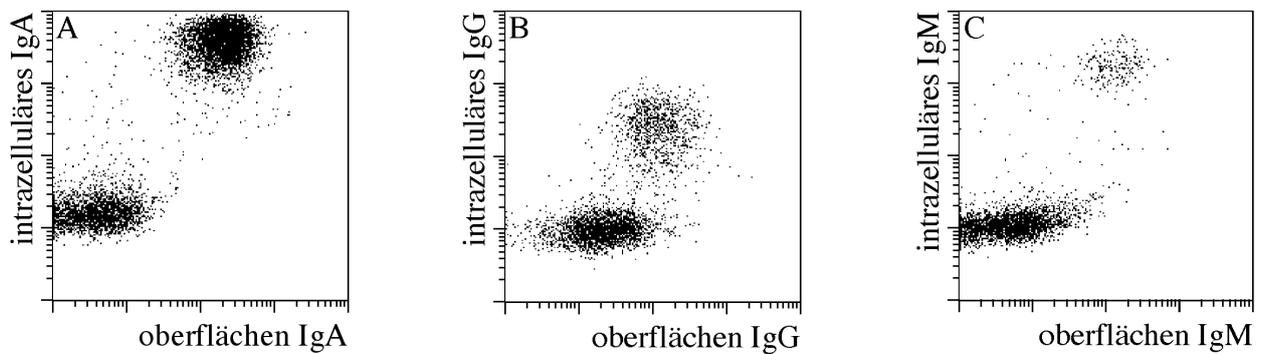


Abb. 3 Expression von Immunglobulin-Klassen auf CD138⁺ PC eines Normalspenders.

Die über CD138 angereicherten PC wurden zunächst auf der Zellmembran gegen CD138 und Oberflächen Ig gefärbt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen Ig gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde auf CD138⁺ Lymphozyten beschränkt. Gezeigt ist die Färbung von Oberflächen Ig (X-Achse) gegen intrazelluläres Ig (Y-Achse) für IgA (A), IgG (B) und IgM (C).

Abbildung 3 zeigt die gleichzeitige Färbung von membranständigem und intrazellulärem Ig auf CD138⁺ PC. Es zeigt sich sehr deutlich, dass es viele doppelt positive, aber keine einfach positiven Zellen gibt. Obwohl es sich bei der intrazellulären Färbung, im Gegensatz zur Oberflächenfärbung, um ein direktes Färbesystem mit einem nicht besonders hellen Fluorochrom (FITC) handelt, ist diese Färbung dennoch deutlich heller, was die extrem hohe Expression von intrazellulärem Ig verdeutlicht. Die relativ starke Hintergrundfärbung der negativen Zellen bei der intrazellulären Färbung ist ein typisches Artefakt bei intrazellulären Färbungen und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch öfter auftauchen.

Vergleicht man die verschiedenen Isotypen miteinander, so zeigt sich, dass etwa 60% der PC IgA, 25% IgG und der Rest IgM exprimieren. In Abbildung 4 ist ein Vergleich von drei Normalspendern dargestellt und es ist deutlich zu erkennen, dass die Summe aller Prozente ziemlich genau 100% ergibt.

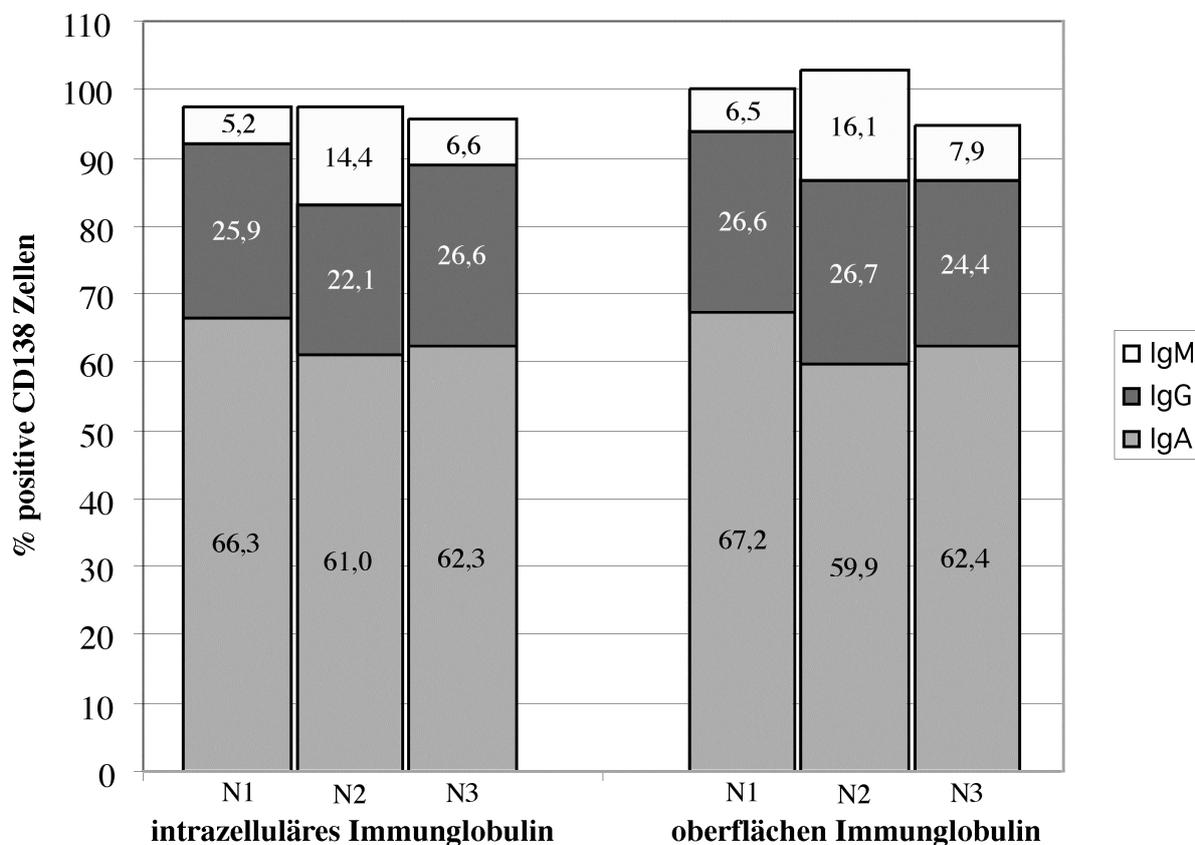


Abb. 4 Vergleich der Immunglobulin-Klassen Expression CD138⁺ PC auf 3 Normalspendern.

PC aus 3 Normalspendern (N1-N3) wurden über CD138 angereichert und anschließend auf der Säule gefärbt. Wie bereits in Abb. 3 zeigt sich eine deutliche Ko-Expression von membranständigem (rechts) und intrazellulärem (links) Ig. IgA (unterer Balkenabschnitt) wird von etwa zwei Drittel aller CD138⁺ PC exprimiert, gefolgt von IgG (mittlerer Balkenabschnitt) mit etwa einem Viertel und IgM (oberer Balkenabschnitt) mit durchschnittlich etwa 10%.

3.2. Detektion aller AK sezernierenden Zellen mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie

Kantele et al. haben mit ihren ELISPOT Daten gezeigt, dass nur etwa 50% aller ASC CD138⁺ sind (8). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie mit dem Ziel weiterentwickelt, alle ASC detektieren und möglicherweise auch isolieren zu können. Wie bereits erwähnt wurde die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie ursprünglich von Manz et al. entwickelt, um von T-Zellen sezernierte Zytokine bzw. von Hybridomen sezerniertes Ig einzufangen. Dazu wurden die Zellen auf der Oberfläche biotinyliert und eine Fangmatrix aufgebracht, die das sezernierte Produkt einfangen sollte. Dieses wurde dann mit einem Detektionsantikörper nachgewiesen. Im weiteren Verlauf wurde das Beladen der Zellen mit der Fangmatrix soweit vereinfacht,

dass auf die aufwändige Biotinylierung verzichtet werden konnte. Der Fangantikörper wurde an CD45 gekoppelt und konnte somit auf alle CD45 exprimierenden Zellen aufgebracht werden. Allen bisherigen Applikationen ist gemeinsam, dass kein Hintergrund, d.h. kein auf der Zelloberfläche bereits vorhandenes Sekretionsprodukt vorhanden ist. Eine Ausnahme bilden einige wenige membranständig vorkommende Zytokine, die jedoch so schwach exprimiert werden, dass sie mit konventionellen Färbemethoden nicht nachweisbar sind (71). In der hier angestrebten Applikation ist dies jedoch nicht der Fall. Mehr als ein Drittel aller PBMC besitzen große Mengen Ig auf ihrer Zelloberfläche, sei es in Form von FcR gebundenem Ig auf Monozyten, Basophilen bzw. NK-Zellen oder als membranverankertes Ig auf B-Zellen. In diesem riesigen Hintergrund 0,01% sezernierende Zellen wiederzufinden, stellte sich als sehr komplexe Aufgabe heraus.

3.2.1. Herstellung und Test geeigneter AK-AK Konjugate

Im ersten Ansatz wurde ebenfalls versucht, auf die langwierige Biotinylierung der Zellen zu verzichten und AK-AK Konjugate als Fangmatrix zu benutzen, die aus einem Ankerantikörper und einem Fangantikörper bestehen. Als Fangantikörper sollten anti-Kappa bzw. anti-Lambda dienen, die die zwei verschiedenen Formen der leichten Kette eines AK erkennen. Beim Menschen ist das Verhältnis von Kappa- zu Lambda-AK in etwa 1:1. Somit ist man in der Lage, AK unabhängig vom Isotyp einzufangen und anschließend beispielsweise mit anti-Isotyp AK nachzuweisen. Als zweiter AK, der zur Verankerung auf der Zelloberfläche nötig ist, wurde CD44 gewählt. CD44 wurde CD45 deshalb vorgezogen, da es im Gegensatz zu CD45 auf allen PC stark exprimiert wird.

In Abbildung 5 ist ein Test eines CD44-anti-Kappa und eines CD44-anti-Lambda Konjugates nach dem in Abschnitt 2.8.4.1 beschriebenen Protokoll dargestellt. Oberflächen IgG wurden zu Beginn des Experiments mit FITC gefärbt, künstlich beladenes IgG später mit IgG.PE. Bei der FITC Färbung sind deutlich hell gefärbte und nicht gefärbte PBMC zu erkennen. Nach der Beladung durch IgG sollten alle Zellen zusätzlich mit PE gefärbt sein. Je heller die PE Färbung ausfällt, desto besser ist die Fangmatrix. Ein weiterer Test für die Qualität der Fangmatrix ist die direkte Anfärbung derselben. Dies kann mit anti-Maus Isotyp AK gegen den Fangantikörper geschehen. Diese Färbungen sind auf der linken Seite der Abbildung dargestellt (Abb. 5, A,C). Es ist gut zu sehen, dass das in der oberen Zeile dargestellte CD44-anti-Lambda Konjugat

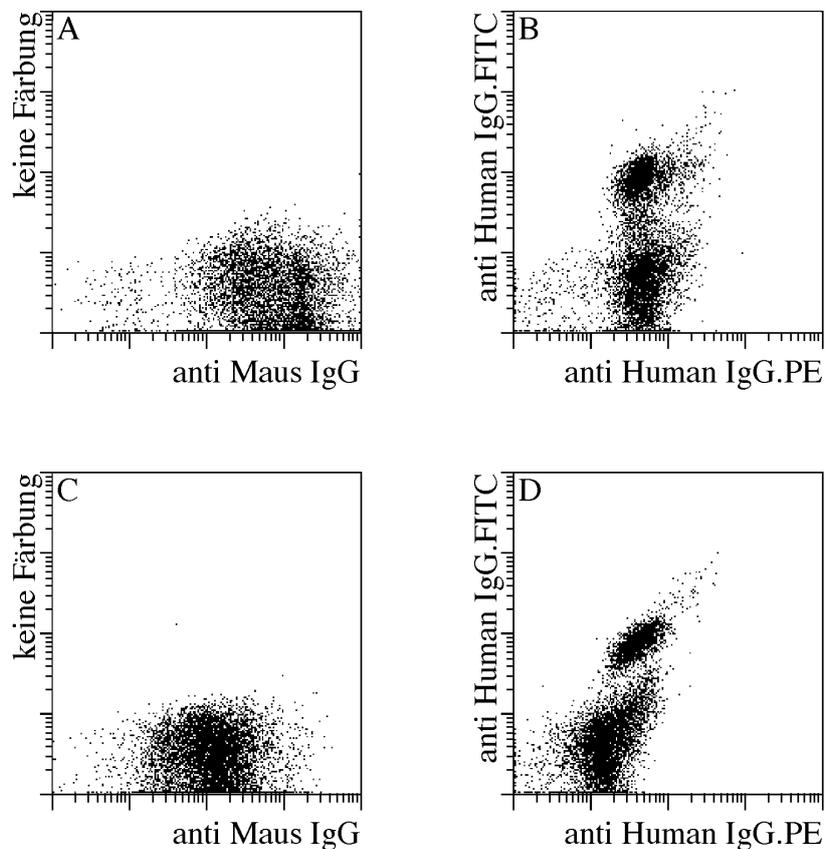


Abb. 5 Test des Sekretionsassays mit CD44-anti-Kappa und CD44-anti-Lambda.

Mononukleare Zellen des peripheren Blutes wurden zunächst mit Maus anti-Human IgG.FITC gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit CD44-anti-Lambda (A,B) bzw. CD44-anti-Kappa (C,D) inkubiert. Die Fangmatrix wurde mit humanem IgG beladen, was anschließend mit Maus anti-Human IgG.PE nachgewiesen wurde (B,D). Als zusätzlicher Test für die Fangmatrix wurde diese bei einem Teil der Zellen mit Ratte anti-Maus IgG.PE direkt angefärbt (A,C).

deutlich besser funktioniert als das CD44-anti-Kappa Konjugat. Die zeigt sich sowohl bei der direkten Färbung der Fangmatrix (Abb. 5, A,C) als auch bei der Färbung des beladenen IgG (Abb. 5, B,D). Dies war für den hier verwendeten anti-Kappa Klon (HP6053) bei allen weiteren produzierten Konjugaten der Fall. Vergleicht man jedoch die Helligkeit des anti-Kappa und des anti-Lambda AK in unkonjugierter Form miteinander, indem man diese mit einem anti-Isotyp AK färbt, so zeigt sich keine unterschiedliche Qualität der Färbung (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Indiz dafür, dass der HP5053 Klon bei der Konjugation derart modifiziert wird, dass seine Bindungsfähigkeit beeinträchtigt wird. Aus diesem Grunde wurden weitere anti-Kappa Klone getestet (TB28.2, 141PF11).

Es zeigt sich aber auch, dass der CD44 AK nicht optimal zu binden scheint, da die Fangmatrix im Vergleich zu denen, die in kommerziell erhältlichen Zytokinsystemen benutzt werden, deutlich schwächer ist. In Sekretionsassays, die mit dem in Abbildung 5 getesteten CD44-anti-Lambda Konjugat durchgeführt wurden, ließen sich nach 30-

minütiger Inkubation bei 37°C auch nie sezernierende Zellen nachweisen, da die Fangmatrix nicht gut genug war. Aus diesem Grunde wurde in den weiteren Versuchen der CD44 AK durch CD45 ersetzt, ein AK von dem man sicher weiß, dass er mit hoher Affinität bindet und der auch in kommerziellen Systemen verwendet wird. CD45 wird zwar auf reifen PC herunterreguliert, aber PC im Blut exprimieren CD45 zum Großteil noch stark. Somit sollte man in der Lage sein, die grundsätzliche Tauglichkeit dieses Ansatzes zu testen. Die Kontrolle eines solchen CD45-anti-Lambda Konjugates ist in Abbildung 6 zu sehen.

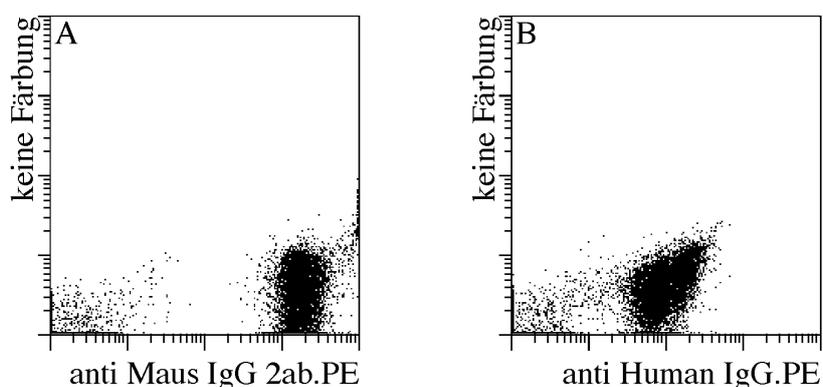


Abb. 6 Test eines CD45-anti-Lambda Konjugates.

PBMC wurden zunächst mit CD45-anti-Lambda inkubiert. Die Fangmatrix wurde mit humanem IgG beladen, welches anschließend mit Maus anti-Human IgG.PE nachgewiesen wurde (B). Um den anti-Lambda AK der Fangmatrix zu testen, wurde dieser bei einem Teil der Zellen spezifisch mit Ratte anti-Maus IgG 2ab.PE angefärbt (A).

Im linken Bild ist die Färbung der Matrix zu sehen (Abb. 6, A), wobei der benutzte AK nur gegen anti-Lambda und nicht gegen CD45 gerichtet ist, was eine differenziertere Aussage über das Konjugat ermöglicht, als der Gebrauch eines AK, der beide Komponenten erkennt. Die hier gefärbte Fangmatrix ist zwar deutlich heller als die der anderen Konjugate, dennoch ist die Färbung des beladenen IgG noch recht schwach (Abb. 6, B). Weiterhin ist zu erwarten, dass die bei der Beladung eingesetzte IgG Konzentration von 10 µg/ml deutlich höher als die während natürlicher Sekretion erreichte ist und damit die Färbung noch schwächer ausfällt.

3.2.2. Sekretionsassays mit AK-AK Konjugaten

Da, wie bereits erwähnt, eine sehr starke Hintergrundfärbung vorhanden ist, war es die wichtigste Aufgabe, einen möglichst großen Teil des Hintergrundes zu eliminieren. Dazu gibt es mehrere Möglichkeiten. Als erstes wurde versucht, die Bindung des Detektions-AK

an Oberflächen Ig durch Zugabe eines Überschusses an ungekoppeltem Detektions-AK vor der Sekretion zu blockieren. In Vorversuchen zeigte sich, dass ein 20-facher Überschuss ausreicht, um den Großteil der Zellen zu blockieren. Es bleibt jedoch stets eine Zellpopulation übrig, deren Oberflächen Ig Färbung sich auch durch einen 100-fachen AK Überschuss nicht blockieren lässt. Ein weitaus größeres Problem stellte allerdings die Tatsache dar, dass die Blockierung nicht stabil ist. Gibt man blockierte Zellen in Kultur, um sie sezernieren zu lassen, so reicht diese kurze Kulturperiode aus, um neues Ig auf die Oberfläche der B-Zellen zu bringen, wo dieses wie das sezernierte Ig anschließend gefärbt wird.

Ein weiterer Ansatz, der verfolgt wurde, ist die Depletion möglichst vieler hintergrundbildender Zellen. Aus diesem Grund wurden Monozyten, T-Zellen und Basophile vor dem eigentlichen Versuch depletiert. Die T-Zellen wurden deshalb depletiert, da sie einen großen Teil an irrelevanten Zellen darstellen, die die zu verarbeitende Zellmenge und die Färbevolumina unnötig vergrößern würden. Auf die Depletion von NK-Zellen und weiterer FcR⁺ Zellen wurde verzichtet, da sich diese stabil blockieren lassen. Somit bleiben als hintergrundproduzierende Zellen nur noch B-Zellen, die aber immer noch 100-1000 mal häufiger als PC sind und deren Oberflächen Ig sich nicht blockieren lässt.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems sind Detektions-AK, die membranständiges Ig im Vergleich zu sezerniertem Ig deutlich schlechter oder gar nicht binden. Für IgA und IgM gibt es AK, die gegen die J-Kette gerichtet sind, eine Ig Komponente, die nur in sezerniertem Ig vorhanden ist. Versuche mit solchen AK führten jedoch nicht zum Erfolg, da sie die J-Kette nicht in der natürlich vorkommenden Form, sondern nur in denaturierten AK erkennen.

Für IgG wurden viele verschiedene anti-IgG Klone miteinander verglichen, indem die Helligkeit der Ig Färbung auf B-Zellen verglichen wurde, da diese hauptsächlich membranständiges Ig besitzen. Die Idee hinter diesen Versuchen war es, Klone zu identifizieren, die membrangebundenes IgG deutlich schlechter erkennen, als FcR gebundenes IgG. Solche Klone würden sich dann für die Detektion von eingefangenen IgG anbieten. Es zeigten sich zwar zum Teil deutliche Unterschiede in der Fähigkeit, membranständiges Ig zu binden, jedoch waren diese Unterschiede letztendlich in der Praxis nicht groß genug.

Am Ende blieb also nur die Möglichkeit, eine Fangmatrix herzustellen, die so hell ist, dass auf ihr eingefangenes Ig deutlich heller gefärbt wird als bereits vorhandenes Oberflächen Ig. Deutlich heller bedeutet in diesem Fall, dass diese beiden Populationen deutlich

voneinander getrennt erkennbar sein müssen, was mindestens einen Faktor von 5 in der Helligkeit bedeutet. Alle bisherigen Versuche und Kopplungen, die mit AK-AK Konjugaten durchgeführt wurden, zeigten, dass dieser Ansatz diese benötigten Helligkeiten nicht erreichen konnte. Aus diesem Grunde wurde beschlossen, im weiteren Verlauf auf die Biotinylierung der Zellen zurückzugreifen, da mit diesem System eine deutliche Steigerung der Helligkeit möglich ist.

3.2.3. Sekretionsassay mit Biotinylierung und Avidin-AK Konjugaten

Durch die Biotinylierung entsteht eine Biotindichte auf der Zelloberfläche, die um ein Vielfaches höher ist, als die von CD44 oder CD45. Verankert man die Fangmatrix mit Avidin an das Biotin, so ist die entstehende Fangmatrix ebenfalls um ein vielfaches heller. Dies ist in Abbildung 7 dargestellt.

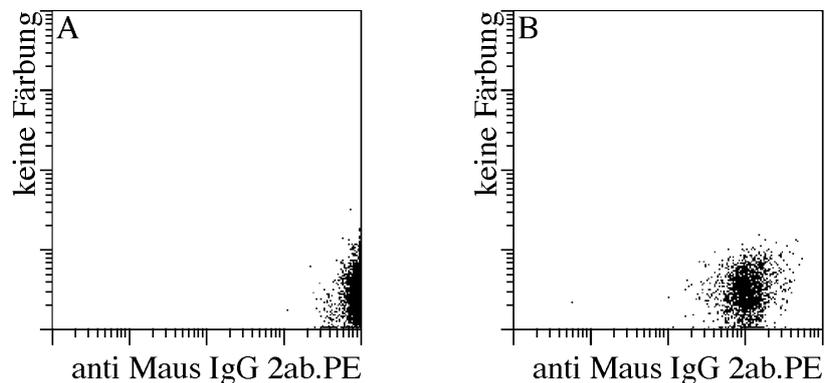


Abb.7 Vergleich der zwei verschiedenen Sekretionsassay-Systeme.

Im ersten System (A) wurden zunächst alle Zellen biotinyliert. Anschließend wurde die Avidin-anti-Lambda Fangmatrix auf die Zellen gebracht. Die Färbung der Fangmatrix erfolgte mit Ratte anti-Maus IgG 2ab.PE. Im zweiten System (B) wurde die CD45-anti-Lambda Fangmatrix auf die Zellen gegeben und mit Ratte anti-Maus IgG 2ab.PE nachgewiesen. Es zeigt sich, dass das Biotinylierungssystem um ein Vielfaches heller ist als die bisherige Methode mit den AK-AK Konjugaten.

Leider wurde durch die Biotinylierung der Zellen ein weiteres Problem geschaffen. In diesem Fall ist es die Aggregatbildung der biotinylierten Zellen durch Zugabe von Avidin-AK Konjugaten, wie sie in Abbildung 8 gezeigt ist.

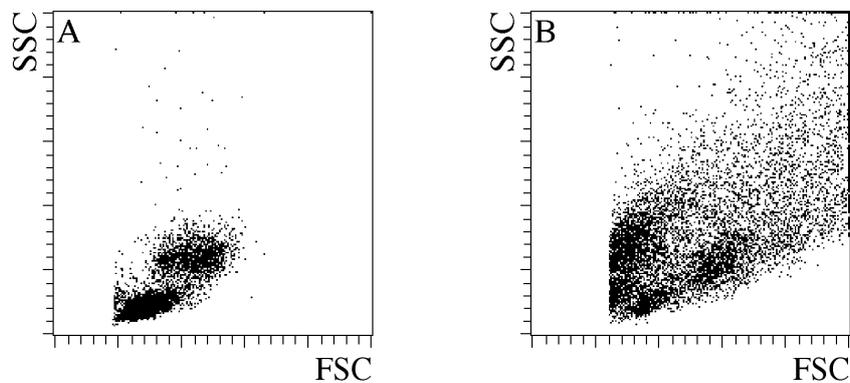


Abb. 8 Streulichteigenschaften von PBMC nach Zugabe von Avidin-anti-Lambda zu biotinylierten Zellen.
 Auf der linken Seite (A) ist das Streulichtbild von PBMC dargestellt, die mit CD45-anti-Lambda beladen sind. Es entspricht dem normaler PBMC. Im Gegensatz dazu zeigen PBMC, die biotinyliert und mit Avidin-anti-Lambda beladen sind (B), ein deutlich verändertes Streulichtbild, das von Aggregaten und Zelltrümmern geprägt ist.

Da es offenbar in dem Avidin-AK Konjugat viele Moleküle gibt, die mehr als ein Avidin besitzen, führt dies zur extremen, nicht reversiblen Verklumpung der biotinylierten PBMC. Aus diesem Grunde wurde eines der Konjugate über eine HiLoad 16/60 Superdex Gelfiltrationssäule (Pharmacia) größenfraktioniert, wobei die Moleküle, die am größten sind, die Säule als erstes wieder verlassen.

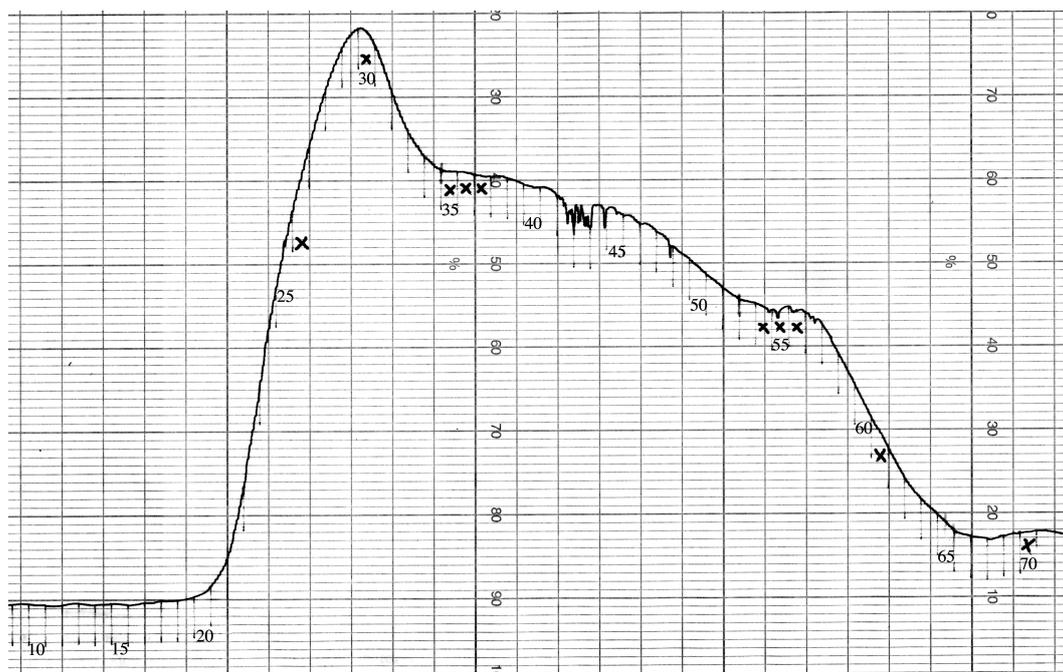


Abb. 9 Säulenchromatographische Auftrennung eines Avidin-anti-Lambda Konjugates.
 Das Avidin-anti-Lambda Konjugat wurde über eine Gelfiltrationssäule größenfraktioniert. Der Graph zeigt die Proteinkonzentration (Y-Achse) gegen die Zeit (X-Achse) an. Vertikale Linien zeigen den Beginn einer neuen Fraktion an, die von 1 bis 70 durchnummeriert sind. Die mit einem Kreuz gekennzeichneten Fraktionen wurden später im Sekretionsassay getestet.

In der graphischen Darstellung der Größenverteilung des Konjugates in Abbildung 9 fällt auf, dass das Konjugat hauptsächlich aus großen Multimeren besteht, bei denen mehrere Avidin-Moleküle an einen AK gebunden sind. Das gewünschte Verhältnis von 1:1 liegt nur in geringen Mengen vor und ist, wie in Abbildung 10 ersichtlich, um die Fraktion 61 herum vorhanden. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend auf biotinylierten PBMC getestet. Hierbei wurde vor allem auf den Grad der Verklumpung und die Helligkeit der Fangmatrix geachtet.

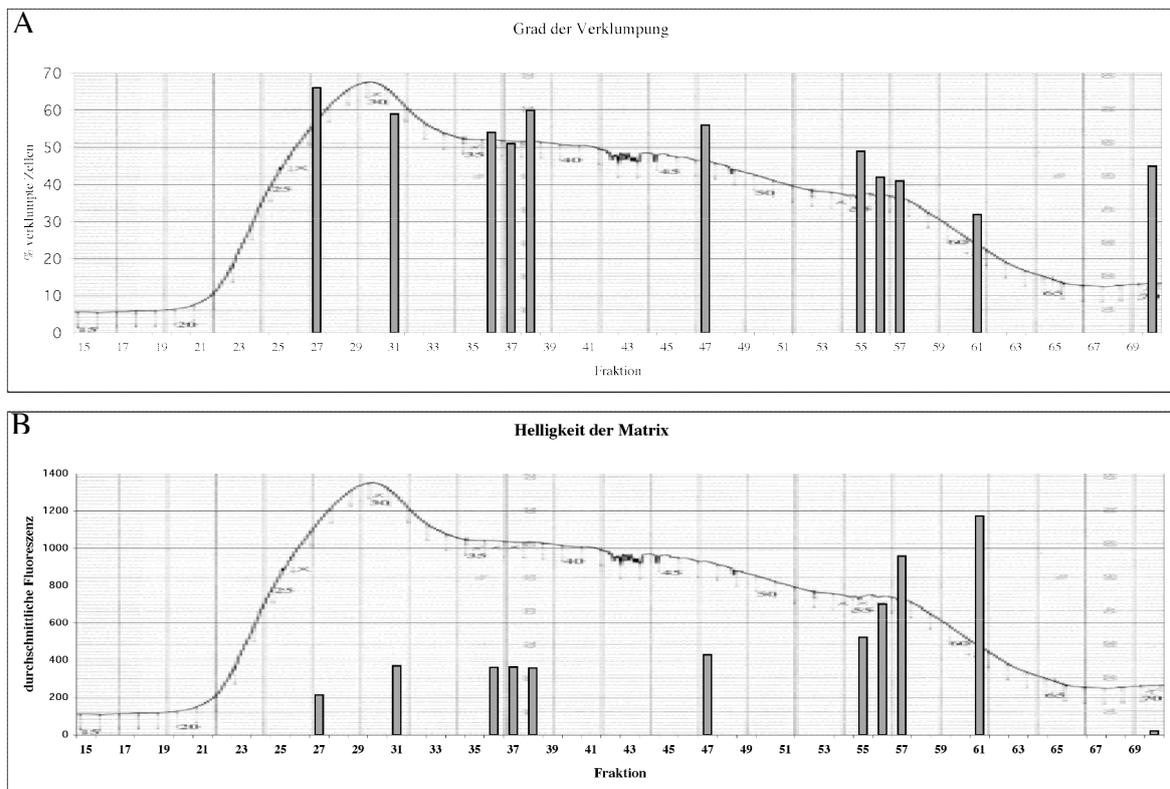


Abb 10. Analyse verschiedener Fraktionen der Größenfraktionierung.

Mit den in Abbildung 9 gekennzeichneten Fraktionen wurden Tests, wie in den Abbildungen 7 und 8 beschrieben, durchgeführt. Zum einen wurde der Grad der Verklumpung der Zellen anhand des Streulichtbildes bestimmt (A). In (A) ist der Prozentsatz der verklumpten Zellen (Y-Achse) gegen die getestete Fraktion (X-Achse) aufgetragen. Zum anderen wurde die Helligkeit des Konjugates untersucht (B). Hier ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Y-Achse) gegen die getestete Fraktion (X-Achse) aufgetragen. Der Übersicht halber wurden beide Darstellungen mit dem Graph aus der Größenfraktionierung hinterlegt.

In Abbildung 10 ist die getestete Fraktion gegen das Maß der Verklumpung bzw. die erreichte Helligkeit der Fangmatrix aufgetragen. Dazu muss gesagt werden, dass der Wert ‚% verklumpte Zellen‘ diejenige Zahl an Zellen angibt, die außerhalb des üblichen Streulichtbereiches liegen zuzüglich toter Zellen. Tote Zellen werden deshalb

mitberechnet, da das während der Zellfärbung nötige Resuspendieren der Zellen und Zellaggregate zu sehr hohen mechanischen Belastung der Zellaggregate und damit auch zum Zelltod führt. Weiterhin gibt es immer einen gewissen Prozentsatz an toten Zellen und auch Zellen wie Erythrozyten und Granulozyten, die außerhalb des üblichen Streulichtbereiches liegen. Diese Zellen bilden sozusagen den Hintergrund für den Wert ‚% verklumpte Zellen‘. Im Bereich der ersten Fraktionen, in denen die größten Multimere auftreten, ist die verursachte Zellverklumpung sehr groß und die Helligkeit der Fangmatrix relativ gering. Demgegenüber führt das Konjugat in Fraktion 61 zu sehr wenig Zellverklumpung und einer sehr hellen Fangmatrix. In den letzten Fraktionen ist nur noch freies Avidin vorhanden, was zu wenig Verklumpung, aber auch keiner Färbung führt. Diese Versuche legten nahe, das Avidin-AK Kopplungsprotokoll zu überarbeiten und im Weiteren haben wir für die Kopplung ein Avidin:AK Verhältnis von 1:2 gewählt. Zuvor war das Kopplungsverhältnis genau umgekehrt. Folglich gab es in den weiteren Versuchen keine Probleme mehr mit der Verklumpung der Zellen.

Wie bereits erwähnt, wurden neben dem anti-Kappa Klon HP6053 auch die Klone 141PF11 und TB28.2 getestet. Alle anti-Kappa und anti-Lambda AK wurden nach dem neuen Protokoll an Avidin gekoppelt und anschließend auf biotinylierten PBMC getestet. Ein Auszug des Ergebnisses dieses Tests ist in Abbildung 11 aufgezeigt.

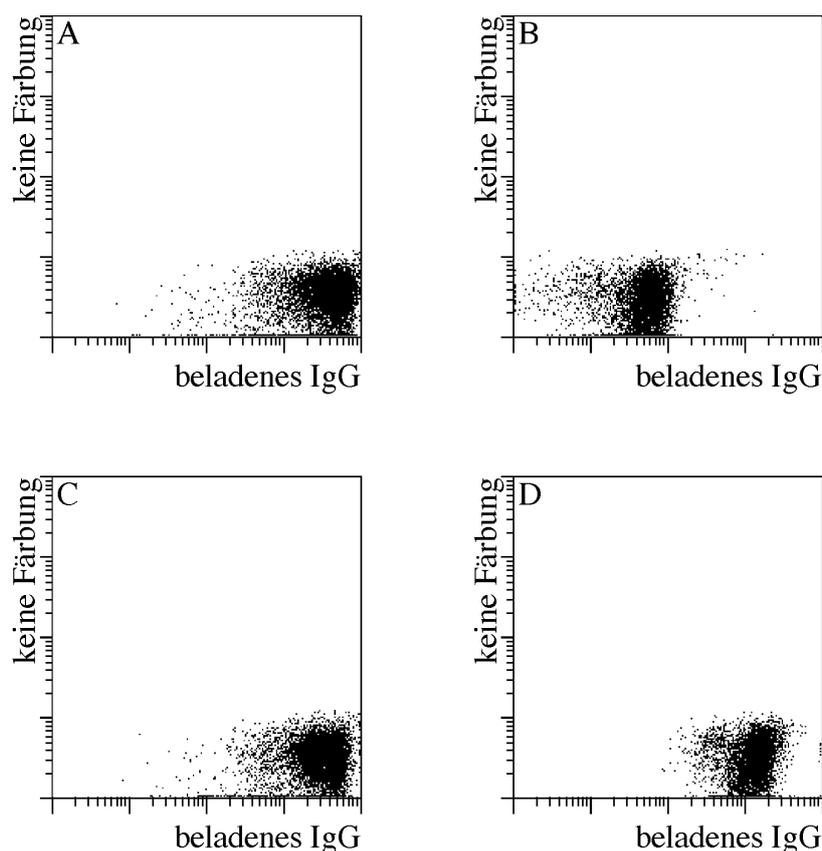


Abb. 11 Test verschiedener Avidin-AK Konjugate nach Beladung.

PBMC wurden biotinyliert und anschließend mit verschiedenen Avidin-AK Konjugaten inkubiert. Die Fangmatrix wurde mit 10 µg/ml humanem IgG beladen. Der Nachweis des IgG erfolgte mit Maus anti-human IgG.PE. Es wurden die AK-Klone HP6064 (anti-Lambda) (A), HP6053 (anti-Kappa) (B), TB28.2 (anti-Kappa) (C) sowie 141PF11 (anti-Kappa) (D) getestet.

Es ist auch hier deutlich zu erkennen, dass HP6053 (Abb. 11, B) offenbar kein guter Kandidat für den Sekretionsassay ist. Deutlich besser geeignet ist der Klon 141PF11 (Abb. 11, D). Die hellsten Färbungen dagegen erreicht man mit dem Klon TB28.2 (Abb. 11, C) und dem anti-Lambda AK (HP6054) (Abb. 11, A).

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit bietet schließlich noch das Detektionssystem. Das bislang benutzte direkte Färbesystem mit PE-gekoppelten Detektions-AK erreicht nicht die Helligkeiten, die man mit einem indirekten Färbesystem erhalten kann. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen mit anti-IgG.Dig, anti-IgA.Dig bzw. anti-IgE.Dig und anti-Dig.APC detektiert.

Ein Beispiel eines vollständigen Sekretionsassays, bei dem IgA sezernierende PC nachgewiesen wurden, ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Versuch wurde nach dem in Abschnitt 2.8.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD38.FITC, CD138.PE und CD20.PerCP gefärbt. Die Färbung mit CD20.PerCP diente der Ausgrenzung von B-Zellen im selben Kanal, in dem auch tote Zellen mit PI ausgegrenzt werden. Es stellte sich im Rahmen dieser Versuche heraus, dass CD20, im Gegensatz zu CD19 schon sehr früh während der PC Entwicklung herunterreguliert wird. Somit ist man in der Lage, einen weiteren großen Teil der Hintergrund produzierenden Zellen auszugrenzen, ohne dass man dabei PC verliert.

Wie in Abb. 12, C zu sehen ist, wird im Kontrollansatz ohne Fangmatrix nur eine relativ kleine Population von Zellen durch den anti-IgA AK angefärbt. Bei diesen Zellen, die größtenteils auch CD38 stark exprimieren, handelt es sich um IgA⁺ PC, deren membranständiges IgA durch das Detektionssystem nachgewiesen wurde (siehe auch Abb. 3). Folgerichtig wird die Färbung dieser Zellen in dem Ansatz mit Fangmatrix (Abb. 12, D) durch das sezernierte und eingefangene IgA noch heller und hebt sich deutlich gegenüber dem nur schwach vorhandenen Hintergrund ab. Setzt man eine Region um diese sezernierenden Zellen (R3 in Abb. 12, D) und stellt nur diese Zellen dar, so zeigt sich, dass alle Zellen die typischen Streulichteigenschaften von PC besitzen (Abb. 12, F). Die zusätzliche Färbung gegen CD138 zeigt eindeutig, dass nur etwa 30% aller IgA sezernierenden PC CD138⁺ sind. Dieser Wert liegt deutlich unter dem Wert, den man

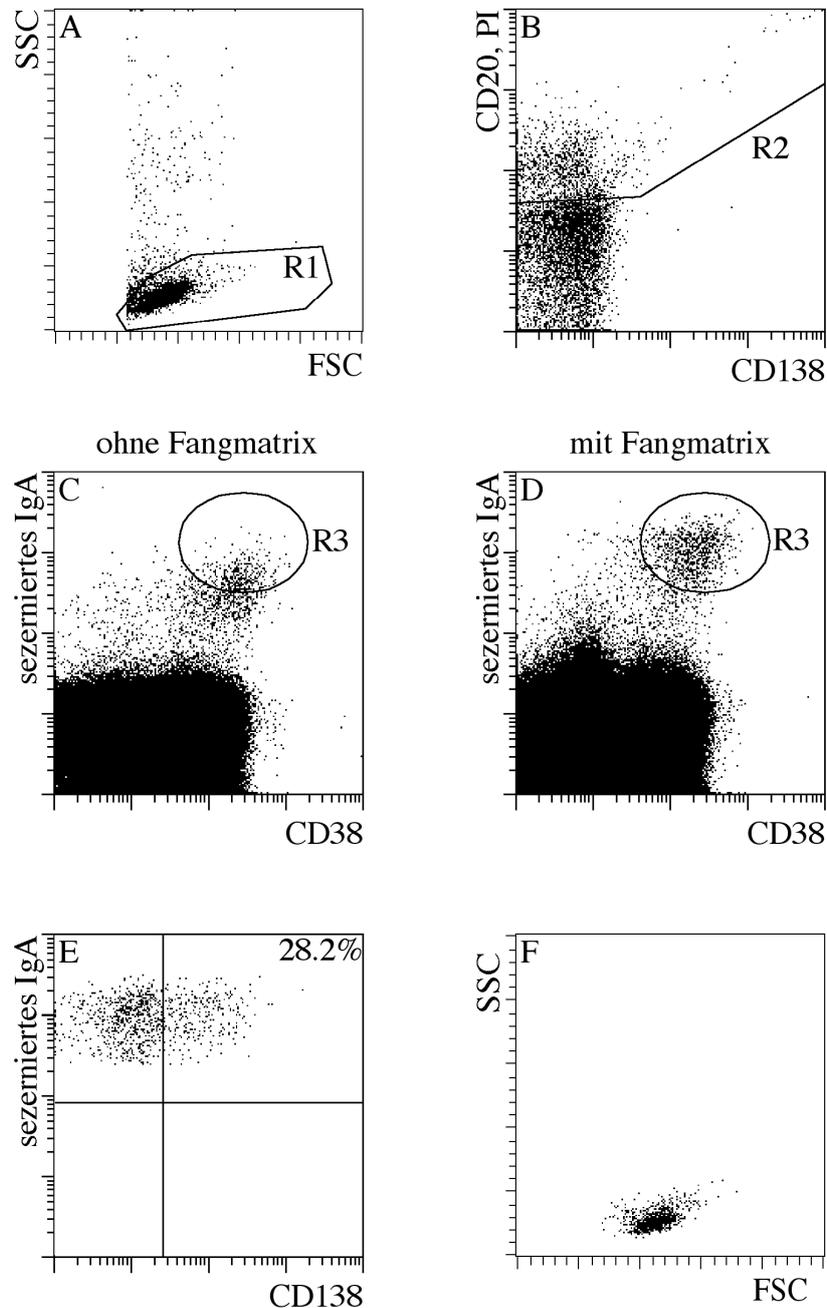


Abb. 12 Detektion IgA sezernierender Zellen im peripheren Blut eines Normalspenders.

Monozyten, T-Zellen und Basophile wurden zunächst depletiert und die restlichen Zellen anschließend biotinyliert. Als Fangmatrix wurde Avidin-anti-Kappa (TB28.2) und Avidin-anti-Lambda (HP6054) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Sekretionsphase wurde das sezernierte IgA mittels anti-IgA.Dig und anti-Dig.APC nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD38.FITC, CD138.PE und CD20.PerCP gefärbt. Die Darstellungen in (C) und (D) wurden durch Ausgrenzung der Zellen in den Regionen R1 (A) und R2 (B) auf lebende CD20⁺ Lymphozyten begrenzt. Die Kontrolle ohne Fangmatrix ist in (C) dargestellt. In (E) und (F) ist zusätzlich noch die Region R3 (D) aktiviert, was die Darstellung auf Zellen aus dieser Region begrenzt. Es zeigt sich, dass etwa 30% aller IgA sezernierenden PC CD138 exprimieren (E) und die sezernierenden Zellen die typischen Streulichteigenschaften von PC besitzen (F).

aufgrund vorhandener Literatur erwartet hätte (50%). Dieser Punkt wird in der Diskussion noch ausführlicher besprochen.

Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Detektion IgG sezernierender PC ein anderes Bild (Abbildung 13). Der Versuchsablauf entsprach prinzipiell dem in Abbildung 12, mit dem

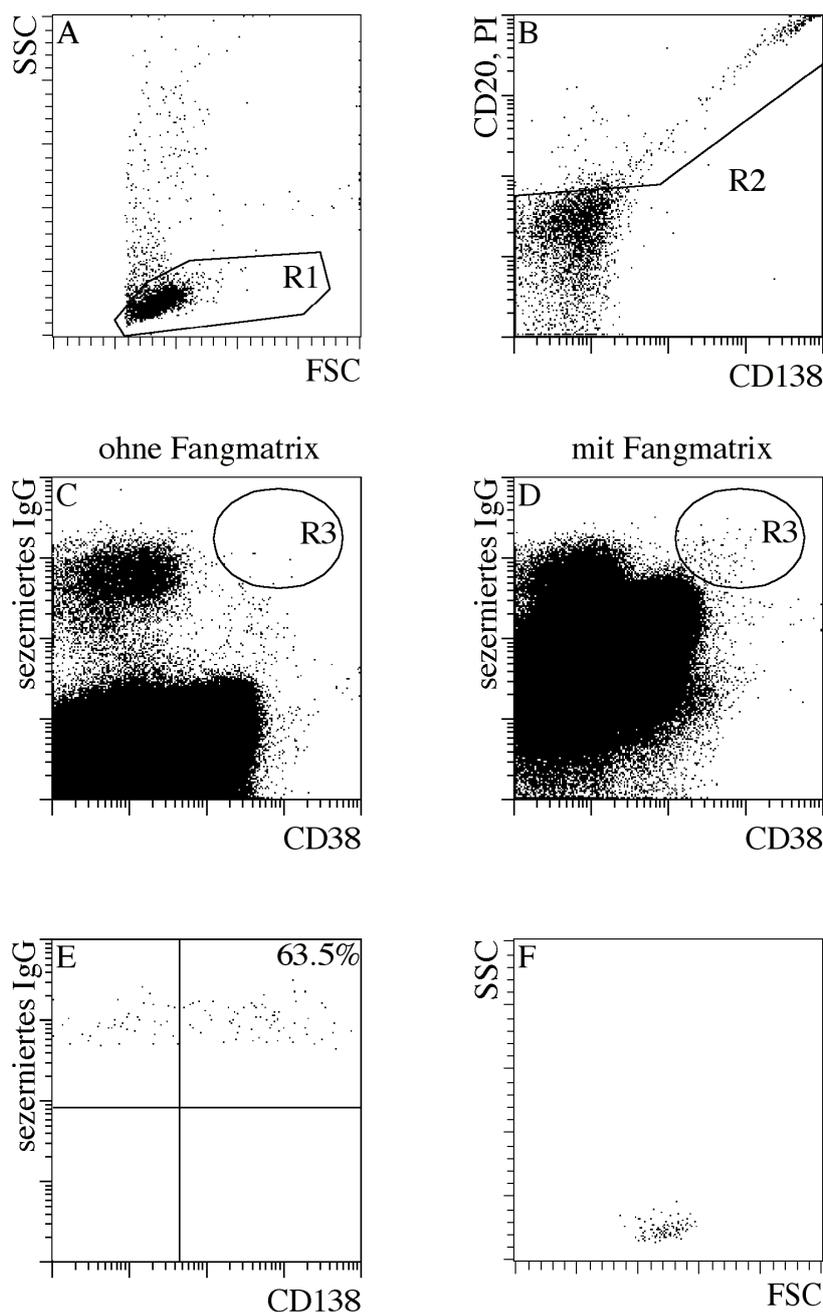


Abb. 13 Detektion IgG sezernierender Zellen im peripheren Blut eines Normalspenders.

Monozyten, T-Zellen und Basophile wurden zunächst depletiert und die restlichen Zellen anschließend biotinyliert. Als Fangmatrix wurde Avidin-anti-Kappa (TB28.2) und Avidin-anti-Lambda (HP6054) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Sekretionsphase wurde das sezernierte IgG mittels anti-IgG.Dig und anti-Dig.APC nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD38.FITC, CD138.PE und CD20.PerCP gefärbt. Die Darstellungen in (C) und (D) wurden durch Ausgrenzung der Zellen in den Regionen R1 (A) und R2 (B) auf lebende CD20⁺ Lymphozyten begrenzt. Die Kontrolle ohne Fangmatrix ist in (C) dargestellt. In (E) und (F) ist zusätzlich noch die Region R3 (D) aktiviert, was die Darstellung auf Zellen aus dieser Region begrenzt. Es zeigt sich, dass etwa 64% aller IgG sezernierenden PC CD138 exprimieren (E) und die sezernierenden Zellen die typischen Streulichteigenschaften von PC besitzen (F).

Unterschied, dass zur Detektion anti-IgG.Dig und anti-Dig.APC benutzt wurde. Ein erster großer Unterschied zum IgA Sekretionsassay zeigt sich in Abb. 13, C. Hier ist eine deutliche Population hintergrundproduzierender Zellen zu erkennen, die sich auch durch die Ausgrenzung CD20⁺ Zellen nicht unterdrücken lässt. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um natürliche Killerzellen, die Fcγ-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen, und somit in der Lage sind, IgG zu binden. Ein weiteres Problem zeigt sich in Abb. 13, D. Während in der Kontrolle ohne Fangmatrix Abb. 13, C die IgG⁻ Zellen tatsächlich auch negativ bleiben, werden in der Probe mit Fangmatrix alle IgG⁻ Zellen durch den IgG Detektionsantikörper mehr oder weniger stark unspezifisch angefärbt. Dies hat zur Folge, dass sich die wirklich positiven Zellen, die IgG sezernieren, nur unzureichend, und dies auch nur mit Hilfe einer zusätzlichen CD38 Färbung von den negativen Zellen diskriminieren lassen. Dennoch zeigen sich auch hier die typischen Streulichteigenschaften der sezernierenden Zellen (Abb. 13, F) und im Gegensatz zum IgA Sekretionsassay exprimiert der größte Teil aller IgG sezernierenden Zellen CD138 (64%) (Abb. 13, E).

3.3. Detektion IgE produzierender PC im Blut von Normalspendern, Atopikern und einem Hyper IgE Patienten

In Atopikern und Patienten mit Hyper IgE Syndrom findet man sehr hohe IgE Serumtiter vor. Obwohl es einige Publikationen gibt, die IgE sezernierende B-Zellen nachweisen, bleiben viele Fragen noch unbeantwortet. Dies liegt vor allem an den bislang benutzten Methoden, da diese entweder nicht genügend sensitiv waren, oder die genaue Charakterisierung der IgE produzierenden Zellen nicht zuließen. So ist beispielsweise unklar, in welchem Verhältnis PC des peripheren Blutes und der Serum IgE Titer miteinander stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Auftreten und die Rolle IgE sezernierender PC im Blut analysiert, wobei versucht wurde, ein Modell zu erstellen, mit dem sich die persistierenden erhöhten IgE Serumtiter erklären lassen.

3.3.1. Magnetische CD138 Anreicherung

3.3.1.1. Intrazelluläre IgE Färbung in CD138 angereicherten PC

Mit der zu Beginn dieser Arbeit etablierten Methode der magnetischen CD138 Anreicherung (siehe Abschnitt 2.3) wurden PC aus dem Blut von 24 Normalspendern, 22 Atopikern und 1 Patienten mit Hyper IgE Syndrom isoliert. Die Zellen wurden auf der Anreicherungssäule für intrazelluläres IgE und andere Marker gefärbt. Da es sich bei IgE⁺

PC, insbesondere bei Normalspendern, um extrem seltene Zellen handelt, ist die Kontrolle der Spezifität der Färbung besonders wichtig. Hierzu wurde der anti-IgE Färbeantikörper zuvor mit einem 1000-fachen Überschuss an IgE vorinkubiert. Ein Beispiel einer intrazellulären IgE Färbung auf einem Hyper IgE Patienten und einem Normalspender ist in Abbildung 14 dargestellt. Es ist zu sehen, dass der Atopiker deutlich mehr IgE⁺ CD138⁺ PC als der Normalspender besitzt (Abb. 14, A,C). In beiden Fällen zeigt die Kontrollfärbung, dass es sich tatsächlich um IgE⁺ PC handelt (Abb. 14, B,D).

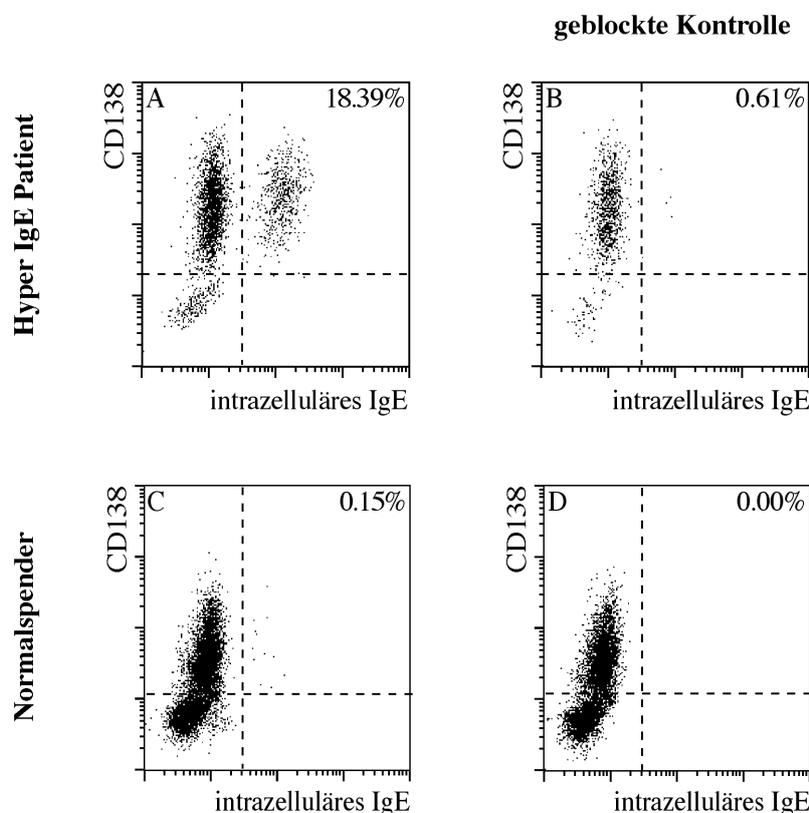


Abb. 14 Vergleich der Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ PC in einem Hyper IgE Patienten mit einem Normalspender CD138⁺ PC wurden aus dem peripheren Blut eines Hyper IgE Patienten (IgE Serumentiter 19940 kU/l) (A,B) und eines Normalspenders (IgE Serumentiter 36 kU/l) (C,D) magnetisch angereichert. Die angereicherten Zellen wurden zunächst für CD138 gefärbt, dann fixiert und permeabilisiert und anschließend intrazellulär gegen IgE gefärbt. Alle Darstellungen sind auf Lymphozyten beschränkt und zeigen die Färbung von intrazellulärem IgE (X-Achse) gegen CD138 (Y-Achse). Die Darstellungen (B) und (D) zeigen die blockierten Kontrollfärbungen, d.h. dass der anti-IgE AK für 30 min mit einem 1000-fachen Überschuss an IgE vorinkubiert wurde. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf IgE⁺ Zellen unter CD138⁺ PC. Im Normalspender lassen sich nur wenige IgE exprimierende Zellen unter CD138⁺ PC erkennen (C), während im Hyper IgE Patienten die Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ PC sehr hoch ist (A).

Weiterhin fällt auf, dass nur PC für IgE gefärbt sind. Es gelang uns bisher nicht, IgE auf der Oberfläche von B-Zellen zu färben. Dies liegt entweder an den bislang getesteten AK,

die membranständiges IgE möglicherweise nicht erkennen, oder aber es gibt keine B-Zellen, die membrangebundenes IgE besitzen. IgE auf Fc γ Rezeptoren hingegen lässt sich ohne weiteres anfärben.

3.3.1.2. *IgE Produktion der angereicherten PC*

Um zu testen ob die IgE⁺CD138⁺ PC IgE sezernieren, wurden CD138⁺ PC, unseparierte PBMC und CD138 depletierte PBMC eines Atopikers und von vier Normalspendern in Kultur genommen. Anschließend wurden die Überstände mittels eines ELISAs auf sezerniertes IgE untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Lediglich in der CD138 angereicherten Fraktion des Atopikers konnte eine deutliche IgE Sekretion nachgewiesen werden (273 kU/l). Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung nach der Separation der Zellen. Während der Atopiker 28,8% IgE⁺ Zellen unter CD138⁺ PC und einen IgE Serumentiter von 5000 kU/l hatte, lagen die Mittelwerte der vier Normalspender bei 0,15% bzw. 63,5 kU/l. Die geringen Mengen an produziertem IgE lagen wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze des IgE ELISA (2kU/l).

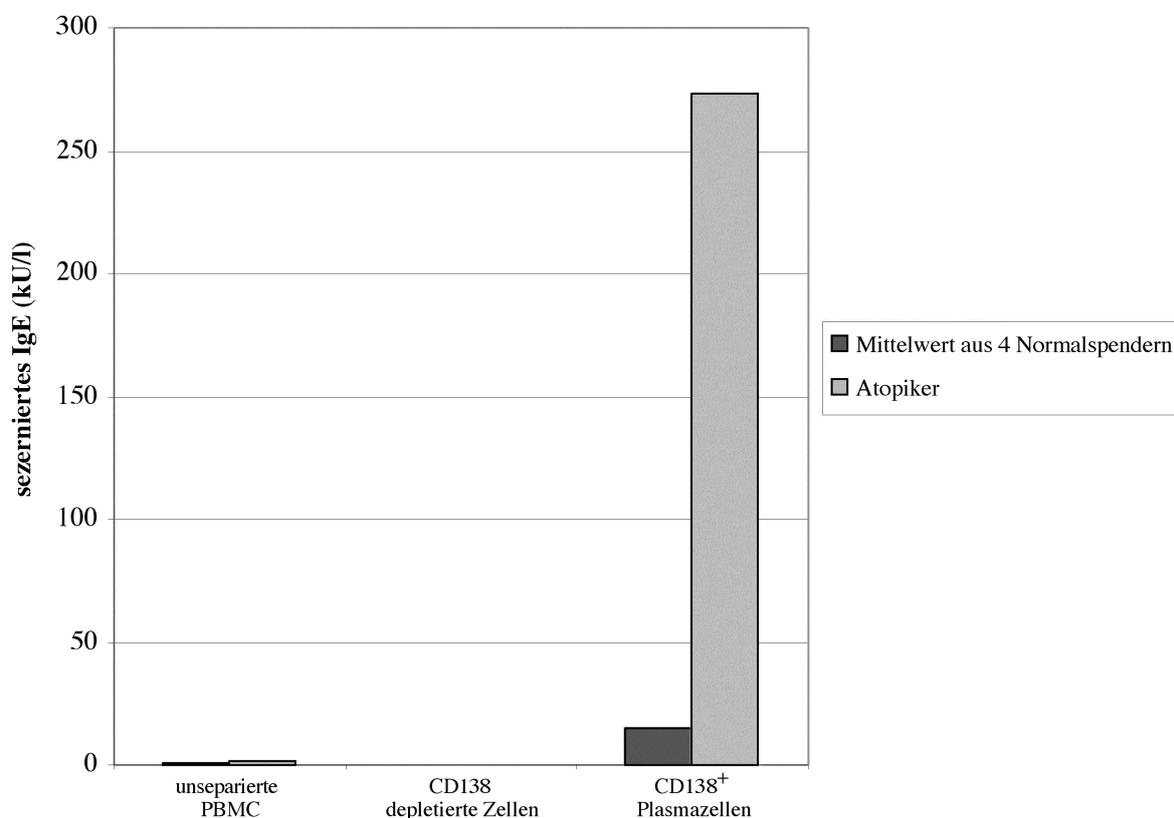


Abb. 15 Mit CD138 angereicherte PC eines Atopikers sezernieren in Kultur IgE.

Angereicherte CD138⁺ PC, CD138 depletierte PBMC und unseparierte PBMC eines Atopikers (helle Balken; 28,8% IgE⁺ Zellen unter CD138⁺ PC) und 4 Normalspendern (Mittelwert als dunkler Balken; Mittelwert von 0,15% IgE⁺ Zellen) wurden für 24 Stunden ohne weitere Stimuli in Kultur genommen. Die IgE Mengen im Überstand wurden durch einen IgE ELISA bestimmt. Die Berechnung aller Werte basiert auf einer Zellkonzentration von 1*10⁵ Zellen/ml.

Bei einer Untersuchung der Atopikerin in der Uniklinik Köln zeigte sich, dass die Patientin unter anderem allergisch auf die zwei Hauptallergene der Hausstaubmilbe, nämlich dermatophagoides pteronyssinus und dermatophagoides farinae, reagiert. In einem Allergen-spezifischen IgE ELISA mit den Kulturüberständen gegen diese beiden Allergene ließ sich IgE dieser Spezifität nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt deutlich, dass es sich bei den großen Mengen der im Blut vorhandenen CD138⁺ PC um Zellen handelt, die mit der Krankheit korreliert sind.

3.3.1.3. Korrelation der Häufigkeit von IgE⁺ CD138⁺ PC mit dem IgE Serumentiter

Es wurde bereits in einigen Publikationen gezeigt, dass die Häufigkeit von IgE sezernierenden B-Zellen mit den gefundenen IgE Serumentitern korrelieren. Abbildung 16 stellt die Korrelation der Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ PC unter PBMC mit dem IgE Serumentiter dar.

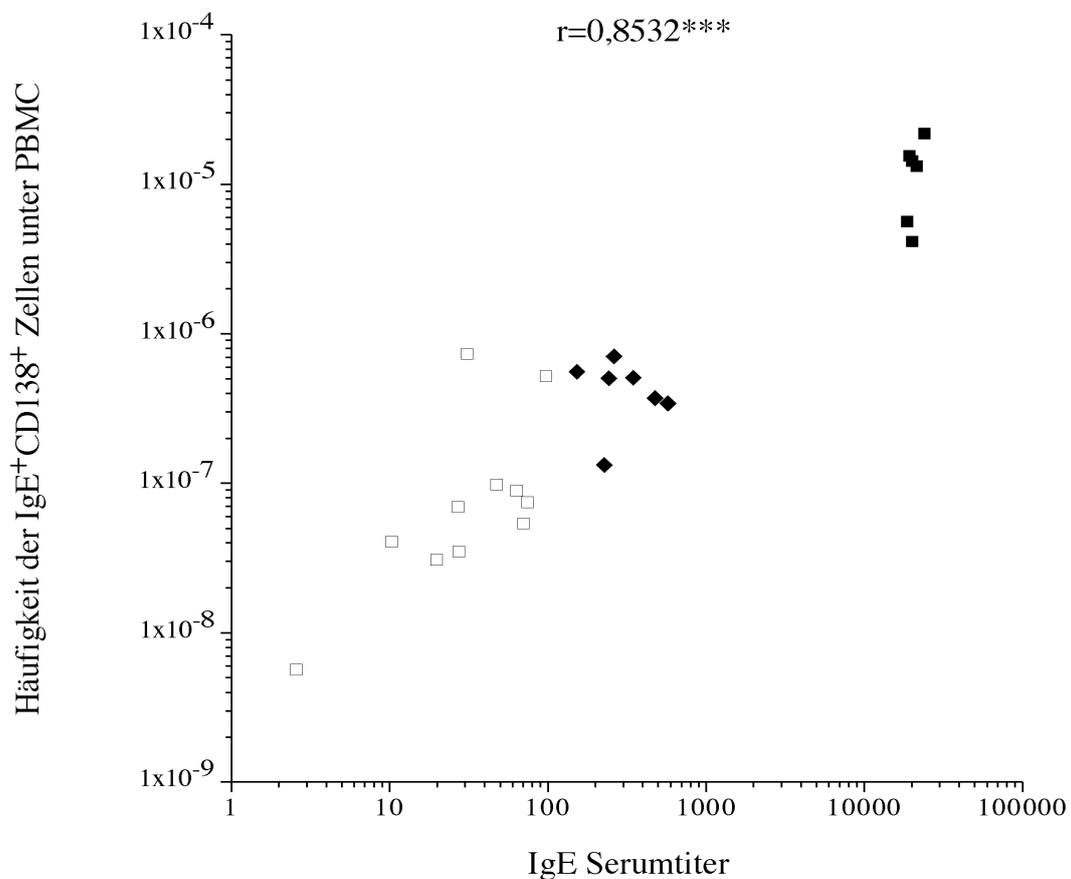


Abb. 16 Die IgE Serumentiter korrelieren mit der Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ PC unter PBMC.

Die Häufigkeit der IgE⁺CD138⁺ Plasmazellen wurde wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben berechnet. Normalspender sind als offene Quadrate, Atopiker als geschlossene Rauten und Atopiker mit deutlich erhöhtem IgE Serumentiter als geschlossene Quadrate dargestellt. Zur Bestimmung der Korrelation wurde der Spearman Korrelationstest benutzt.

Die Häufigkeit wurde mit der in Abschnitt 2.9.3 beschriebenen Methode berechnet. Normalspender besitzen einen IgE Serumentiter bis 150 kU/l. Atopiker lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Atopiker und Atopiker mit deutlich erhöhtem IgE Serumentiter. Erstere haben Titer zwischen 150 und 1000 kU/l, während letztere IgE Titer größer als 1000 kU/l besitzen. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich meist durch die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung. Der Hyper IgE Patient hatte einen Titer von 19940 kU/l. Es zeigt sich eine hochsignifikante lineare Korrelation ($r=0,8532$; $P<0,0001$), d.h. je höher der IgE Titer ist, desto höher ist die Häufigkeit von IgE⁺ PC im Blut.

3.3.2. Detektion IgE sezernierender Zellen mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie

Um zu überprüfen, ob die mit der CD138 Anreicherung isolierten PC tatsächlich eine repräsentatives Bild aller PC im Blut darstellen, wurde die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie benutzt, um alle IgE sezernierenden Zellen im peripheren Blut nachzuweisen. Dazu wurde Atopikern Blut entnommen und aus der einen Hälfte der Zellen PC mit CD138-Mikropartikeln angereichert, während mit der anderen Hälfte der PBMC ein IgE Sekretionsassay durchgeführt wurde. Die aus beiden Methoden berechnete Häufigkeit der IgE⁺ PC wurde verglichen und die im Sekretionsassay nachgewiesenen IgE sezernierenden Zellen wurden mit CD138 gegengefärbt. Das Ergebnis des Sekretionsassays ist in Abbildung 17 dargestellt.

In Abb. 17, A ist die Kontrolle ohne Fangmatrix und in Abb. 17, B die Probe mit Avidin-anti-Lambda Fangmatrix dargestellt. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Sekretionsassays mit IgA und IgG wurden in diesem Versuch lediglich sezernierte AK vom Typ Lambda nachgewiesen, da zu diesem Zeitpunkt noch kein geeigneter anti-Kappa AK vorhanden war. Somit ist die Zahl der tatsächlich vorhandenen IgE sezernierenden Zellen etwa doppelt so hoch. Es ist deutlich eine distinkte Population von IgE⁺ Zellen zu erkennen, die alle CD38 stark exprimieren. Lässt man sich nur die Zellen aus der dargestellten Region (R1 aus Abb. 17, B) anzeigen, so zeigt sich, dass etwa zwei Drittel der Zellen CD138 exprimieren (Abb. 17, C) und alle Zellen die für PC typischen

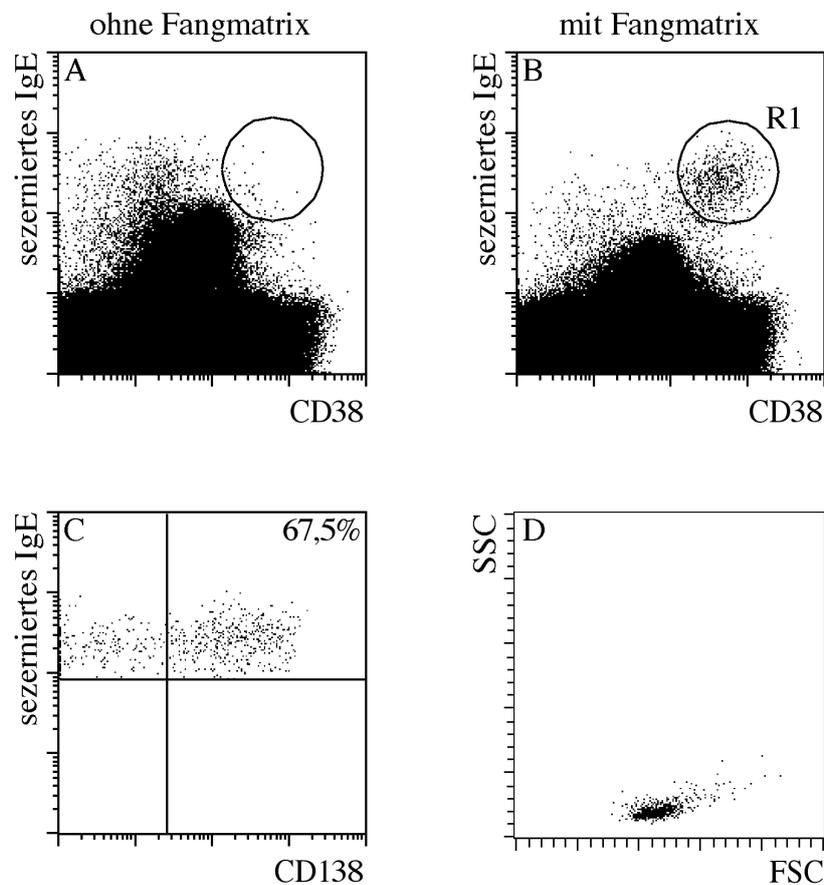


Abb. 17 Detektion IgE sezernierender Zellen im peripheren Blut eines Atopikers (IgE Serumtiter 20000 kU/l) mit der zellulären Affinitätsmatrix Technologie.

Monozyten, T-Zellen und Basophile wurden zunächst depletiert und die restlichen Zellen anschließend biotinyliert. Als Fangmatrix wurde Avidin-anti-Lambda (HP6054) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Sekretionsphase wurde das sezernierte IgE mittels anti-IgE.Dig und anti-Dig.APC nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD38.FITC und CD138.PE gefärbt. Alle Darstellungen sind auf lebende Lymphozyten begrenzt. Die Kontrolle ohne Fangmatrix ist in (A) dargestellt. In (C) und (D) ist zusätzlich noch die Region R1 (B) aktiviert, was die Darstellung auf Zellen aus dieser Region begrenzt. Es zeigt sich, dass ein Großteil der IgE sezernierenden PC CD138 exprimieren (C) und die sezernierenden Zellen die typischen Streulichteigenschaften von CD138 angereicherten PC besitzen (D).

Streulichteigenschaften besitzen (Abb. 17, D). Die mit dem Sekretionsassay und der intrazellulären Färbung bestimmten Häufigkeiten an IgE⁺ PC stimmt auch sehr gut überein (6,7%/7,8%, 5,6%/4,0%, 2,6%/2,7%; wobei der jeweils erste Wert aus dem Sekretionsassay stammt). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass zumindest für IgE CD138⁺ PC einen Großteil aller vorhandenen PC ausmachen und die CD138 Anreicherung eine ausreichende Methode für die Analyse von IgE⁺ PC darstellt.

3.4. PLA spezifische CD138⁺ PC im Verlauf der Hyposensibilisierung mit Insektengift

Eine Hyposensibilisierung mit Insektengift führt in 80-90% aller Fälle zum Erfolg, was bedeutet, dass die betroffene Person im Falle eines erneuten Insektenstichs nicht mehr mit einer allergischen Reaktion wie z.B. einem anaphylaktischen Schock reagiert. Die Mechanismen, die dem therapeutischen Effekt der Hyposensibilisierung zu Grunde liegen, sind jedoch immer noch weitgehend unklar. Ein Teil der Forscher vertritt die Meinung, der Erfolg beruhe darauf, dass sich im Laufe der Therapie das Zytokinprofil der T-Zellen von Th2 hin zu Th1 verändert. Es wird auch häufig beobachtet, dass sich der Isotyp der Insektengift-spezifischen AK von IgE zu IgG4 verändert. Eine weitere Hypothese ist, dass das Immunsystem durch die immer größeren Mengen an zugeführtem Insektengift während der Therapie anergisiert wird, was bedeutet, dass gegen dieses Antigen keine Immunantwort gestartet wird.

Um diese Hypothesen zu testen wurde von mir und zwei weiteren Doktoranden bzw. Diplomanden der Firma Miltenyi Biotec ein Projekt geplant, das drei wichtige Komponenten des Immunsystems während einer Hyposensibilisierung mit Bienen- bzw. Wespengift analysieren sollte. Ziel war es, zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Therapie Allergen-spezifische CD138⁺ PC, B-Zellen und T-Zellen nachzuweisen und zu analysieren. Als Allergen sollte in allen Fällen PLA2 für Bienengiftallergiker und PLA1b für Wespengiftallergiker benutzt werden.

Verschiedene Probleme, angefangen von der Etablierung aller nötigen Methoden bis hin zu Problemen mit Blutspendern, führten jedoch dazu, dass das T-Zell Projekt mehr oder weniger erfolglos abgebrochen wurde. Bei den beiden verbleibenden Projekten ergaben sich nur für eine Patientin ein kompletter Therapieverlauf und für einige andere Patienten Teilverläufe bzw. Einzelmesspunkte.

Ein limitierender Faktor bei der Analyse PLA-spezifischer PC (PLA2 oder PLA1b spezifisch) ist die geringe Zellzahl, die sich aus 40 ml Spenderblut isolieren lässt.

Aufgrund der relativ komplexen Färbung war es nötig, für jede gewünschte Isotyp-Färbung eine eigene Probe zu färben. Da aber nur eine begrenzte Zahl an Zellen zur Verfügung stand, entschlossen wir uns zu Beginn nur IgE und IgG zu färben. Später, als sich zeigte, dass man doch mehr Zellen als erwartet isolieren konnte, wurde zusätzlich mit IgG4 gefärbt.

Die Färbungen sahen im Einzelnen so aus:

Probe 1:

intrazellulär IgE.FITC

CD138.PE

PLA.Biotin/SA.APC

Probe 2:

intrazellulär IgG.FITC

CD138.PE

PLA.Biotin/SA.APC

Probe 3:

intrazellulär IgG4.FITC

CD138.PE

PLA.Biotin/SA.APC

Die Färbung der Zellen erfolgte wieder auf der zweiten Anreicherungssäule und für jede Färbung musste eine eigene Säule benutzt werden. In der folgenden Abbildung ist die Analyse der PC einer Bienengiftallergikerin zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

Abb. 18 a
Tag 0

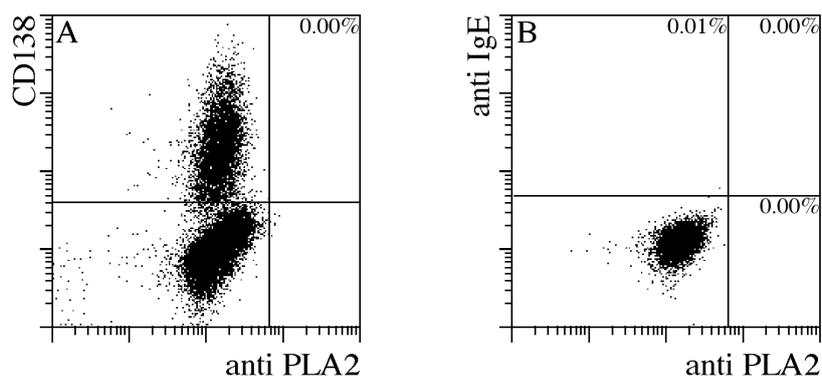


Abb. 18 b
Tag 3

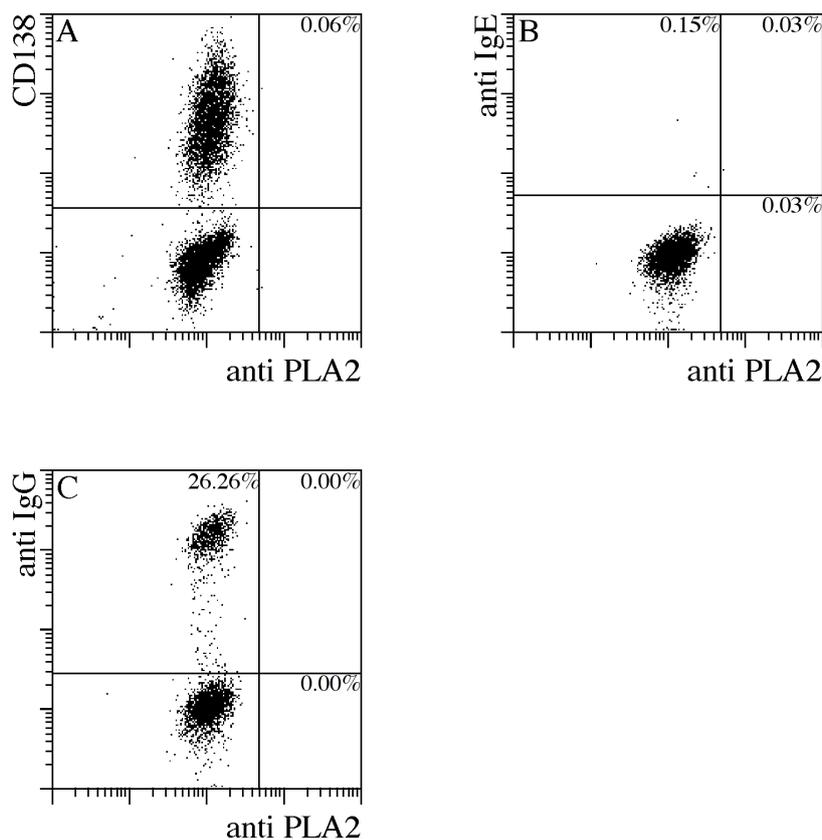


Abb. 18 c
Tag 7

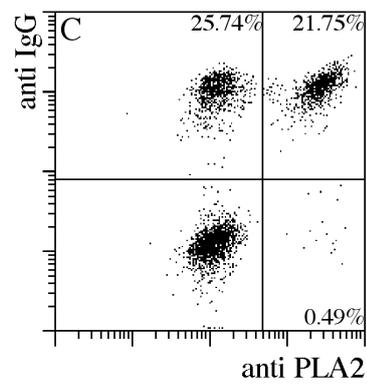
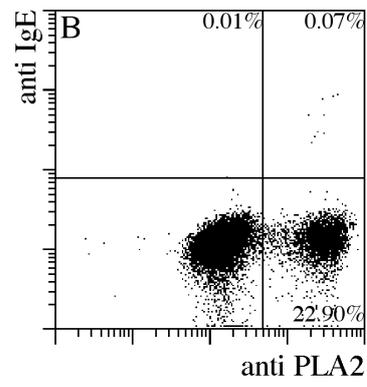
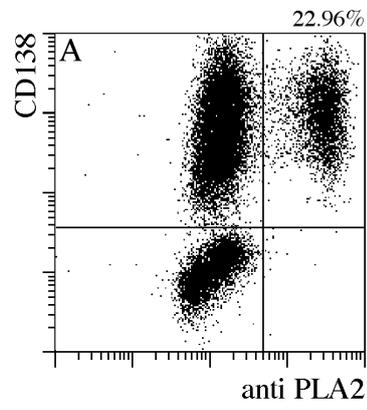


Abb. 18 d
Tag 10

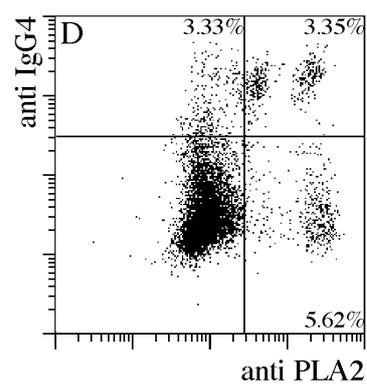
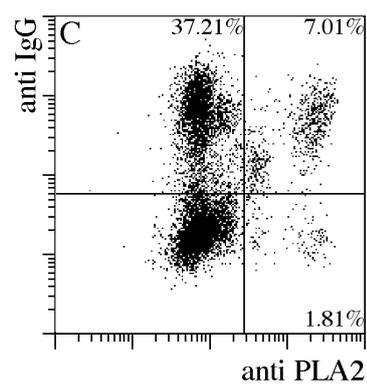
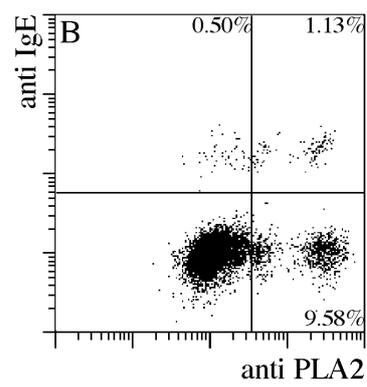
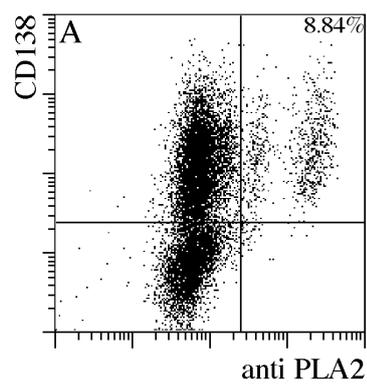


Abb. 18 e
Tag 30

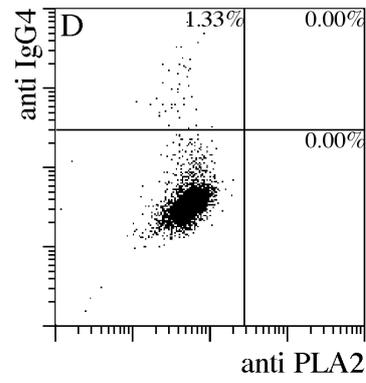
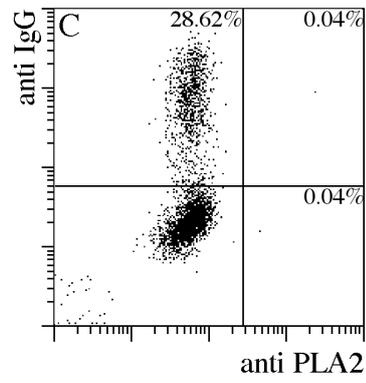
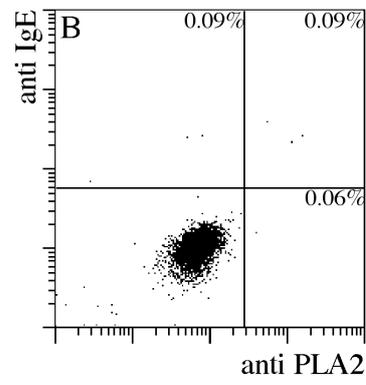
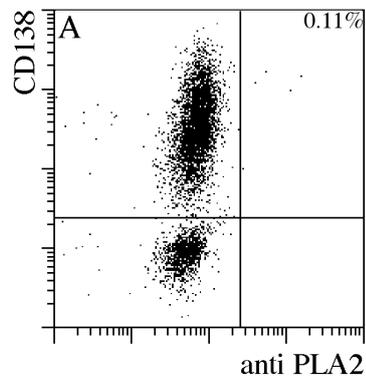


Abb. 18 f
Tag 65

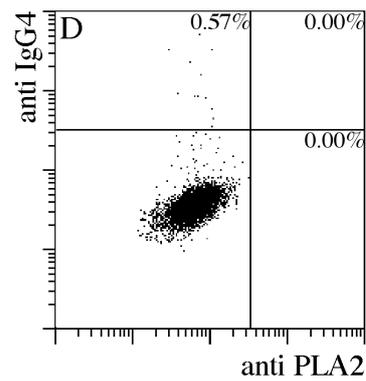
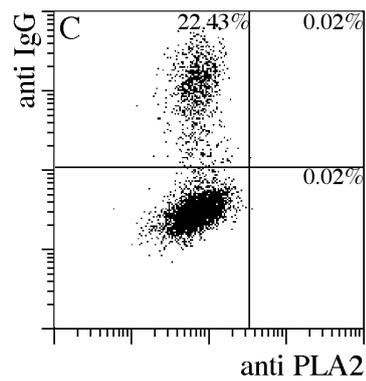
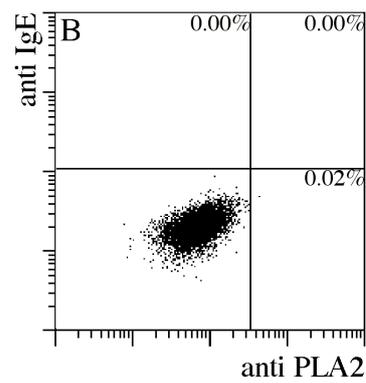
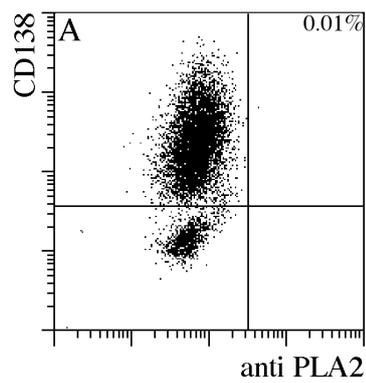


Abb. 18 g
Tag 203

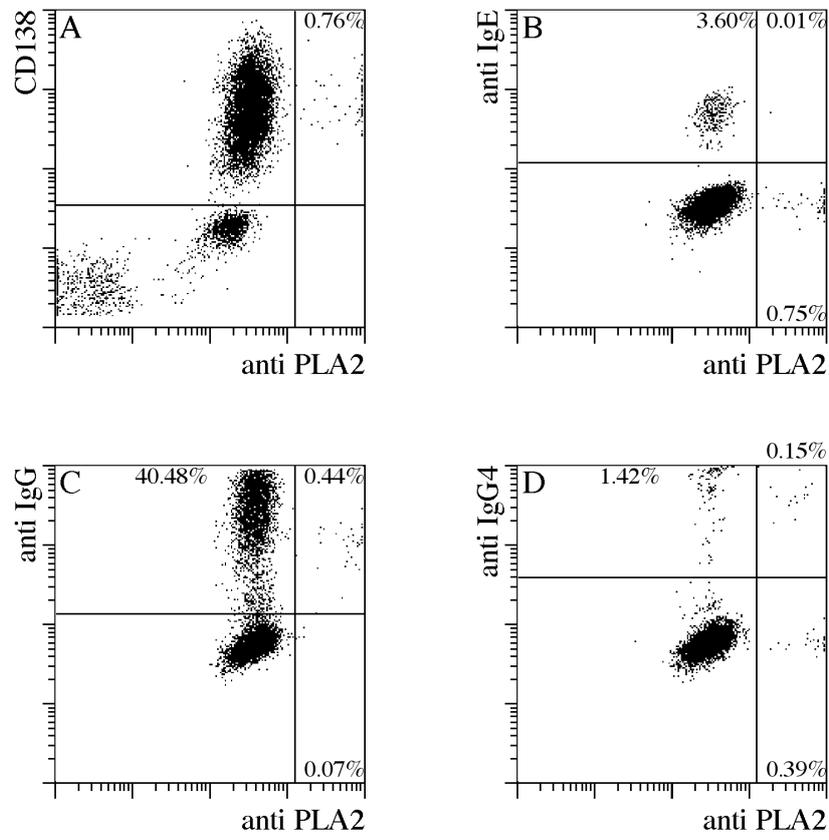


Abb. 18 h
Tag 175

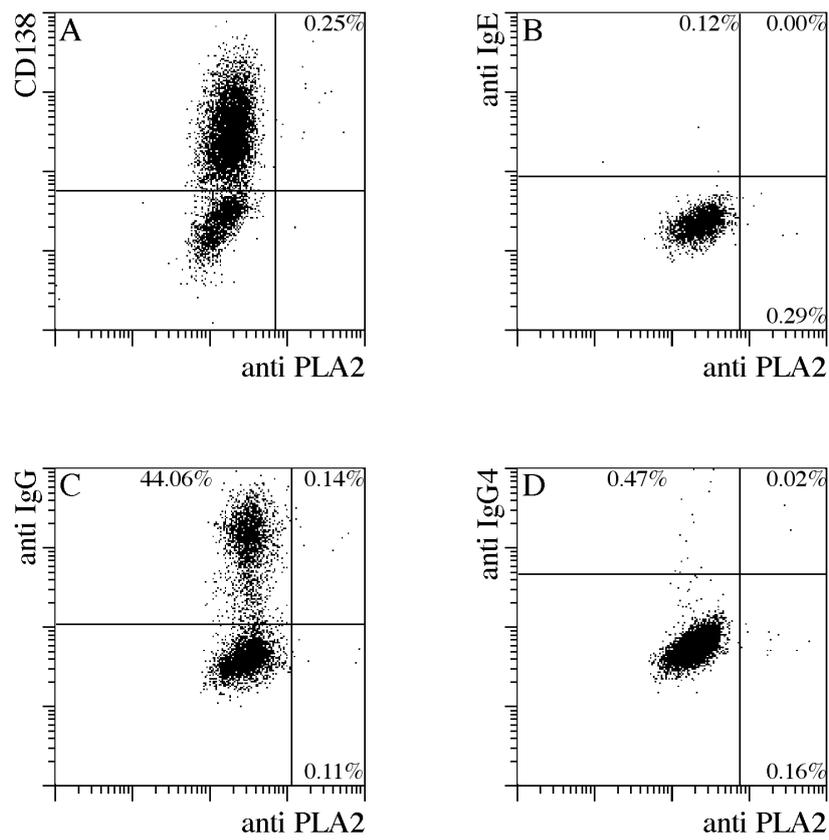


Abb. 18 Detektion PLA2-spezifischer CD138⁺ PC bei einer Bienengiftallergikerin im Verlauf der Hyposensibilisierung.

Zunächst wurden CD138⁺ PC aus dem peripheren Blut einer Bienengiftallergikerin isoliert. Die isolierten Zellen wurden nach der ersten Anreicherungssäule zunächst fixiert und anschließend auf der Oberfläche gegen CD138 gefärbt. Danach wurden die Zellen permeabilisiert und intrazellulär gegen PLA2 und entweder IgE, IgG oder IgG4 gefärbt. In (A) ist jeweils die PLA2 Färbung (X-Achse) gegen die CD138 Färbung (Y-Achse) aufgetragen. In diesen Darstellungen sind nur Lymphozyten dargestellt und der angegebene Prozentwert zeigt die Zahl PLA2⁺ Zellen unter CD138⁺ PC. In den Darstellungen (B), (C) und (D) sind nur CD138⁺ PC dargestellt und die Prozentwerte stellen die im jeweiligen Quadranten tatsächlich vorhandenen Werte dar. Es ist jeweils die Färbung von PLA2 (X-Achse) gegen IgE (B), IgG (C) oder IgG4 (D) (Y-Achse) dargestellt.

Tag 0 ist der Tag der ersten Injektion zum Zeitpunkt vor der Injektion. Zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 18 a) sind in der Patientin weder IgE⁺ noch PLA2-spezifische PC zu sehen. 3 Tage nach Beginn der Therapie (Abbildung 18 b) zeigt sich noch ein ähnliches Bild wie vor der Therapie. Lediglich einige wenige IgE⁺ PC sind zu entdecken, diese sind jedoch nicht PLA2-spezifisch. An Tag 7 (Abbildung 18 c) ändert sich das Bild der PC im Blut schlagartig. 23,0% der CD138⁺ PC besitzen eine Spezifität für PLA2 und auch die Zahl der IgE⁺ PC nimmt leicht zu. Es fällt auf, dass alle IgE⁺ PC spezifisch für PLA2 sind. Der Großteil der PLA2 spezifischen PC produziert jedoch IgG. 3 Tage später, an Tag 10 (Abbildung 18 d), geht die Zahl der PLA2-spezifischen PC bereits leicht auf 10,7% zurück. Interessant ist jedoch, dass die Zahl der IgE⁺ PC von 0,1% and Tag 7 auf 1,6% stark zunimmt. Ein Großteil dieser IgE sezernierenden PC besitzt eine Spezifität für PLA2. Ähnliches gilt für IgG4⁺ PC. Weiterhin fällt auf, dass es zwei Populationen von PLA2⁺ PC gibt, von denen die eine PLA2 nur relativ schwach exprimiert. Sie unterscheiden sich in der Expression der verschiedenen Ig Isotypen. Im Gegensatz zu den hellen PLA2-spezifischen PC exprimieren die schwach positiven Zellen fast alle IgG4 und die IgG Expression letzterer Population ist auch schwächer. Allerdings scheint es bezüglich der IgE Expression keinen Unterschied zu geben. Der Grund für das Auftreten dieser zwei unterschiedlichen Populationen ist jedoch unbekannt und im weiteren Verlauf der Therapie traten sie auch nicht mehr, zumindest nicht so deutlich, auf. 30 Tage nach Beginn der Therapie (Abbildung 18 e) sind im Blut so gut wie keine IgE⁺ oder PLA2⁺ PC mehr zu finden. Zu diesem Zeitpunkt sind 7 Tage seit der letzten Bienengiftinjektion vergangen und alle während der Restimulation gebildeten PLA2-spezifischen PC sind aus dem Blut verschwunden. An Tag 65 (Abbildung 18 f), 4 Wochen nach der letzten Injektion, sind schließlich gar keine IgE⁺ oder PLA2⁺ PC mehr im Blut detektierbar. Interessant ist nun die Frage, wie das Bild zu einem so späten Zeitpunkt aussieht, wenn man wenige Tage nach der Insektengiftinjektion Blut entnimmt. Werden immer noch PLA2-spezifische PC

im Blut vorkommen oder werden unter Umständen überhaupt keine neuen PC mehr gebildet, da das Immunsystem möglicherweise tolerant gegen das Bienengift geworden ist? Um diese Frage zu untersuchen, wurde der Patientin an Tag 175 (Abbildung 18 h), 7 Tage nach der Insektengiftinjektion, Blut entnommen und es zeigten sich nur sehr wenige PLA2⁺ PC, die aber alle IgE⁻ waren. Da dieser Zeitpunkt unter Umständen schon zu spät war, gab es an Tag 203 (Abbildung 18g) eine weitere Blutentnahme. Dieser Zeitpunkt lag 5 Tage nach der letzten Insektengiftinjektion und es lassen sich deutlich klare Populationen von sowohl IgE⁺ als auch PLA2⁺ PC erkennen, wobei es jedoch interessanterweise keine IgE⁺PLA2⁺ PC gibt. Obwohl etwa 4% aller PC IgE exprimieren, zeigt keine dieser Zellen eine Spezifität für PLA2, was für einen Erfolg der Therapie spricht. Alle PLA2-spezifischen PC exprimieren IgG, wobei nur ein Teil dieser Zellen IgG4 sezerniert. Insgesamt fällt jedoch auf, dass, obwohl eine distinkte PLA2-spezifische PC Population zu erkennen ist, diese mit 0,7% nur einen kleinen Teil aller PC ausmacht. Zu Beginn der Therapie lag dieser Anteil ja noch bei 23%. Auch dies deutet auf einen möglichen Erfolg der Therapie hin.

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse aus 6 Patienten ist in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Einzelmesspunkte, die aus den übrigen Patienten (Patient 2-Patient 6) gewonnen wurden, gut in das Bild passen, das sich aus dem Therapieverlauf der Patientin 1 ergibt (siehe Abb. 18).

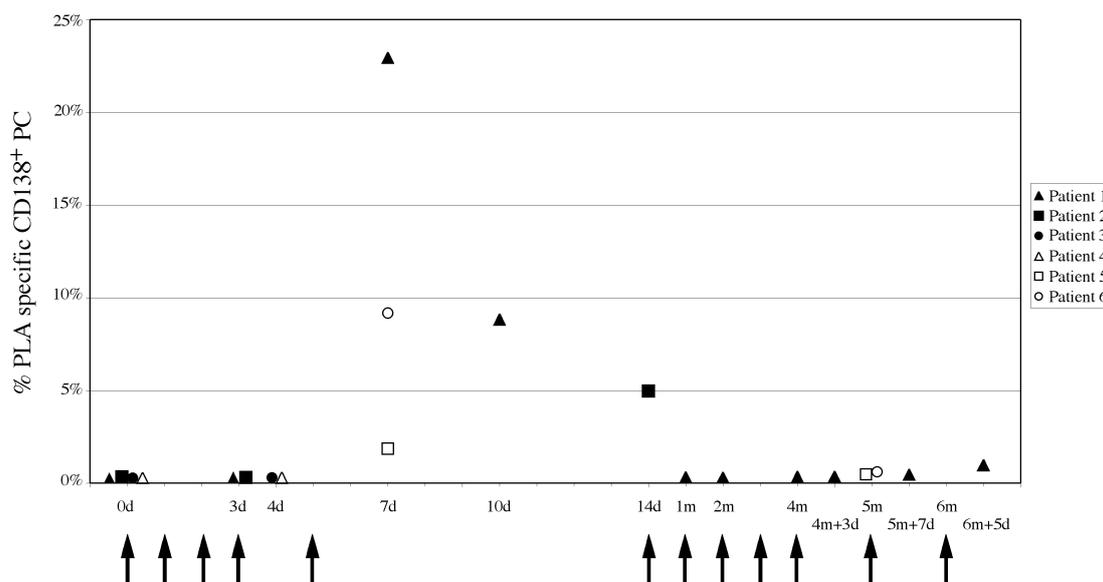


Abb. 19 Häufigkeit PLA spezifischer CD138⁺ PC zu verschiedenen Zeitpunkten einer Immuntherapie mit Insektengift.

Die Häufigkeit PLA-spezifischer CD138⁺ PC wurde in Bienengift- und Wespengiftallergikern zu verschiedenen Zeitpunkten der Hyposensibilisierung mit Insektengift bestimmt. Dies geschah durch eine intrazelluläre PLA Färbung CD138 angereicherter PC. Die Werte auf der Y-Achse sind die prozentualen Anteile PLA-spezifischer

Zellen unter CD138⁺ PC, während auf der X-Achse die verschiedenen Zeitpunkte der Immuntherapie dargestellt sind. Die Pfeile geben jeweils die Zeitpunkte der Insektengiftinjektion an.

4. Diskussion

4.1. Isolation CD138⁺ PC aus dem peripheren Blut

Obwohl PC eine wichtige Rolle in den verschiedensten Immunantworten spielen, bleiben sie in vielen Fragen unerforscht. Es gibt vergleichsweise wenige Publikationen, die sich mit der Detektion und Charakterisierung von PC, vor allem im peripheren Blut, beschäftigen. Ausnahmen sind Erkrankungen wie das Maligne Myelom, bei denen eine große Zahl maligner PC im Blut der Patienten auftritt. Dies zeigt auch deutlich, dass der wichtigste Grund für dieses Defizit die sehr geringe Häufigkeit von PC im peripheren Blut ist. Diese ist zwar in Geweben wie Tonsillen und Knochenmark etwa um ein 10-faches erhöht, jedoch sind diese Gewebe für Forschungszwecke viel schwerer erhältlich.

Ein weiterer Grund liegt in der Tatsache, dass lange Zeit kein Oberflächenmarker bekannt war, der spezifisch auf PC exprimiert wird. Eine sehr hohe CD38 Expression galt über Jahre hinweg als der Identifikationsmarker für PC (67, 68). In jüngster Zeit wurde zudem bekannt, dass PC CD27 hochregulieren und somit anhand der sehr hohen CD27 Expression im Blut identifizierbar sind (72). Beide Moleküle haben jedoch den Nachteil, dass sie auch auf einer Großzahl anderer Zellen exprimiert werden. So kommt CD27 auf Gedächtnis B-Zellen und T-Zellen vor (73-76), während CD38 auf aktivierten T-Zellen, naiven B-Zellen und Basophilen exprimiert wird (67, 77, 78). Ähnliches gilt für die Marker PCA-1 (79) und Tp44 (80), die ebenfalls auf PC hochreguliert werden. PCA-1 wird jedoch zusätzlich auf Granulozyten und Monozyten (79) und Tp44 auf einem Großteil aktivierter T-Zellen (80) exprimiert. Dies hat zur Folge, dass eine einfache Anreicherung mittels dieser Marker nicht ohne weiteres möglich ist. Sie ist jedoch aufgrund der geringen PC Häufigkeiten für die detaillierte Charakterisierung dieser Zellen unabdingbar. Ein weiterer Marker, der auf PC exprimiert wird, ist Wue-1 (81). Dieses Molekül kommt auf terminal differenzierten PC im Knochenmark von Normalspendern und Patienten mit Multiplem Myelom vor (81). Leider gibt es jedoch keine Daten zur Expression von Wue-1 im Blut normaler Personen, jedoch deuten Gegenfärbungen, die in unserem Labor auf CD138 sortierten PC aus dem peripheren Blut von Normalspendern durchgeführt wurden, darauf hin, dass Wue-1 auf PC im Blut noch nicht exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). CD138 hingegen wird zu Beginn der PC Entwicklung hochreguliert und kommt lediglich auf PC und nicht auf zirkulierenden B-Zellen oder anderen Zellen im peripheren Blut vor (21, 30). Lediglich auf Epithelzellen wird es noch exprimiert (30). Aus

diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Promotion untersucht, ob sich CD138 für die direkte Anreicherung von PC aus dem peripheren Blut eignet.

4.1.1. PC im Blut sind nur eine von vielen verschiedenen PC Populationen

Im Gegensatz zu den ursprünglichen Annahmen, dass es sich bei PC um eine homogene Zellpopulation mit einer Lebenserwartung von wenigen Tagen bis maximal 2 Wochen handelt, zeigten Untersuchungen in den letzten Jahren, dass es verschiedene PC Populationen in den unterschiedlichsten Geweben gibt. So ist die Lebenszeit einer PC keineswegs auf 2 Wochen beschränkt, sondern kann durchaus mehrere Jahre betragen (10-12). Weiterhin zeigte sich, dass PC neben dem Knochenmark, von jeher als der Ort der Antikörperproduktion durch PC angesehen, auch im Blut, der Haut, in Tonsillen, lokalen Lymphknoten und den Schleimhäuten vorkommen und dort AK sezernieren (82-84). Eine wichtige Erkenntnis, die sich aus diesen Untersuchungen ergab, ist die, dass es sich bei PC keinesfalls um eine homogene Zellpopulation handelt. Sie unterscheiden sich vielmehr unter anderem in der Expression der Zielfindungs-Rezeptoren. Da je nach Immunantwort der Ort der B-Zell Aktivierung bzw. der PC Bildung ein anderer ist als der Ort der AK Sekretion durch die PC, ist es nötig, dass die neu gebildeten PC ihren Bestimmungsort zielsicher erreichen. Dies wird durch die spezifische Expression der Zielfindungs-Rezeptoren auf den PC erreicht. Auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort wandern die frisch gebildeten PC durch das Blut.

Aus diesen neuen Erkenntnissen ergeben sich einige wichtige Schlussfolgerungen. Zum einen nimmt, durch ihre potentielle Langlebigkeit, die Rolle von PC in Immunantworten stark zu. Dies gilt insbesondere für Immunantworten, in denen sie pathogen wirken. Zum anderen gewinnt das Blut als Quelle für PC enorm an Bedeutung, da hier zumindest zeitweise ein Großteil der PC nachweisbar ist.

4.1.2. Bei CD138⁺ PC im Blut handelt es sich um frühe PC

Wie sich in dieser Arbeit zeigte, lassen sich über den Marker CD138 schnell und direkt PC aus dem Blut magnetisch anreichern (Abschnitt 3.1.1). Der hierbei erreichten Reinheit von über 80% ermöglichten die detaillierte Analyse der PC auch in Normalspendern oder Patienten, in denen keine stark erhöhten PC Häufigkeiten vorhanden sind. Eine zusätzlich entwickelte, neuartige Färbemethode ermöglichte außerdem eine detaillierte phänotypische Charakterisierung der angereicherten PC selbst bei sehr geringen Zellzahlen. Dazu wurden die Zellen gefärbt, während sie sich auf der Anreicherungssäule befanden, was die Zellverluste durch Waschen drastisch verringerte.

Gegenfärbungen auf PC, die aus dem Blut von Normalspendern mittels CD138 AK angereichert wurden, zeigten, dass die isolierten PC fast alle CD38⁺⁺, CD19^{dim}, CD20⁻, CD21⁻, CD22⁻, CD27⁺⁺, CD28⁻, CD40⁺, CD44⁺, CD45⁺⁺, VLA-4⁺ und VLA-5⁻ waren (Abb. 2). Vergleicht man diese Daten mit denen anderer Veröffentlichungen (20, 85), so scheint es sich bei den PC im Blut um unreife, frisch gebildete PC zu handeln, die sich von reifen PC aus dem Knochenmark und den Tonsillen (86) unterscheiden. So wurde beschrieben, dass CD45 auf PC im Knochenmark (67) und bei Patienten mit Multiplem Myelom (87) herunterreguliert wird. Außerdem exprimieren CD138⁺ PC im Blut noch schwach Ig auf ihrer Zelloberfläche.

Bereits 1993 zeigten Kawano et al. (88), dass sich PC im Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom in reife und unreife PC aufteilen lassen. Diese Aufteilung basierte auf der Expression des Markers VLA-5 und es zeigte sich, dass sich die Populationen hauptsächlich in der Morphologie, der Proliferationsaktivität, der Empfänglichkeit IL-6 gegenüber und der Menge von sezerniertem Ig unterscheiden. Jedoch unterscheiden sich die PC aus Patienten mit Multiplem Myelom von denen aus Normalspendern, da erstere CD19⁻ sind (87) (eigene unveröffentlichte Daten) und meist CD28 exprimieren (21). Später wurden auch im Blut von Normalspendern unreife PC nachgewiesen (20, 85). Es zeigte sich, dass sie den Phänotyp CD38⁺⁺, CD19⁺, CD20⁻, CD21⁺, VLA-4⁺, VLA-5⁻ besitzen. Jago et al. (22, 23) hingegen machten sich zu Nutze, dass in Patienten mit Reaktivem Plasmazytom große Mengen gutartiger, polyklonaler PC im Blut auftreten. Sie konnten zeigen, dass es sich größtenteils um PC Vorläufer handelt: CD138⁻, CD38⁺⁺, CD19⁺, CD20⁻, CD21⁻, CD45⁺⁺, VLA-5⁻ Plasmablasten und CD138⁺, CD38⁺⁺, CD19⁺, CD20⁻, CD21⁻, CD45⁺⁺, VLA-5⁻ frühe PC. In der Plasmazellentwicklung liegen die Plasmablasten noch vor den frühen PC. Plasmablasten konnten von uns durch eine direkte PC Anreicherung natürlich nicht nachgewiesen werden, da sie CD138 noch nicht exprimieren, aber hier bietet die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie ein geeignetes Werkzeug zum Nachweis dieser Zellen in Blut von Normalspendern.

4.1.3. CD138⁺ PC unterscheiden sich in der Expression ihrer Zielfindungsrezeptoren

Wie die Charakterisierung der isolierten Zellen weiterhin zeigte, unterscheiden sich CD138⁺ PC nicht nur in der Expression verschiedener Ig Subklassen, sondern auch in der Expression von Zielfindungs-Rezeptoren wie Integrin $\alpha 7$ oder CLA. Ganz grob vereinfacht kann man sagen, dass es für die PC die Zielgewebe Knochenmark, Haut und Schleimhäute gibt. Von CLA ist schon seit längerem bekannt, dass es ein Zielfindungs-

Rezeptor ist, der Lymphozyten in die Haut führt (69, 70). Demgegenüber wird das Einwandern in die Schleimhäute zu einem großen Teil durch die Expression von $\alpha 4\beta 7$ gesteuert (89). $\alpha 4\beta 7$ setzt sich zusammen aus dem Integrin $\alpha 4$ (VLA-4 /CD49e) und dem Integrin $\beta 7$ (90). Bislang unbekannt ist der Rezeptor, der Zellen ins Knochenmark finden lässt. CD138 spielt zwar eine wichtige Rolle für die Adhäsion an Stromazellen des Knochenmarks (33, 34), jedoch deutet seine weite Verbreitung, vor allem auch auf IgA⁺ PC, darauf hin, dass es zwar für die Zielfindung ins Knochenmark nötig scheint, aber nicht alle Zellen, die CD138 exprimieren zwingend ins Knochenmark wandern müssen.

Die Tatsache, dass der Großteil des IgG im Knochenmark sezerniert wird und IgA aufgrund seiner besonderen Eigenschaften vor allem in den Schleimhäuten produziert wird, legt die falsche, weil simplifizierte Vermutung nahe, dass beispielsweise die Expression von IgA mit $\alpha 4\beta 7$ korreliert. Daten von Kantele et al. (35) deuten jedoch darauf hin, dass weniger IgA⁺ PC $\beta 7$ exprimieren als IgG⁺ und IgM⁺ PC. Da insbesondere IgM⁺ PC $\beta 7$ exprimieren, wird gemutmaßt, dass die PC nach dem Erreichen des Zielgewebes einen Klassenwechsel von IgM zu IgA durchführen (35). Auch in dieser Arbeit konnte durch die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie gezeigt werden, dass sich die Integrin $\beta 7$ Expression nicht ausschließlich auf IgA sezernierende PC beschränkt. Ein Drittel aller IgG⁺ PC exprimiert ebenfalls $\beta 7$ (Daten nicht gezeigt).

Aufbauend auf der Veröffentlichung von Kantele et al. (35), in der auch gezeigt wurde, dass etwa nur 50% aller ASC CD138 exprimieren und 50% der ASC CLA⁺ sind, wurde zu Beginn dieser Arbeit die Vermutung aufgestellt, dass CD138 und CLA auf PC differentiell exprimiert werden. Gegenfärbungen auf CD138 angereicherten PC aus Normalspenderblut zeigte, dass die angereicherten PC komplett CLA⁻ waren (Abb. 2, R). Dies deutet stark darauf hin, dass es im Blut CLA⁺CD138⁻ PC gibt, die höchstwahrscheinlich die Haut als Zielgewebe haben, während CLA⁻CD138⁺ PC andere Gewebe wie beispielsweise das Knochenmark zum Ziel haben. Dies wird dadurch unterstützt, dass bislang keine Veröffentlichung bekannt ist, in der CD138⁺ PC in der Haut nachgewiesen werden konnten.

Zusammengefasst legen die Daten den Schluss nahe, dass Moleküle wie $\alpha 4\beta 7$, CLA, CD62L und $\alpha e\beta 7$ (CD103) nur eine von mehreren Komponenten darstellen, die für das Erreichen der Zielgewebe notwendig sind. Dies wird durch Veröffentlichungen von Wehrli et al. (91) und Hargreaves et al. (92) unterstützt, die in Mäusen zeigen konnten, dass Chemokine und die Expression bestimmter Chemokin-Rezeptoren auf PC eine wichtige Rolle für das Migrationsverhalten von PC spielen. Außerdem scheint das Zielgewebe der

PC nicht so sehr durch den Isotyp der produzierten AK, als vielmehr durch Art und Ort der Immunisierung bestimmt (24, 25, 93). Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden, insbesondere die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie, stellen wertvolle Werkzeuge dar, welche eine weitreichendere Untersuchung dieser Fragen auch im menschlichen Blut ermöglichen.

4.2. Etablierung der zellulären Affinitätsmatrix Technologie

4.2.1. Es gibt mindestens zwei Populationen CD138⁺ PC im Blut

Die Tatsache, dass zumindest zwei Populationen von CD138⁺ PC im Blut vorkommen (22, 35), unterstreicht die Notwendigkeit einer Methode zum Nachweis aller Ig sezernierenden Zellen im Blut. Diese Methode sollte außerdem eine einfache phänotypische Charakterisierung und nach Möglichkeit auch eine Isolation der nachgewiesenen Zellen zulassen. Mit der ELIPSOT Methode kann man zwar Ig sezernierende Zellen nachweisen, jedoch ist eine phänotypische Analyse der Zellen nur unzureichend und eine Sortierung sowie die weitere Verwendung nicht möglich. Die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie indes ermöglicht beides, indem sezerniertes Ig direkt auf der Zelloberfläche der produzierenden Zelle durch eine spezifische Fangmatrix eingefangen wird. Dort kann es, zusammen mit anderen Markern fluoreszent markiert und zytometrisch nachgewiesen werden, was eine Analyse spezifischer PC auf Einzelzellniveau ermöglicht. Selbst eine anschließende magnetische Sortierung der sezernierenden Zellen kommt in Frage.

4.2.2. Detektion IgG, IgA und IgE sezernierender Zellen im Blut

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie für IgE, IgA und mit Einschränkungen auch für IgG sezernierende Zellen zu etablieren (Abb. 12, 17, 13). Die Einschränkungen für IgG ergeben sich aus der Tatsache, dass zum einen noch eine kleine hintergrundproduzierende Zellpopulation vorhanden ist (Abb. 13, C), bei der es sich möglicherweise um natürliche Killerzellen handelt, da auch diese Fc γ Rezeptoren besitzen. Hier bestünde die Möglichkeit, durch gezielte Gegenfärbungen herauszufinden, um welche Zellen es sich genau handelt und diese dann mit einem geeigneten Marker zusammen mit den T-Zellen, Monozyten und Basophilen zu depletieren. Zum anderen werden im Ansatz mit Fangmatrix alle Zellen mehr oder weniger unspezifisch durch das Detektionsreagenz angefärbt (Abb. 13, D). Dadurch wird eine eindeutige Diskriminierung IgG sezernierender Zellen nur schwer möglich. Normalerweise tritt diese Art der

unspezifischen Färbung nur auf, wenn man zu viele sezernierende Zellen in einem zu geringen Volumen sezernieren lässt. In diesem Fall würden aufgrund der Enge nicht-sezernierende Zellen sezernierte Moleküle benachbarter Zellen einfangen, was zu einer unerwünschten Hintergrundfärbung führt. Was gegen diesen Mechanismus spricht, ist, dass beim IgG Sekretionsassay die gleiche Zelldichte wie im IgA Sekretionsassay eingesetzt wurde. Obwohl es mehr IgA als IgG sezernierende Zellen gibt, tritt dieses Phänomen für IgA nicht auf. Da außerdem die Fangmatrix die gleiche ist wie im IgA Sekretionsassay, bliebe als letzte Möglichkeit zur Lösung des Problems die erneute genaue Titration der Detektionsreagenzien. Durch eine geringere Konzentrationen dieser Reagenzien ließe sich womöglich eine Hintergrundfärbung vermeiden.

Dennoch ist der IgG Sekretionsassay schon jetzt für bestimmte Fragen anwendbar, wenn man voraussetzt, dass CD38 tatsächlich alle Plasmazellen im Blut anfärbt und man CD38 als zusätzlichen Diskriminationsmarker einsetzt. Die im Rahmen meiner Arbeit mit IgA und IgE durchgeführten Sekretionsassays zeigen, dass dies der Fall zu sein scheint, da alle IgA bzw. IgE sezernierenden PC stark CD38 exprimieren (Abb. 12, D und Abb. 17, D). Färbt man die $IgG^{++}CD38^{++}$ Plasmazellen zusätzlich gegen CD138, so zeigte sich, dass zwischen 50 und 80% aller IgG^{+} PC CD138 koexprimieren (Abb. 13, F). Dies stimmt mit meinen Daten aus den IgE Sekretionsassays überein (Abb. 17, C), unterscheidet sich jedoch deutlich von den Prozentsätzen von 25-50%, die sich aus den IgA Sekretionsassays ergeben (Abb. 12, F). Zieht man diese Zahlen in Betracht und verrechnet diese mit der Ig Klassenverteilung unter $CD138^{+}$ PC (60% IgA, 30% IgG und 10% IgM), so kann man grob überschlagen sagen, dass im Blut etwa 40% aller PC CD138 exprimieren. Diese Berechnung setzt jedoch voraus, dass die CD138 Verteilung unter IgM sezernierenden Zellen ähnlich ist wie die unter IgE und IgG sezernierende Zellen. Da jedoch noch kein IgM Sekretionsassay entwickelt wurde und aus der Literatur diesbezüglich keine Daten bekannt sind, muss dies eine Vermutung bleiben. Der überschlagene Prozentsatz von 40 % $CD138^{+}PC$ unter allen PC stimmt jedoch recht gut mit den 45-50% Prozent überein, die aus den verschiedenen Veröffentlichungen bekannt sind (22, 35).

Weiterhin kann man aus diesen Zahlen schließen, dass für IgG und IgE die direkte Anreicherung $CD138$ exprimierender PC eine hinreichende Methode scheint, um diese Zellen genauer zu untersuchen und zu charakterisieren. Im Gegensatz dazu gibt es sehr viele IgA produzierende PC, die kein $CD138$ exprimieren. Hier bietet sich der IgA Sekretionsassay geradezu an. Mit ihm hat man eine Methode zur Hand, welche die Detektion und genaue Charakterisierung IgA sezernierender Zellen ermöglicht. Durch die fast vollständige Depletion Hintergrund produzierender Zellen wird außerdem eine

einfache magnetische Anreicherung dieser Zellen mit anti-Dig.Mikropartikeln möglich. Gleiches gilt natürlich auch für IgE. Dies ermöglicht es, die Zellen für weitere Untersuchungen und Assays zu verwenden. Sehr viel versprechend ist in diesem Zusammenhang auch die Aussicht, lebende Antigen-spezifische PC aus Patienten zu isolieren. Durch das fast vollständige Verschwinden des Hintergrundes ergibt sich für die weitere Entwicklung der zellulären Affinitätsmatrix Technologie die Möglichkeit, doch das AK-AK System einsetzen zu können, da man nicht mehr diese großen Helligkeiten benötigt. Somit könnte man auf die aufwendige Biotinylierung der Zellen verzichten.

4.2.3. Diskrepanz des Anteils IgA⁺ Zellen unter PC und Gedächtnis B-Zellen

Eine weitere interessante Feststellung, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurde, ist die Verteilung der Ig Klassen bei den PC. Etwa 60% aller CD138⁺PC und möglicherweise sogar 80% aller PC im Blut produzieren IgA. Dies steht im drastischen Gegensatz zur Klassenverteilung in Gedächtnis B-Zellen, von denen nur etwa 6% IgA exprimieren (94). Dies deutet darauf hin, dass Gedächtnis B-Zellen und PC unabhängig voneinander reguliert werden. Dies könnte beispielsweise auf der Basis von Proliferation und Homeostase oder basierend auf unterschiedlichem Migrationsverhalten der Zellen geschehen. Insbesondere für IgA sezernierende PC ist der Ort der PC Induktion und das letztendliche Ziel der PC oft weit voneinander entfernt (95, 96), was die PC zur Wanderungen durch das Blut nötigt und dementsprechend zu einer hohen Zahl IgA⁺ PC im Blut führt. Die unterschiedliche Regulation von Gedächtnis B-Zellen und PC wird auch dann plausibel, wenn man die Korrelationsdaten dieser Arbeit mit denen aus der Publikation aus Leyendeckers et al. (97) vergleicht. Während es für Gedächtnis B-Zellen keinerlei Korrelation zwischen dem Antigen-spezifischen Serumtiter und der Zahl Antigen-spezifischer Gedächtnis B-Zellen gibt, ist diese Korrelation auf Plasmazellebene sehr deutlich vorhanden.

4.3. Detektion IgE⁺CD138⁺ PC

Aus dem peripheren Blut von Normal Spendern, Atopikern und einem Patienten mit Hyper IgE Syndrom wurden CD138⁺ PC isoliert und durch intrazelluläre Färbung auf die Expression von IgE hin untersucht (Abb. 14). Erste Versuche anderer Arbeitsgruppen, IgE⁺ B-Zellen mittels intrazellulärer Immunfluoreszenz in angereicherten und EBV transformierten B-Zellen nachzuweisen, waren aufgrund der geringen Häufigkeit der Zellen und komplizierter Protokolle beschränkt (28, 29). Später konnten mit Hilfe von

ELISPOT Assays IgE sezernierende B-Zellen in allergischen Erkrankungen mit hohem IgE Serumentiter wie HIE, atopischer Dermatitis u.a. aber nur sehr selten in Normalspendern nachgewiesen werden (37, 38, 43, 44, 46, 47). In dieser Arbeit konnten mindestens fünf IgE⁺CD138⁺ PC im peripheren Blut von 1/1 Hyper IgE Patienten, 22/22 Atopikern und 19/24 Normalspendern detektiert werden (Abb. 16). Dies zeigt die hohe Sensitivität dieser Methode, die deutlich höher als die der bisherigen Methoden ist.

4.3.1. Die Zahl IgE⁺CD138⁺ PC korreliert mit dem IgE Serumentiter

Obwohl auch in den meisten Normalspendern IgE sezernierende CD138⁺ PC nachgewiesen werden konnten, zeigten sich enorme Unterschiede bei der Häufigkeit IgE⁺CD138⁺ PC in Normalspendern verglichen mit den unterschiedlichen Patientengruppen. Insbesondere in Atopikern mit stark erhöhtem IgE Serumentiter konnten 100-fach höhere Häufigkeiten als in Normalspendern festgestellt werden. Die Daten zeigen, dass die Häufigkeit der IgE sezernierenden PC hochsignifikant ($r=0,8532$; $P<0,0001$) mit den gemessenen IgE Serumentitern korrelieren (Abb. 16). Dies stimmt mit Daten überein, die andere Arbeitsgruppen unter Benutzung von ELISPOT Assays bereits veröffentlicht haben (37, 38, 43, 44, 46, 47).

Die Frage jedoch, warum sich diese Korrelation überhaupt findet, wurde bislang nicht diskutiert.

PC im peripheren Blut sind sicherlich nicht die einzige Hauptquelle von Serum IgE. Abhängig vom Weg der Immunisierung wurden IgE sezernierende PC in den verschiedensten Geweben, wie der Lamina Propria der Nasenschleimhaut, den Tonsillen und den mesenterialen Lymphknoten gefunden (82-84). Viele Jahre lang wurde angenommen, dass PC kurzlebig seien und dass eine kontinuierliche Neubildung von PC für die Aufrechterhaltung der Ig Serumentiter nötig sei. In diesem Fall würde man eine Korrelation zwischen der Häufigkeit wahrscheinlich neu gebildeter PC im Blut und dem Serumentiter erwarten. Diese konstante Neubildung ist für viele Atopiker sehr gut vorstellbar. Dies könnte beispielsweise durch die wiederholte Präsentation von Antigenen, wie z.B. dem der Hausstaubmilbe, oder wiederholte bzw. fortlaufende Immunreaktionen mit einer starken Ausrichtung zur IgE Produktion in HIE Patienten erfolgen. Neueste Untersuchungen von Manz et al. und Slifka et al. haben jedoch gezeigt, dass IgG sezernierende PC in Mäusen auch langlebig sein können (10-12). In diesem Fall träte eine Korrelation zwischen der Häufigkeit im Blut gefundener PC und dem Serumentiter nur dann auf, wenn sich ein Teil der langlebigen PC in konstanter Rezirkulation zwischen den verschiedenen Geweben über das Blut befänden oder sie einfach aus den Geweben ins Blut

ausgeschwemmt würden Obwohl formell nicht bewiesen, deutet der Phänotyp der CD138⁺ PC aus dem peripheren Blut darauf hin, dass es sich bei diesen Zellen um frühe PC und nicht um aus anderen Geweben stammende reife PC handelt. Kürzlich wurde durch Selin et al. (98) für Gedächtnis T-Zellen gezeigt, dass potentiell langlebige Gedächtnis T-Zellen durch neu gebildete Gedächtnis T-Zellen ganz oder teilweise verdrängt werden können. Falls ein ähnlicher Homeostase-Mechanismus für PC existiert, so hinge die Lebensdauer einer PC, die theoretisch langlebig ist, auch davon ab, wie viele neu gebildete PC in ihr Gewebe einwandern. Aufgrund von Limitierungen im Platz- oder Wachstumsfaktorangebot könnten neu eingewanderte PC ältere PC verdrängen.

Es ist augenscheinlich, dass für eine schlüssige Beantwortung dieser Fragen zum einen die Möglichkeit zur Identifikation bzw. Unterscheidung kurzlebiger und langlebiger PC sowie zum anderen das Verständnis der Mechanismen, welche die Lebensdauer und Homeostase der PC bestimmen, nötig ist. Hier bieten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden, die direkte PC Anreicherung über CD138, die Färbung seltener Zellen auf der Anreicherungssäule und die zelluläre Affinitätsmatrix Technologie wertvolle Werkzeuge für die weitere Erforschung dieser Fragen.

4.4. CD138⁺ PC im Verlauf einer spezifischen Immuntherapie mit Insektengift

4.4.1. IgE und IgG4 AK im Verlauf der Immuntherapie

Trotz guter Erfolge, die man mit der spezifischen Immuntherapie erzielt (48, 49), ist noch unklar, welche immunologischen Veränderungen dem Erfolg zugrunde liegen. Der Grund dafür liegt teilweise auch darin, dass sich die verschiedenen Forschergruppen im Unklaren darüber sind, welche Faktoren den Ausbruch und den Verlauf einer allergischen Reaktion bestimmen. So ist zwar klar, dass Antigen-spezifisches IgE der entscheidende Auslöser der allergischen Reaktion ist, die Rolle Antigen-spezifischer IgG AK jedoch ist noch umstritten (99). Bei Antigen-spezifischem IgG handelt es sich hauptsächlich um die Subklassen IgG1 und IgG4. Untersuchungen an Bienenzüchter-Neulingen haben ergeben, dass in den ersten Monaten, und zwar ohne das Auslösen einer Allergie, Antigen-spezifisches IgG1 gebildet wird (100). In 50% aller Probanden traten zwar auch spezifische IgE AK auf, jedoch fielen diese bei dem Überschuss an spezifischen IgG AK nicht ins Gewicht und lösten keinerlei umfassende allergische Reaktion aus. Erst später, im zweiten

Jahr, wurde IgG4 die dominante Subklasse, und in professionellen Bienenzüchtern mit jahrelanger Erfahrung konnten zum Teil extrem hohe spezifische IgG4 Antikörpertiter nachgewiesen werden. Dieser Umschwung resultiert nicht aus einem direkten Klassenwechsel IgG1 produzierender B-Zellen zu IgG4, sondern entsteht vielmehr aus der Reifung vormals ruhender B-Zellen in IgG4 sezernierende PC (16).

Die zu Beginn vorherrschende Dominanz von spezifischem IgG1 gegenüber IgG4 lässt sich auch in Allergien feststellen. Ohne Immuntherapie, bzw. zu Beginn der spezifischen Immuntherapie ist neben spezifischem IgE IgG1 der vorherrschende Isotyp. Erst im Verlauf der Immuntherapie wird überwiegend IgG4 gebildet (16). Ausnahmen bilden hier Allergiker, die über Jahre hinweg chronisch mit dem Allergen in Kontakt kommen. Hier ist IgG4 die vorherrschende IgG Subklasse (99).

Die Beobachtung, dass alle bislang untersuchten IgE induzierenden Antigene auch IgG4 induzieren, legt die Vermutung nahe, dass IgE und IgG4 Immunantworten miteinander gekoppelt sind. Dies mag daran liegen, dass beide Isotypen IL-4 abhängig sind und eine Th2 Zelle für die Stimulation benötigen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass IgE und IgG4 von der gleichen elterlichen B-Zelle abstammen könnten, die sich nach dem Klassenwechsel in die Tochterzellen aufteilt (16, 101). Weiter wird vermutet, dass sich somit, induziert durch geringe Mengen an IL-4, eine nicht-atopische, IgG4 produzierende B-Zelle entwickeln könnte, während große Mengen an IL-4 atopische, IgE produzierende B-Zellen induzieren könnten (16). Bereits erwiesen ist, dass die erkannten Epitope von IgE und IgG4 AK relativ ähnlich, aber nicht identisch zueinander sind (102, 103).

4.4.2. Die Immuntherapie verändert verschiedene immunologische Faktoren

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, wurden verschiedene Modelle entwickelt, die den Erfolg der spezifischen Immuntherapie erklären sollen. Ein wichtiger Faktor ist sicherlich die Bildung blockierender AK. Doch die Immuntherapie wird sicherlich auch noch durch andere Faktoren, wie beispielsweise die T-Zell Aktivierung beeinflusst. So gibt es viele Veröffentlichungen, in denen gezeigt wird, dass der Erfolg der Immuntherapie davon abzuhängen scheint, dass sich das Zytokinprofil der Allergen-spezifischen T-Zellen während der Immuntherapie vereinfacht gesagt von Th2 zu Th1 verändert. Im Einzelnen sind die Ergebnisse nicht immer so eindeutig. So scheint zwar IL-4 und die T-Zellproliferation fast immer deutlich herunterreguliert und das IL-4:IFN- γ Verhältnis verringert sich, jedoch ergeben sich für die Produktion von IFN- γ und IL-10

unterschiedliche Ergebnisse. In einigen Veröffentlichungen (54, 58-61) wird IFN- γ hochreguliert, was für einen einfachen Wechsel des Zytokinprofils spricht. In anderen Publikationen werden sowohl IFN- γ als auch IL-4 herunterreguliert (50, 51), was möglicherweise für eine Anergisierung der betreffenden T-Zellen spricht. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn die IL-10 Produktion hochreguliert wird (52-55), da IL-10 eine inhibitorische Wirkung zugesprochen wird (56, 57, 104). Die Anergisierung ist übrigens Antigen-spezifisch und kann durch die Anwesenheit von Antigen und geeigneten Zytokinen wie IL-2, IL-15 oder IL-4 wieder aufgehoben werden (50). Außerdem gibt es Fälle, in denen sich die IFN- γ Produktion nicht verändert (105-107).

Es zeigt sich also, dass es leider auch hier sehr viele unterschiedlich interpretierbare Daten gibt und dass es sicherlich falsch ist, einen Faktor alleine für Erfolg oder Misserfolg der Immuntherapie verantwortlich zu machen. Viel eher ist es das Zusammenspiel der hier beschriebenen Faktoren. So können blockierende AK beispielsweise auch eine blockierende Aktivität auf Antigen-spezifische proinflammatorische T-Zellen besitzen (16). Es ist bekannt, dass die Antigenpräsentation gegenüber Allergen-spezifischen T-Zellen durch Allergen-spezifisches IgE deutlich verstärkt wird. Dies geschieht wahrscheinlich über den niedrig affinen IgE Rezeptor CD23 auf den Antigen-präsentierenden Zellen (108). Konkurrenz zwischen IgE und dem blockierenden AK könnte auf dieser Ebene in der späten Phase der Immuntherapie die Antigenpräsentation und somit die T-Zell Aktivierung verhindern (16, 109). Wichtig ist natürlich auch die blockierende Wirkung auf Mastzellen und Basophile. Dort gebundenes IgE konkurriert mit den blockierenden löslichen AK um freies Allergen.

Da Antigen-spezifisches IgE und IgG4, bezüglich der erkannten Epitope stark aneinander gekoppelt sind, ist für eine erfolgreich Blockierung IgG4 und nicht IgG1 wichtig (64). Dennoch reicht eine Bindung von IgG4 an das Allergen nicht aus. Erkennt IgG4 ein anderes Epitop als IgE, so kann das Allergen dennoch an IgE binden und die Mastzelle aktivieren (16). Dies stimmt auch mit den Daten von Jeep et al. (110) überein, die im Verlauf spezifischer Immuntherapien das Vorhandensein von IgG4 und IgE AK im Serum gegen die verschiedenen Epitope von Bienengift untersuchten. Nur in den Fällen, in denen für jedes Epitop, gegen das es IgE AK gab, auch deutlich mehr IgG4 AK vorhanden war, gab es einen Schutz bei einem Bienenstich. Ein Epitop, gegen das es mehr oder gleich viel IgE wie IgG4 AK gab, reichte aus, um den Patienten mit einer allergischen Reaktion reagieren zu lassen. Es scheint also nicht so sehr darauf anzukommen, dass die absolute Menge von spezifischem IgG4 deutlich über der von IgE liegt, sondern eher auf die Menge bezüglich spezifischer Epitope (110).

4.4.3. PLA-spezifische CD138⁺ PC treten nur kurzzeitig im Blut auf

Während dieser Arbeit wurde versucht, die Häufigkeit Allergen-spezifischer CD138⁺ PC im Verlauf einer Immuntherapie mit Insektengift zu untersuchen. Des Weiteren sollte ermittelt werden, welche Ig Klassen und Subklassen zu welchem Zeitpunkt der Therapie auftreten. Leider kam es im Laufe der Versuche zu Verzögerungen, so dass nicht mehr genügend Zeit blieb eine ausreichend große Menge an Patientendaten zu generieren. Wie bereits erwähnt, sollten neben PLA-spezifischen PC auch PLA-spezifische Gedächtnis B-Zellen und T-Zellen untersucht werden. Durch Probleme bei der Etablierung der nötigen Methoden kam es zu großen Verzögerungen. Ein anderes Problem war, dass wir lange Zeit davon abhängig waren, mit Bienengiftallergikern zu arbeiten. Unglücklicherweise unterziehen sich deutlich weniger Bienengiftallergiker als Wespengiftallergiker einer Immuntherapie. Dies führte dazu, dass wir mehr Zeit als ursprünglich erwartet benötigen, um eine ausreichend große Zahl an Datenpunkten zu sammeln, was durch Patienten, die ihre Therapie abbrachen, bei ihrem Hausarzt fortsetzen wollten oder kein Blut mehr spenden wollten noch verstärkt wurde. Somit basiert ein großer Teil der hier gezeigten Daten auf Proben einer Bienengiftallergikerin, der ich hier meinen großen Dank für ihr Engagement aussprechen möchte. Aufgrund dieser viel versprechenden Daten wurde beschlossen, das Projekt an der Uniklinik Köln fortzusetzen.

Obwohl die gezeigten Daten keinesfalls eine fundierte Aussage zulassen, werden die Datenpunkte des einen mehr oder weniger kompletten Therapieverlaufs durch viele Einzelpunkte anderer Patienten unterstützt (Abb. 19). So zeigt sich, dass vor der Therapie und in den ersten Tagen nach Therapiebeginn keinerlei PLA-spezifische CD138⁺ PC im Blut nachweisbar sind (Abb. 18 a). Auch IgE⁺ PC sind nicht detektierbar. Nach 7 Tagen nimmt die Zahl der spezifischen PC im Blut dramatisch (bis zu einem Faktor von 2000) zu (Abb. 18 c), um dann wieder relativ schnell abzusinken und an Tag 30 vollständig zu verschwinden (Abb. 18 e). Dieser Verlauf Antigen-spezifischer PC im Blut korreliert mit den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (83, 111, 112). Interessanterweise gibt es an Tag 7, also dem Tag, an dem es die meisten PLA-spezifischen PC gibt, nur wenige IgE⁺ PC, die jedoch alle spezifisch für PLA sind (Abb. 18 c, B). An Tag 10 jedoch findet man große Mengen IgE⁺CD138⁺ PC, von denen ein großer Teil PLA-spezifisch ist (Abb. 18 d, B). Erstaunlicherweise sind zu diesem Zeitpunkt schon etwa 50 % aller IgG⁺ PLA-spezifische PC im Blut IgG4⁺ (Abb. 18 d, D). Man würde diese Zellen erst zu späteren Zeitpunkten erwarten. Ungeklärt ist auch, warum es zwei unterschiedlich stark gefärbte Populationen PLA-spezifischer Zellen gibt, die sich zudem auch noch in der Expression

von IgG4 unterscheiden (Abb. 18 d, D). Hier müssten weiterführende Experimente Aufschluss geben. Da die spezifischen PC etwa 2 Wochen nach der letzten Insektengiftinjektion nicht mehr im Blut auffindbar sind, überrascht es auch nicht, dass zu den späteren Entnahmezeitpunkten, die jeweils 1 Monat nach der letzten Injektion lagen, keinerlei PLA-spezifische PC auffindbar waren (Abb. 18 f). Aus diesem Grunde wurden zusätzlich die Tage 3, 5 und 7 nach diesen Injektionen untersucht und es zeigte sich, dass an 5 Tage nach der monatlichen Injektion zwar eine klar erkennbare, aber dennoch deutlich kleinere Population PLA-spezifischer PC auffindbar ist, von denen etwa ein Drittel IgG4 exprimiert (Abb 18 g, D). Erstaunlicherweise scheint das Zeitfenster, in dem sich PC zu diesem Zeitpunkt der Therapie im Blut detektieren lassen, relativ klein zu sein. Nach 3 Tagen waren noch keine spezifischen PC detektierbar (Daten nicht gezeigt) und an Tag 7 waren fast alle wieder verschwunden (Abb 18 h). Die Zahl aller spezifischen PC zu diesem Zeitpunkt scheint deutlich verringert, was man mit der Anergisierung Antigen-spezifischer T-Zellen erklären könnte, wenn man mehr Daten, insbesondere von Antigen-spezifischen T-Zellen hätte. Somit muss es jedoch bei einer Vermutung bleiben. Dennoch sind diese Daten und die Tatsache, dass keine dieser späten Antigen-spezifischen PC IgE exprimiert, ist ein deutliches Indiz für den Erfolg der Therapie. Legt man die bisherigen Erkenntnisse über die IgG4 Expression spezifischer B-Zellen zugrunde, so ist zu erwarten, dass etwa 1-2 Jahre nach Therapiebeginn ein Großteil der spezifischen PC IgG4 exprimiert.

Insgesamt kann man trotz der geringen Zahl an Datenpunkten sagen, dass die Anreicherung von CD138⁺ PC und deren anschließende Antigen-spezifische Färbung eine viel versprechende Methode für die detaillierte Analyse Antigen-spezifischer PC im Verlauf von spezifischen Immuntherapien ist. Weiterhin unterstützen diese Daten die These, dass es sich bei den CD138⁺ PC im Blut um unreife, frisch gebildete PC handelt, da vor Therapiebeginn und 2 Wochen nach der Injektion des Antigens keine Antigen-spezifischen CD138⁺ PC im Blut auffindbar sind.

5. Zusammenfassung:

PC spielen eine wichtige Rolle in den verschiedensten Immunantworten. Ihre geringe Häufigkeit vor allem im Blut führte dazu, dass sie in vielen Fragen nur unzureichend erforscht sind. Da es lange Zeit auch keine Oberflächenmoleküle gab, die eine direkte Anreicherung von PC aus dem peripheren menschlichen Blut ermöglicht hätten, erschwerte dies die Charakterisierung der PC zusätzlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Isolation und Detektion von PC aus dem peripheren Blut entwickelt.

CD138 ist ein Molekül, das zu Beginn der PC Entwicklung hochreguliert wird und auf zirkulierenden B-Zellen oder anderen Zellen im peripheren Blut nicht vorkommt. An CD138 gebundene Mikropartikel wurden benutzt, um CD138⁺ PC aus dem Blut schnell und direkt magnetisch anreichern zu können. Die so erreichten Reinheiten von über 80% ermöglichten eine detaillierte Analyse der PC. Die Analyse legt nahe, dass es sich bei den CD138⁺ Zellen um frühe PC handelt, die kürzlich gebildet wurden und auf dem Weg in ihr Zielgewebe sind.

Da nur etwa die Hälfte aller PC im Blut CD138 exprimieren, wurde im weiteren Verlauf eine Methode zur Detektion aller Ig sezernierenden Zellen entwickelt. Bei dieser Methode, der zellulären Affinitätsmatrix Technologie, wird eine künstliche Fangmatrix auf die Zellen gebracht, die in der Lage ist, von der Zelle sezerniertes Ig einzufangen, wo es anschließend mit einem beliebigen Detektionsantikörper nachgewiesen werden kann. Somit ließen sich alle IgA, IgE und mit Einschränkungen auch IgG sezernierenden PC im Blut nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass etwa 50-80% aller IgE oder IgG, aber nur 25-50% aller IgA sezernierenden PC CD138 exprimieren.

Diese beiden Methoden zur PC Anreicherung bzw. PC Detektion wurden angewandt, um IgE⁺ PC im Blut von Normal Spendern, Atopikern und einem HIE Patienten nachzuweisen. Durch die CD138 Anreicherung und die anschließende intrazelluläre IgE Färbung ergab sich ein extrem sensitives Detektionssystem, das in der Lage war, in 80% aller Normalspender IgE⁺CD138⁺ PC nachzuweisen, was es von Arbeiten anderer Arbeitsgruppen deutlich abhebt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Zahl IgE⁺CD138⁺ PC in Atopikern und dem HIE Patienten teilweise um das 100-1000-fache erhöht sind und dass die Häufigkeit der IgE⁺CD138⁺ PC mit dem gemessenen IgE Serumtiter hoch signifikant korreliert.

Die Analyse Antigen-spezifischer CD138⁺ PC im Verlauf einer spezifischen Immuntherapie mit Bienen- oder Wespengift war ein weiterer Teil dieser Arbeit. Die Zahl PLA⁺CD138⁺ PC, sowie deren Ig Subklassen Verteilung wurde zu verschiedenen

Zeitpunkten der Therapie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bis zu 23% PLA-spezifische CD138⁺ PC kurzzeitig im Blut auftauchen. Diese Zellen verschwinden nach einigen Tagen wieder komplett aus dem Blut, lassen sich aber zu späteren Zeitpunkten kurz nach einer weiteren Insektengiftinjektion erneut nachweisen. Allerdings nimmt die Zahl der PLA-spezifischen PC im Verlauf der Therapie stark ab und ihr Isotyp ändert sich von IgE hin zu IgG was Indizien für einen Erfolg der Therapie sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Bruynzeel, P.L. and L. Berrens, *IgE and IgG4 antibodies in specific human allergies*. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1979. **58**(3): p. 344-50.
2. Gascan, H., et al., *Regulation of human IgE synthesis*. Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society For Allergy and Clinical Immunology, 1991. **21 Suppl 1**: p. 162-6.
3. Lundgren, M., et al., *Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells*. European Journal of Immunology, 1989. **19**(7): p. 1311-5.
4. Islam, K.B., et al., *TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes*. International Immunology, 1991. **3**(11): p. 1099-106.
5. Gauchat, D., et al., *Cytokine gene expression in atopics: effect of IL-4 on IL-1 beta and IL-6 mRNA levels*. European Cytokine Network, 1990. **1**(2): p. 85-90.
6. Liu, Y.J., et al., *Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens*. European Journal of Immunology, 1991. **21**(12): p. 2951-62.
7. Jacquot, S., et al., *CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling*. Journal of Immunology, 1997. **159**(6): p. 2652-7.
8. Nagumo, H., et al., *CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells*. Journal of Immunology, 1998. **161**(12): p. 6496-502.
9. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
10. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
11. Manz, R.A., et al., *Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen*. Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1703-11.
12. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.

13. Maruyama, M., K.P. Lam, and K. Rajewsky, *Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen*. *Nature*, 2000. **407**(6804): p. 636-42.
14. Dombrowicz, D., et al., *Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 969-76.
15. Lichtenstein, L.M., *Allergy and the immune system*. *Scientific American*, 1993. **269**(3): p. 116-24.
16. Aalberse, R.C., et al., *Allergen-specific IgG4 in atopic disease*. *Allergy*, 1993. **48**(8): p. 559-69.
17. Ruiz-Arguelles, G.J., et al., *Multiple myeloma: circulating lymphocytes that express plasma cell antigens*. *Blood*, 1984. **64**(2): p. 352-6.
18. Witzig, T.E., et al., *Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease activity in patients with multiple myeloma*. *Cancer*, 1993. **72**(1): p. 108-13.
19. Zandecki, M., et al., *Significance of circulating plasma cells in multiple myeloma*. *Leuk Lymphoma*, 1994. **14**(5-6): p. 491-6.
20. Harada, Y., et al., *Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance*. *British Journal of Haematology*, 1996. **92**(1): p. 184-91.
21. Pellat-Deceunynck, C., et al., *Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells*. *Blood*, 1994. **84**(8): p. 2597-603.
22. Jego, G., et al., *Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells*. *Blood*, 1999. **94**(2): p. 701-12.
23. Jego, G., R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck, *Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts*. *Blood*, 2001. **97**(6): p. 1817-22.
24. Quiding Jabrink, M., et al., *Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(6): p. 1281-6.
25. Quiding Jarbrink, M., et al., *Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing*

- commitments and cell surface differentiation markers*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 322-7.
26. Tarkowski, A., C. Czerkinsky, and L.A. Nilsson, *Simultaneous induction of rheumatoid factor- and antigen-specific antibody-secreting cells during the secondary immune response in man*. Clin Exp Immunol, 1985. **61**(2): p. 379-87.
27. Corry, D.B. and F. Kheradmand, *Induction and regulation of the IgE response*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B18-23.
28. MacKenzie, T. and H. Dosch, *Clonal and molecular characteristics of the human IgE-committed B cell subset*. J. Exp. Med., 1989. **169**(2): p. 407-430.
29. Thyphronitis, G., et al., *IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppressed by interferon gamma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(14): p. 5580-4.
30. Wijdenes, J., et al., *A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1*. Br J Haematol, 1996. **94**(2): p. 318-23.
31. Bernfield, M., et al., *Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 365-93.
32. Elenius, K., et al., *Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17837-43.
33. Ridley, R.C., et al., *Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen*. Blood, 1993. **81**(3): p. 767-74.
34. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. Cell Regul, 1989. **1**(1): p. 27-35.
35. Kantele, J.M., A. Kantele, and H. Arvilommi, *Circulating immunoglobulin-secreting cells are heterogeneous in their expression of maturation markers and homing receptors*. Clinical and Experimental Immunology, 1996. **104**(3): p. 525-30.
36. Manz, R., et al., *Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 1921-5.
37. Dhanjal, M.K., et al., *The detection of IgE-secreting cells in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(4): p. 895-904.

38. King, C.L., G. Thyphronitis, and T.B. Nutman, *Enumeration of IgE secreting B cells. A filter spot-ELISA*. J Immunol Methods, 1990. **132**(1): p. 37-43.
39. Poulsen, L.K., et al., *Biomolecular regulation of the IgE immune response. II. In vitro IgE synthesis and spontaneous production of cytokines*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **106**(1): p. 55-61.
40. Buckley, R.H., B.B. Wray, and E.Z. Belmaker, *Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection*. Pediatrics, 1972. **49**(1): p. 59-70.
41. Davis, S.D., J. Schaller, and R.J. Wedgwood, *Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses*. Lancet, 1966. **1**(7445): p. 1013-5.
42. Grimbacher, B., et al., *Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder*. N Engl J Med, 1999. **340**(9): p. 692-702.
43. Gudmundsson, K.O., et al., *Immunoglobulin-secreting cells in cord blood: effects of Epstein-Barr virus and interleukin-4*. Scand J Immunol, 1999. **50**(1): p. 21-4.
44. King, C.L., et al., *Frequency analysis of IgE-secreting B lymphocytes in persons with normal or elevated serum IgE levels*. Journal of Immunology, 1991. **146**(5): p. 1478-83.
45. Patterson, R., et al., *In vitro production of IgE by lymphocytes from a patient with hyperimmunoglobulinemia E, eosinophilia and increased lymphocytes carrying surface IgE*. Clin Exp Immunol, 1975. **20**(2): p. 265-72.
46. Renz, H., et al., *Enhancement of IgE production by anti-CD40 antibody in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(3): p. 658-68.
47. Thomas, P., W. Pflutzner, and B. Przybilla, *Frequency and activity of IgE-secreting peripheral blood B-cells in atopic eczema*. Acta Derm Venereol, 1995. **75**(6): p. 422-5.
48. Hunt, K.J., et al., *A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity*. New England Journal of Medicine, 1978. **299**(4): p. 157-61.
49. Muller, U., et al., *Immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus wholebody extract*. Allergy, 1979. **34**(6): p. 369-78.
50. Akdis, C.A., et al., *Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(7): p. 1676-83.

51. O'Brien, R.M., et al., *House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes*. *Clinical and Experimental Allergy*, 1997. **27**(1): p. 46-51.
52. Akdis, C.A., et al., *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy*. *Journal of Clinical Investigation*, 1998. **102**(1): p. 98-106.
53. Akdis, C.A. and K. Blaser, *IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy*. *Faseb Journal*, 1999. **13**(6): p. 603-9.
54. Bellinghausen, I., et al., *Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects*. *European Journal of Immunology*, 1997. **27**(5): p. 1131-9.
55. Nasser, S.M., et al., *Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy*. *European Journal of Immunology*, 2001. **31**(12): p. 3704-13.
56. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. *Journal of Immunology*, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
57. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. *Annual Review of Immunology*, 1993. **11**: p. 165-90.
58. Akoum, H., et al., *Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes*. *Immunology*, 1996. **87**(4): p. 593-8.
59. Jutel, M., et al., *Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1995. **154**(8): p. 4187-94.
60. O'Hehir, R.E., et al., *Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy*. *International Immunology*, 1991. **3**(8): p. 819-26.
61. Kammerer, R., et al., *Modulation of T-cell response to phospholipase A2 and phospholipase A2-derived peptides by conventional bee venom immunotherapy*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1997. **100**(1): p. 96-103.

62. Carballido, J.M., et al., *T cell epitope specificity in human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2*. Journal of Immunology, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3582-91.
63. Golden, D.B., et al., *Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1992. **90**(3 Pt 1): p. 386-93.
64. Hussain, R., R.W. Poindexter, and E.A. Ottesen, *Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass*. Journal of Immunology, 1992. **148**(9): p. 2731-7.
65. Reid, M.J., et al., *Seasonal asthma in northern California: allergic causes and efficacy of immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1986. **78**(4 Pt 1): p. 590-600.
66. Wetterwald, A., et al., *Isotypic and idiotypic characterization of anti-bee venom phospholipase A2 antibodies*. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1985. **77**(1-2): p. 195-7.
67. Terstappen, L.W., et al., *Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry*. Blood, 1990. **76**(9): p. 1739-47.
68. Van Camp, B., et al., *Two monoclonal antibodies (OKIa1 and OKT10) for the study of the final B cell maturation*. Journal of Clinical Immunology, 1982. **2**(3 Suppl): p. 67S-74S.
69. Berg, E., et al., *The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1*. J. Exp. Med., 1991. **174**(6): p. 1461-1466.
70. Picker, L.J., et al., *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells*. Nature, 1991. **349**(6312): p. 796-9.
71. Assenmacher, M., et al., *Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(1): p. 263-7.
72. Odendahl, M., et al., *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5970-9.
73. Agematsu, K., *Memory B cells and CD27*. Histology and Histopathology, 2000. **15**(2): p. 573-6.
74. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface*

- Antigen Carry Somatically Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatically Mutated (Memory) B Cells.* J. Exp. Med., 1998. **188**(9): p. 1679-1689.
75. Tangye, S.G., et al., *Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27.* Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(9): p. 1691-703.
76. van Lier, R.A., et al., *Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen.* Journal of Immunology, 1987. **139**(5): p. 1589-96.
77. Chadburn, A., G. Inghirami, and D.M. Knowles, *The kinetics and temporal expression of T-cell activation-associated antigens CD15 (LeuM1), CD30 (Ki-1), EMA, and CD11c (LeuM5) by benign activated T cells.* Hematologic Pathology, 1992. **6**(4): p. 193-202.
78. Hercend, T., et al., *Comparative expression of T9, T10, and Ia antigens on activated human T cell subsets.* Human Immunology, 1981. **3**(3): p. 247-59.
79. Anderson, K.C., et al., *Antigens on human plasma cells identified by monoclonal antibodies.* Journal of Immunology, 1983. **130**(3): p. 1132-8.
80. Kozbor, D., et al., *Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells.* Journal of Immunology, 1987. **138**(12): p. 4128-32.
81. Greiner, A., et al., *Characterization of Wue-1, a novel monoclonal antibody that stimulates the growth of plasmacytoma cell lines.* Virchows Archiv, 2000. **437**(4): p. 372-9.
82. KleinJan, A., et al., *Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients.* European Respiratory Journal, 2000. **15**(3): p. 491-7.
83. Sedgwick, J.D. and P.G. Holt, *Kinetics and distribution of antigen-specific IgE-secreting cells during the primary antibody response in the rat.* Journal of Experimental Medicine, 1983. **157**(6): p. 2178-83.
84. Tada, T. and K. Ishizaka, *Distribution of gamma E-forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey.* Journal of Immunology, 1970. **104**(2): p. 377-87.
85. Kawano, M.M., et al., *Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis.* Blood, 1995. **85**(2): p. 487-94.

86. Brieva, J.A., et al., *Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation*. Immunology, 1991. **72**(4): p. 580-3.
87. Harada, H., et al., *Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2658-63.
88. Kawano, M.M., et al., *Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas*. Blood, 1993. **82**(2): p. 564-70.
89. Hamann, A., et al., *Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1994. **152**(7): p. 3282-93.
90. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. **74**(1): p. 185-5.
91. Wehrli, N., et al., *Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes*. Eur J Immunol, 2001. **31**(2): p. 609-16.
92. Hargreaves, D.C., et al., *A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements*. J. Exp. Med., 2001. **194**(1): p. 45-56.
93. Kantele, A., et al., *Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 574-9.
94. Irsch, J., et al., *Switch recombination in normal IgA1+ B lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(4): p. 1323-7.
95. Brandtzaeg, P., I. Farstad, and G. Haraldsen, *Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track*. Immunology Today, 1999. **20**(6): p. 267-277.
96. Brandtzaeg, P., et al., *Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?* Immunology Today, 1999. **20**(3): p. 141-151.
97. Leyendeckers, H., et al., *Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG*. European Journal of Immunology, 1999. **29**(4): p. 1406-17.

98. Selin, L.K., et al., *Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2489-99.
99. Boluda, L., E. Fernandez_Caldas, and L. Berrens, *The role of IgG in type-I allergy: an unsolved problem*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 1997. **7**(4): p. 205-10.
100. Aalberse, R.C., R. van_der_Gaag, and J. van_Leeuwen, *Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1983. **130**(2): p. 722-6.
101. Hussain, R. and E.A. Ottesen, *IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1986. **136**(5): p. 1859-63.
102. van Milligen, F.J., et al., *Differences between specificities of IgE and IgG4 antibodies: studies using recombinant chain 1 and chain 2 of the major cat allergen Felis domesticus (Fel d) I*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(3): p. 247-51.
103. van Milligen, F.J., W. van 't Hof, and R.C. Aalberse, *IgE and IgG4 binding to synthetic peptides of the cat (Felis domesticus) major allergen Fel dI*. Int Arch Allergy Immunol, 1994. **103**(3): p. 274-9.
104. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
105. Ebner, C., et al., *Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen*. Clinical and Experimental Allergy, 1997. **27**(9): p. 1007-15.
106. Giannarini, L. and E. Maggi, *Decrease of allergen-specific T-cell response induced by local nasal immunotherapy*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(4): p. 404-12.
107. Secrist, H., et al., *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals*. The Journal of Experimental Medicine, 1993. **178**(6): p. 2123-30.
108. Mudde, G.C., et al., *IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture?* Immunology Today, 1990. **11**(12): p. 440-3.

109. van Neerven, R.J., et al., *Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation*. Journal of Immunology, 1999. **163**(5): p. 2944-52.
110. Jeep, S., et al., *Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge*. Allergy, 1996. **51**(8): p. 540-6.
111. Astori, M., et al., *Inducing tolerance by intranasal administration of long peptides in naive and primed CBA/J mice*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2000. **165**(6): p. 3497-505.
112. Kodo, H., R.P. Gale, and A. Saxon, *Antibody synthesis by bone marrow cells in vitro following primary and booster tetanus toxoid immunization in humans*. The Journal of Clinical Investigation, 1984. **73**(5): p. 1377-84.
113. Janeway, C.A and P. Travers, Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995
114. Radbruch, A., Flow cytometry and Cell Sorting, Springer Verlag

Summary

Plasma cells play an important role in many immune responses. Their low frequency especially in blood hampered their detailed analysis and therefore many questions still remain. The fact that for a long time no surface markers were available to directly enrich PC from human peripheral blood further aggravated the phenotypic analysis of the PC. During this work two methods for the isolation and detection of PC from peripheral blood were developed.

CD138 is a molecule, which is upregulated early during PC development. It is not expressed on circulating B-cells or other cells in peripheral blood. We used CD138 conjugated microbeads to magnetically enrich CD138⁺ PC from peripheral blood. The accomplished purities of more than 80% allowed a detailed phenotypic analysis of the PC. The enriched CD138⁺ cells exhibit the phenotype of early plasma cells, which have been recently generated and being on the way to their final destination.

As only half of the PC in blood express CD138 we further developed the cellular affinity-matrix technology, a method for the detection of all Ig secreting cells. We labelled cells with an artificial matrix being able to catch Ig secreted by the cells. The caught Ig can then be detected using an adequate detection antibody. Consequently we were able to detect all IgA, IgE and with some restrictions also IgG secreting cells in blood. It could be shown that approximately 50-80% of all IgE and IgG but only 25-50% of all IgA secreting cells do express CD138.

These two methods for the enrichment and detection of PC were used to identify IgE⁺ PC in the blood of normal donors, atopic patients and one HIE patient. Combining CD138 enrichment with the intracellular staining for IgE resulted in an extremely sensitive detection system being able to identify IgE⁺CD138⁺ PC in 80% of normal donors standing out this method against the work done by other groups. Additionally it could be shown that the number of IgE⁺CD138⁺ PC in atopics and the HIE patient was 100-1000 fold higher than in normal donors and that the frequency of IgE⁺CD138⁺ PC and the IgE serum titres correlated highly significantly.

The analysis of antigen-specific CD138⁺ PC during specific immunotherapy with bee- or wasp-venom was another part of this work. The number of PLA⁺CD138⁺ PC as well as their Ig subclasses was determined at different time points during therapy. It could be shown that up to 23% of PLA-specific CD138⁺ PC can be temporary found in blood. These cells disappear after some days completely from blood but reappear at later time points shortly after the last injection of the allergen. However the number of PLA-specific PC

decreases strongly during therapy and their isotype switches from IgE to IgG indicating a success of the immunotherapy.

Anmerkungen

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Firma Miltenyi Biotec unter der Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt angefertigt. Ich möchte mich ganz besonders bei Stefan Miltenyi bedanken, der mir und anderen Doktoranden die Arbeit in dieser tollen Umgebung ermöglichte. Des weiteren möchte ich Mario Assenmacher und Jürgen Schmitz für die in jeder Hinsicht ausgesprochen gute und stets kompetente Betreuung bedanken. Ich werde unseren Freitags Schmi-Schmu-Klub vermissen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Johannes Irsch danken, an den ich mich stets mit Fragen zu B-Zellen wenden konnte. Danken möchte ich auch allen anderen Leuten von Miltenyi Biotec. Sie haben eine Arbeitsumgebung geschaffen, die es in dieser Form wohl nur selten gibt. Mein Dank gilt allen TAs für ihre tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung und ihre kompetenten Auskünfte. Hier sind insbesondere Manuela Herber, Susanne Höher, Monika Zysk, Sandra Kosten, Sabine Martin, Melanie Fahrendorf, Ramona Siemer, Anja Fuchs, Julia Duwendag, die mir hoffentlich verzeiht, dass ich sie in diesem Zusammenhang erwähne, und natürlich Grittchen ‚Gitte‘ Günther zu nennen. Ebenfalls tolle Arbeit geleistet haben die Leute, die es durch ihre organisatorischen Arbeiten geschafft haben, uns Forschern die Füße und den Kopf von unliebsamen Aufgaben frei zu halten. Ein besonders großer Dank gilt den anderen Doktoranden und Diplomanden bei Miltenyi Biotec für interessante Diskussionen, gute Hilfestellungen und die Bereitschaft auch ein Leben neben der Forschung zu führen. Hier möchte ich namentlich Heike Leyendeckers, Andreas Dzionek, Gregor Winkels, der sich mal den dritten Punkt zu Herzen nehmen sollte, sowie Patricia Marschall, der ich ihr Gel verziehen habe, nennen.

Nicht vergessen darf ich natürlich Sergio Arce und Rudi Manz aus der Arbeitsgruppe von Andreas Radbruch. Ohne Sergios Mithilfe hätten einige Versuche dieser Arbeit so nicht funktioniert.

Einen großen Anteil am Ergebnis meiner Arbeit hat auf Nicolas Hunzelmann, der mich mit einem unglaublichen Elan mit Patientenblut versorgt hat und stets zu fachlichen Diskussionen bereit war, sowie Frau Laufs, die immer wieder bereit war, Blut zu spenden und somit einem Teilprojekt meiner Promotion auf die Beine half.

Wenn man wie ich fast 6 Jahre an seiner Promotion arbeitet, dann ist sehr wichtig, seine tägliche Ration seelische und moralische Unterstützung zu bekommen. Dafür möchte ich euch allen danken. Dies gilt insbesondere für meine Eltern und meine Frau Antje, die endlich guten Gewissens die Frage beantworten kann: “Hat dein Mann eigentlich schon seine Promotion abgeschlossen?”

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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.

Alexander Horst

Teilpublikationen:

A. Horst, N. Hunzelmann, S. Arce, M. Herber, R. A. Manz, A. Radbruch, R. Nischt, J. Schmitz, M. Assenmacher: Detection and characterisation of plasma cells in peripheral blood: Correlation of IgE⁺ plasma cell frequency with IgE serum titre. Clin Exp Immunol 2002 Dec;130(3):370-8

Lebenslauf

Alexander Horst

geboren am 28.03.1968 in Rotenburg/Fulda

verheiratet seit 22.09.1995 mit Antje Tiedemann

- | | |
|---------------|---|
| 1974 – 1978 | Pestalozzi Grundschule, Trier-Euren |
| 1978 – 1980 | Max-Planck Gymnasium, Trier |
| 1980 – 1984 | Rhein-Sieg Gymnasium, St. Augustin |
| 1984 – 1987 | Internationale AFCENT Schule Brunssum, NL |
| Juni 1987 | Abitur |
| 1987 – 1989 | Wehrdienst |
| 1989 – 1996 | Diplomstudium der Biologie an der Universität zu Köln
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer Biochemie, Organische Chemie |
| 1992 | Vordiplom |
| 1995 –1996 | Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln
unter der Anleitung von Prof. Andreas Radbruch
„Isolation dendritischer Zellen aus menschlichem Blut mittels
magnetischer Zellsortierung“ |
| November 1996 | Diplom |
| 1996-2002 | Promotionsstudium an der Universität zu Köln |