

**Analyse des transmembranen Glykoproteins CD83 als
Regulator muriner B-Lymphozyten *in vitro* und *in vivo*
(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Birte Kretschmer

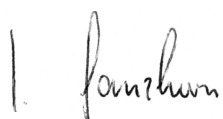
beim Department für Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg, Februar 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weiterer Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 17. April 2009

Hamburg, den 03. April 2009




Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem.....	2
1.2	B-Zell-Aktivierung.....	2
1.2.1	T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung	2
1.2.2	T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung	4
1.3	BCR-Komplex und B-Zell-Korezeptoren.....	6
1.4	CD83.....	8
1.4.1	Struktur und Expression von CD83.....	8
1.4.2	Funktion von CD83	10
1.4.2.1	Einfluss von CD83 auf die T-Zell-Entwicklung	10
1.4.2.2	Einfluss von CD83 auf die periphere T-Zell-Antwort	11
1.4.2.3	Kostimulatorische Rolle von CD83 auf APCs.....	11
1.4.2.4	Einfluss von CD83 auf B-Lymphozyten.....	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Laborgeräte.....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikmaterialien).....	16
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.3.1	Biochemische Arbeiten.....	17
2.1.3.2	Zellbiologische Arbeiten.....	17
2.1.3.3	Tierexperimentelle Arbeiten	18
2.1.4	Antikörper	19
2.1.5	Peptide und Proteine.....	20
2.1.6	Mausstämme.....	21
2.1.7	Puffer und Stammlösungen	21
2.1.7.1	Biochemische Arbeiten.....	21
2.1.7.2	Zellbiologische Arbeiten.....	22
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Biochemische Methoden	24

2.2.1.1 ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-2, IL-10, IFN- γ) im Zellkulturüberstand.....	24
2.2.1.2 ELISA zum Nachweis von gesamt-Ig im Zellkulturüberstand	25
2.2.1.3 ELISA zum Nachweis von HEL-spezifischem Ig im Zellkulturüberstand oder Serum.....	25
2.2.1.4 ELISA zum Nachweis von OVA- oder NIP-spezifischem Ig im Serum	26
2.2.1.5 ELISA zum Nachweis von anti-CD83 mAk im Serum	26
2.2.2 Zellbiologische Methoden	26
2.2.2.1 Wichtige Grundsätze der Zellkultur.....	26
2.2.2.2 Präparation muriner Milzzellen	27
2.2.2.3 Präparation muriner Knochenmarkzellen	27
2.2.2.4 Präparation muriner peripherer Blutzellen.....	27
2.2.2.5 Präparation muriner Lymphknotenzellen.....	28
2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau	28
2.2.2.7 Anreicherung von B- und T-Zellen aus Milzzellpräparationen	28
2.2.2.8 Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration	29
2.2.2.9 <i>In vitro</i> Stimulationsexperimente.....	30
2.2.2.10 Proliferationstest: Einbau von ^3H -Thymidin	32
2.2.2.11 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE.....	32
2.2.2.12 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)	33
2.2.2.13 Analyse der Internalisierung transmembraner Moleküle.....	34
2.2.2.14 Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen.....	34
2.2.2.15 Analyse der Stimulationskapazität von APCs <i>in vivo</i>	35
2.2.2.16 CD83-Expression auf B-Zellen nach T-Zell-Stimulation <i>in vivo</i>	35
2.2.3 Tierversuche	35
2.2.3.1 Gewinnung von Serum	35
2.2.3.2 T-Zell-abhängige Immunisierung mit den Modellantigenen OVA oder DNP-KLH	35
2.2.3.3 T-Zell-unabhängige Immunisierung mit dem Modellantigen NIP-Ficoll.....	36
2.2.3.4 Herstellung von Knochenmarkchimären	36
2.2.3.5 Depletion CD11c ⁺ DTRtg DCs <i>in vivo</i>	36
2.2.4 Statistik.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Teil I: Charakterisierung CD83tg und CD83-defizienter B-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ..	38
3.1.1 CD83 transgene B-Zellen zeigen eine reduzierte Ig-Sekretion und gesteigerte IL-10 Produktion <i>in vitro</i>	38
3.1.2 CD83tg x IgHELtg B-Zellen sezernieren signifikant weniger Ag-spezifisches Ig <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	39
3.1.3 Verminderte Ig-Sekretion und gesteigerte IL-10 Produktion CD83tg B-Zellen sind unabhängig von akzessorischen Zellen <i>in vitro</i>	41
3.1.4 Überexpression von CD83 interferiert mit dem Kalziumsignal <i>in vitro</i>	43

3.1.5	CD83mu B-Zellen zeigen eine gesteigerte Ig-Sekretion und eine verminderte IL-10 Produktion <i>in vitro</i>	44
3.1.6	Vergleich der Ig-Antwort von CD83tg und CD83mu Mäusen <i>in vivo</i>	45
3.1.7	Überexpression von CD83 begünstigt nicht die Inzidenz von Apoptose <i>in vitro</i>	48
3.1.8	IL-10 hat keinen Einfluss auf die Proliferation und Ig-Sekretion CD83tg B-Zellen <i>in vitro</i>	50
3.1.9	Der Phänotyp CD83tg und CD83mu B-Zellen ist nicht auf eine veränderte Oberflächenflächendichte kostimulatorischer Moleküle zurückzuführen	52
3.1.10	Kein Einfluss von CD83 auf die Oberflächenstabilität von MHC-II und CD86	54
3.1.11	Untersuchung zum Einfluss von CD83 auf die stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen <i>in vitro</i>	55
3.1.12	Untersuchung zum Einfluss von CD83 auf die stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu APCs <i>in vivo</i>	57
3.1.13	Zusammenfassung Teil I	59
3.2	Teil II: Untersuchungen zur Rolle von CD83 bei der B-Zell-Regulation in Wildtyp Mäusen.....	60
3.2.1	Induktion von CD83 auf B-Zellen.....	60
3.2.1.1	BCR- oder TLR-Engagement induziert die Expression von CD83 auf B-Zellen	60
3.2.1.2	TCR-Engagement induziert die Expression von CD83 auf B-Zellen	62
3.2.1.3	Aktivierung von Nachbar-B-Zellen ist unabhängig von der Interaktion zwischen Peptid:MHC- II-Komplex und Ag-spezifischer T-Zelle	63
3.2.2	Engagement von CD83 <i>in vivo</i>	65
3.2.2.1	CD83-Engagement hat keinen Einfluss auf die Ig-Antwort gegen T-Zell-abhängige Ag	66
3.2.2.2	CD83-Engagement hat einen dosisabhängigen Effekt auf die IgG1-Antwort gegen T-Zell- unabhängige Ag	67
3.2.2.3	Steigerung von NIP-spezifischem IgG1 durch gleichzeitiges Engagement von CD83 und BCR <i>in vivo</i>	69
3.2.2.4	Engagement von CD83 auf B-Zellen führt zur Steigerung der IgG1-Antwort	70
3.2.2.5	Engagement von CD83 auf DCs hat keinen Einfluss auf die IgG1-Antwort.....	74
3.2.3	Zusammenfassung Teil II	80
4	Diskussion.....	81
4.1	CD83 als regulatorisches Element der Aktivierung und Funktion von B-Lymphozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	81
4.2	CD83: ein weiterer inhibitorischer B-Zell-Rezeptor?	84
4.2.1	Wie transduziert CD83, dessen kurzer zytoplasmatischer Teil keine Tyrosinreste und somit keine Signalmotive besitzt, regulatorische Signale in die B-Zelle?	88

4.2.2	Warum zeigt die chimäre JHT/CD83 ^{mu} Maus, der CD83 selektiv auf B-Zellen fehlt, keine überschießende Ig-Antwort?	90
4.2.3	Wenn der anti-CD83 mAk <i>in vivo</i> neutralisierend wirkt, kann der Phänotyp CD83 ^{tg} B-Zellen durch die Applikation des anti-CD83 mAk revertiert werden?	91
4.2.4	Warum führt das Engagement von CD83 während einer T-Zell-unabhängigen Immunisierung ausschließlich zur Steigerung von IgG1?	93
4.2.5	Warum hat das Engagement von CD83 keinen Effekt auf die Ig-Antwort gegen T-Zell-abhängige Ag?	94
4.3	Ausblick	95
5	Zusammenfassung	98

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
ADCC	Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Kalziumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CFSE	Carboxy-Fluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
DT	Diphtherie-Toxin
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
Fc	Antikörperfragment, das aus dem Verdau von IgG mit Papain hervorgeht (<i>fragment crystallisable</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC/SSC	Vorwärts-/Seitwärtssteulicht (<i>forward/side scatter</i>)
HEL	Hühner-Eiweiß-Lysozym
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ITAM	Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activatory motif</i>)
ITIM	Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
L	Ligand
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mu	mutant
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
NIP	4-Hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetyl
Oct	Oktamer
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OT	Ovalbumin-transgen
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen (<i>potentia hygrogenii</i>)
PLC	Phospholipase C

PRR	Rezeptor für Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pattern recognition receptor</i>)
PS	Phosphatidylserin
R	Rezeptor
REU	relative ELISA Einheit (<i>relative ELISA unit</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	löslich (<i>soluble</i>)
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (<i>standard error of the mean</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TD	thymusabhängig (<i>thymus dependent</i>)
TEC	Thymus-Epithel-Zelle (<i>thymus epithelial cell</i>)
TF	Transkriptionsfaktor
tg	transgen
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TI	thymusunabhängig (<i>thymus independent</i>)
TLR	<i>Drosophila</i> -Toll-Protein homologer Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TMB	Tetramethylbenzidin
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf
wt	Wildtyp

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

Ich danke Herrn Professor Fleischer für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Professor Iris Bruchhaus möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Für die intensive und ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die unermüdliche Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Minka Breloer.

Frau Dr. Anke Osterloh danke ich für die großzügige Unterstützung beim „Photoshopping“.

Schließlich danke ich allen Mitgliedern der Abteilung für die vielen praktischen Tipps und Anregungen während meiner Arbeit und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Zum Aufgabenbereich des Immunsystems gehören sowohl der Schutz des Organismus vor einer Vielzahl von infektiösen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, als auch der Erhalt der Struktur körpereigener Gewebe durch die Eliminierung alternder, entarteter oder infizierter Zellen.

Das Immunsystem höherer Vertebraten lässt sich in zwei miteinander wechselwirkende Systeme einteilen: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Beide Systeme setzen sich aus zellulären und humoralen Faktoren zusammen.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus den entwicklungsgeschichtlich ursprünglicheren Zelltypen und Effektormechanismen. Die angeborene Immunität beruht auf einer Antigen (Ag)-unspezifischen Abwehr, die innerhalb kürzester Zeit nach Erscheinen eines Ag im Organismus wirkt. Die Funktion des angeborenen Immunsystems wird zellulär durch dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) [1-3], Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen [4] wahrgenommen. Die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über ein Repertoire an konservierten Rezeptoren, mit denen sie universelle Pathogen-assoziierte Strukturen erkennen und auf diese Weise unterschiedlichste pathogene Mikroorganismen detektieren können. Rezeptoren, die typische Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen, die sogenannten *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), binden, werden als *pattern recognition receptor* (PRR) bezeichnet [5, 6]. Als Folge der Bindung kommt es zur Phagozytose des Pathogens und zur Induktion verschiedener Effektormechanismen, wie zum Beispiel der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies oder löslicher Mediatoren (Zytokine und Chemokine). Eine weitere wichtige humorale Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem [7]. Dieses besteht aus mehreren Plasmaproteinen, die sequentiell gesteuert miteinander interagieren. Aktive Komplementfaktoren wirken chemotaktisch und pro-inflammatorisch und opsonieren Pathogene. Der generierte Membranangriffskomplex ermöglicht eine Porenbildung in der Lipiddoppelschicht der attackierten Zelle, was

letztendlich zur Zerstörung derselben führt [7]. Mit Hilfe des angeborenen Immunsystems werden 90 % aller Krankheitserreger erfolgreich bekämpft.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem entwickelt sich während der gesamten Lebenszeit. Es ermöglicht die Ag-spezifische Reaktion auf ein beliebiges Ag. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität zeichnen sich die an der adaptiven Immunität beteiligten Zellen durch folgende Charakteristika aus: Spezifität, Diversität, immunologisches Gedächtnis [8] und die Fähigkeit körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden (immunologische Toleranz).

Die an der adaptiven Immunantwort beteiligten Zellen besitzen jeweils einen einzigartigen Erkennungsrezeptor, der klonalen Ursprungs und für die hohe Spezifität der Pathogenerkennung durch diese Zellen verantwortlich ist. Durch somatische Rekombination im Verlauf der Reifung der Zellen entsteht eine große Vielfalt an Zellen mit jeweils einzigartiger Rezeptorspezifität. Eine selektive klonale Expansion [9] der für ein bestimmtes Pathogen spezifischen Lymphozyten erfolgt erst nach dem ersten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen. B- und T-Lymphozyten bilden die zelluläre Komponente des adaptiven Immunsystems, die von B-Zellen sezernierten Immunglobuline (Ig) stellen die humorale Komponente dar.

1.2 B-Zell-Aktivierung

Bindet die B-Zelle über den B-Zell-Rezeptor (BCR) ihr spezifisches Antigen, wird sie aktiviert. Die Aktivierung der B-Zelle kann entweder thymusunabhängig (*thymus independent*, TI) oder thymusabhängig (*thymus dependent*, TD) erfolgen (Abb. 1.1).

1.2.1 T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung

TD-Ag sind zumeist Proteine. Für die Reaktion auf TD-Ag werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal erhält die B-Zelle nach Bindung des Ag an den Ag-spezifischen BCR. Das gebundene Protein wird durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert, proteolytisch gespalten und als Peptidfragment in Assoziation mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) der

Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert [10, 11]. Das zweite Signal wird von einer für das präsentierte Peptid spezifischen $CD4^+$ T-Helferzelle (T_H -Zelle) vermittelt, die auf der Oberfläche der B-Zelle das spezifische Ag im Komplex mit MHC-II bindet. Dabei wird über die Bindung des CD40-Liganden (CD40L) der T-Zelle an den CD40-Rezeptor (CD40) der B-Zelle das zweite Signal vermittelt [12]. Die TD B-Zell-Aktivierung führt einerseits zur Entstehung kurzlebiger Plasmazellen, die extrafollikulär, in der roten Milzpulpa oder in den Marksträngen der Lymphknoten, eine Ig-Antwort induzieren [13]. Andererseits kommt es durch die klonale Expansion der Ag-spezifischen B-Zellen in den primären Follikeln zur Ausbildung von sekundären B-Zell-Follikeln (Keimzentrum) [14]. Die sich in den Keimzentren intensiv teilenden B-Zellen werden als Zentroblasten bezeichnet, sie bilden die dunkle Zone des Keimzentrums. Aus den Zentroblasten entwickeln sich Zentrozyten, die verstärkt membranständiges Ig exprimieren und in der hellen Zone des Keimzentrums lokalisiert sind. In den Keimzentren findet durch somatische Hypermutation die Affinitätsreifung der Antikörper (Ak) statt [15]. Dabei werden Punktmutationen in die variable Region der schweren und leichten Ketten eingefügt. Follikuläre dendritische Zellen sind an der Affinitätsreifung der B-Zellen beteiligt. Sie präsentieren den Zentrozyten, an Fc- und Komplementrezeptoren gebundene Ag-Ak-Komplexe. B-Zellen, deren Affinität zum Ag durch die eingefügte Mutation gesteigert wird, können den ebenfalls in der hellen Zone des Keimzentrums lokalisierten und durch dasselbe Ag aktivierten T_H -Zellen das Ag präsentieren, erhalten dadurch Überlebenssignale und werden positiv selektiert. Defekte und autoreaktive B-Zellen werden hingegen während der Entwicklung durch Apoptose eliminiert [16]. Positiv selektierte B-Zellen proliferieren und differenzieren zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Ein Teil, der im Verlauf von Immunantworten gebildeten Plasmazellen wandert ins Knochenmark und in die Markstränge der Lymphknoten und differenziert zu langlebigen Plasmazellen. Diese bilden ohne Antigenkontakt hochaffine Ak und sind damit wesentlich an der Aufrechterhaltung des humoralen Immungedächtnisses beteiligt [17]. Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren durch die lymphatischen Organe. Bei einem erneuten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen generieren sie eine schnelle Antikörperantwort.

Der Isotypwechsel gegen TD-Antigene wird durch T_H -Zelle kontrolliert und setzt die Interaktion des CD40L auf der T-Zelle mit dem CD40-Rezeptor auf der B-Zelle voraus. Der Ig-Klassenwechsel unterliegt dann der Kontrolle verschiedener Zytokine, die im

Rahmen der Immunantwort von den T-Effektorzellen sezerniert werden. So wird im murinen System durch IL-4 der Isotypwechsel zu IgG1 und IgE induziert [18]. TGF- β hingegen fördert den Wechsel zu IgG2b und IFN- γ induziert den Wechsel zu IgG2a und IgG3.

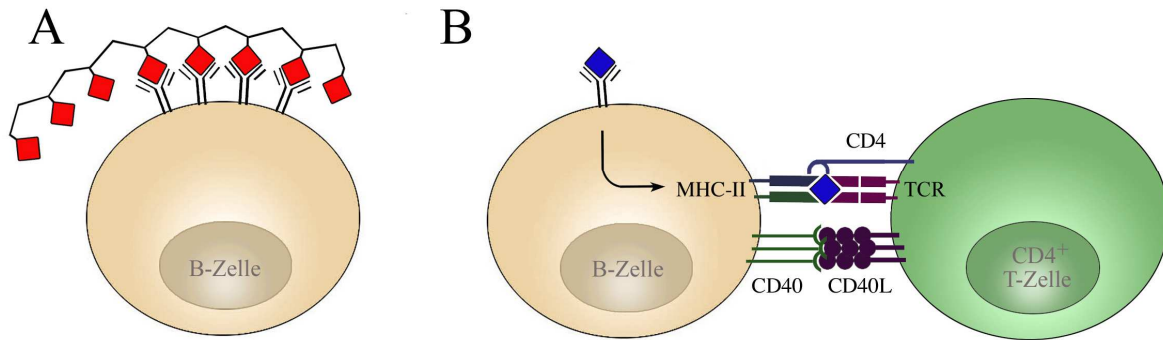


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der thymusunabhängigen (*thymus independent*, TI) und thymusabhängigen (*thymus dependent*, TD) B-Zell-Aktivierung. **A:** TI-Ag aktivieren B-Zellen, indem sie mit ihren hochrepetitiven Strukturen eine starke Quervernetzung der Ag-spezifischen BCRs bewirken. **B:** Für die B-Zell-Aktivierung durch TD-Ag ist eine Beteiligung von T-Zellen erforderlich. Durch die Bindung des Ag wird der Ag-spezifische BCR quervernetzt und die Zelle erhält das erste Signal. Das zweite Signal wird von einer CD4⁺ T-Zelle, die auf der Oberfläche der B-Zelle das Ag im Komplex mit MHC-II erkennt, durch die Bindung des CD40L der T-Zelle an CD40 auf der B-Zelle, vermittelt.

1.2.2 T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung

B-Zellen können auch unabhängig von T-Zellen durch TI-Ag aktiviert werden. TI-Ag werden in TI-1- und TI-2-Ag, eingeteilt. TI-1-Ag, wie zum Beispiel die in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthaltenen Lipopolysaccharide (LPS), aktivieren B-Zellen polyklonal, unabhängig von deren Ag-Spezifität. TI-2-Ag, wie zum Beispiel NIP-Ficoll oder bakterielle Zellwandpolysaccharide von *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oder *Neisseria meningitidis*, aktivieren B-Zellen, indem sie mit ihren hoch repetitiven Strukturen ein multivalentes Engagement der Ag-spezifischen BCR bewirken [19, 20]. Obwohl TI-2-Ag B-Zellen alleine aktivieren, gibt es viele Hinweise dafür, dass für die Ig-Antwort gegen TI-2-Ag, neben der Kreuzvernetzung des BCR, ein weiteres Signal benötigt wird („Zwei-Signal-Hypothese“) [19]. So zeigten Peçanha *et al.*, dass die multivalente Ligation des BCR *in vitro* zwar zu einer starken Proliferation der B-Zellen führt, für die Induktion der Ig-Sekretion aber ein weiteres Lymphokin-vermitteltes Signal notwendig ist [21]. Für die Notwendigkeit eines zweiten Signals spricht ebenfalls, dass die Induktion autoimmuner Antikörpern gegen multivalente Selbst-Ag, wie

zum Beispiel DNA, Kollagen, Aktin oder Tubulin, verhindert werden sollte [22]. Es gibt Hinweise, dass T-Zellen dieses zweite Signal an die B-Zelle vermitteln [23]. Anhand von athymischen Mäusen, denen reife T-Zellen fehlen, wurde gezeigt, dass T-Zellen einen Einfluss auf die Immunantwort gegen TI-2-Ag ausüben. Der Transfer von T-Zellen in diese Mäuse führte zu einer gesteigerten Ig-Antwort gegen TI-2-Ag [24]. *In vitro* wurde gezeigt, dass B-Zellen, die in Gegenwart von T-Zell-abstammenden Faktoren kultiviert werden, eine gesteigerte Ig-Antwort gegen TI-2-Ag aufweisen [21, 25]. In Übereinstimmung damit stimulieren TI-2-Ag T-Zellen zur Sekretion von IL-2, IL-4 und IFN- γ [26]. Neben löslichen T-Zell-Faktoren wird auch die Interaktion des CD40L auf der T-Zelle mit CD40 auf der B-Zelle als mögliches zusätzliches Signal diskutiert. Sowohl CD40^{-/-} als auch CD40L^{-/-} Mäuse können eine mit Wildtyp Mäusen vergleichbare Ig-Antwort gegen TI-2-Ag generieren. Dieser Befund spricht dafür, dass die Ig-Antwort gegen TI-2-Ag unabhängig von der Interaktion des CD40L auf der T-Zellen mit CD40 auf der B-Zelle ist [27-29]. Andererseits wurde gezeigt, dass kapsuläre Polysaccharide die Expression von CD40L auf T-Zellen induzieren [30] und dass die Gabe eines agonistischen anti-CD40 Ak zu einer gesteigerten Ig-Antwort gegen kapsuläre Polysaccharide führt [31]. Wie TI-2-Ag Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung nehmen könnten ist unklar, da diese, es sei denn sie enthalten einen großen Proteinanteil, weder prozessiert noch auf MHC-Klasse II Molekülen präsentiert werden [32]. Eine direkte Aktivierung der T-Zelle durch das TI-2-Ag und die Rekrutierung von T-Zellen durch die aktivierte B-Zelle ohne Interaktion des TCR mit dem Peptid:MHC-II Komplex werden diskutiert [19]. Darüber hinaus wird spekuliert, dass TI-I-2-Ags über das MHC-Klasse-I-artige Molekül CD1 an CD1-restringierte T-Zellen präsentiert werden [33].

Wird eine T_H-Zelle durch dasselbe Antigen aktiviert und zur Sekretion der entsprechenden Zytokine angeregt, kann es auch bei der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Aktivierung zum Ig-Klassenwechsel kommen. Auch der Interaktion von BLys (*B lymphocyte stimulator*) und APRIL (*a proliferation induced ligand*), die auf Monozyten/Makrophagen, DCs und aktivierten T-Zellen exprimiert werden, mit dem auf B-Zellen exprimierten TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor*) oder BCMA (*B cell maturation antigen*) wird eine Rolle bei der B-Zell-Antwort gegen TI-2-Ag zugeschrieben [34, 35]. So zeigen TACI^{-/-} Mäuse eine reduzierte Immunantwort gegen

TI-2-Ag [36]. APRIL transgene Mäuse weisen hingegen eine, im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, gesteigerte Ig-Antwort gegen TI-2-Ag auf [36].

Auch bei der TI B-Zell-Aktivierung entwickeln sich Plasmazellen. Die sezernierten Ak sind allerdings nur schwach affin, da zumeist keine Affinitätsreifung stattfindet. Es werden nur sehr wenige langlebige Plasmazellen [13, 37] und in ganz seltenen Fällen Gedächtnis-B-Zellen gebildet [38].

1.3 BCR-Komplex und B-Zell-Korezeptoren

Der BCR-Komplex reifer B-Zellen besteht aus membranständigem Ig, einem tetrameren Komplex aus schwerer und leichter Ig-Kette, und den nicht kovalent assoziierten Proteinen Ig α (CD79 α) und Ig β (CD79 β) [39]. Über tonische Signale steuert der BCR-Komplex die Differenzierung und das Überleben der B-Zelle [40]. Die Bindung des spezifischen Antigens erfolgt über das membranständige Ig, das selbst keine Signalmotive in der kurzen intrazellulären Domäne enthält. Die Signalweiterleitung in die Zelle erfolgt deshalb durch das über Disulfidbrücken verbundene Heterodimer aus Ig α und Ig β . Ig α und Ig β tragen in ihrer zytosolischen Domäne je ein Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (*immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*, ITAM). Dieses besteht aus zwei Tyrosinresten, die durch neun bis zwölf Aminosäuren (AS) voneinander getrennt sind. Bindet das spezifische Antigen an den BCR, kommt es zu einer Konformationsänderung, die dazu führt, dass assoziierte Tyrosinkinasen der Src-Familie, wie Fyn, Lyn oder Blk, aktiviert werden. Diese phosphorylieren die Tyrosin-Reste in den ITAM-Motiven von Ig α und Ig β und schaffen dadurch eine Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase Syk [40]. Syk leitet ebenfalls durch Phosphorylierung verschiedene Signaltransduktionswege, wie den Phosphoinositol- oder den RAS-MAP-Kinase-Signalweg ein und führt letztendlich zur Modulation der Genexpression, die verschiedene Schicksale der B-Zelle, wie Aktivierung, Anergy oder Apoptose, zur Folge haben kann. Das über den BCR induzierte Signal wird durch ein breites Spektrum akzessorischer, koexprimierter Rezeptoren entweder positiv oder negativ moduliert [41, 42]. Aktivierende Moleküle, wie zum Beispiel der CD19/CD21/CD81-Korezeptorkomplex, verringern den Schwellenwert, der für die Aktivierung der reifen B-Zellen durch den BCR-Komplex notwendig ist. CD19 trägt in seiner zytosolischen Domäne ebenfalls ein ITAM, das durch die Assoziation mit dem BCR das BCR-Signal steigert. Inhibierende Rezeptoren hingegen weisen in der intrazellulären Domäne eine oder

mehrere Tyrosininhibierungssequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*, ITIMs) auf, die aus einer sechs AS langen Konsensussequenz (I/V)-X-Y-X-X-(L/V) bestehen, wobei X eine beliebige AS kennzeichnet [43]. Sie sind essentiell für die Entstehung und Weiterleitung des inhibitorischen Signals [44]. Negative Korezeptoren attenuieren die BCR-vermittelte Signaltansduktion und kontrollieren dadurch die Aktivierungsschwelle der B-Zelle. Das Fehlen inhibitorischer Signale ist oft mit Autoreaktivität und unkontrollierten entzündlichen Antworten assoziiert [42]. Werden aktivierende und inhibierende Korezeptoren zeitgleich engagiert, ergibt sich das Nettosignal aus der relativen Stärke der gegenläufigen Signale. Für B-Zellen ist eine Reihe inhibitorischer Rezeptoren beschrieben. Zu diesen gehören FcγRIIb, ein für den Fc-Teil von IgG schwach affiner Rezeptor [43, 45], CD22 [46], PD-1 (*programmed-death*, PD), CD5 [47], CD66a [48], LAIR-1 (*leucocyte-associated Ig-like receptor*, LAIR) [49], PIR-B (*paired Ig-like receptor*, PIR) [50], ILT-2 (*Ig-like transcripts*, ILT), das auch als LIR-1 (*leukocyte Ig-like receptors*) [51] bekannt ist, und CD72 [52]. Bis auf CD72, ein Mitglied der Lektin-ähnlichen Moleküle, gehören alle genannten inhibitorischen Rezeptoren zur Ig-Superfamilie.

Als Konsequenz der Ligandenbindung oder der Koligation mit dem BCR kommt es zur Aktivierung der Tyrosin-Kinase Lyn. Diese phosphoryliert die ITIMs in der zytoplasmatischen Region negativer B-Zell-Regulatoren [53]. Durch die Tyrosinphosphorylierung wird im ITIM eine Bindungsstelle für inhibitorische Tyrosinphosphatasen, die eine Src-homologe Domäne 2 (SH2) aufweisen, geschaffen. Es gibt zwei Klassen von Phosphatasen, die eine SH2-Domäne tragen: die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 und die Inositol-Phosphatasen SHIP und SHIP-2. SHP-1 wird zur zytoplasmatischen Region von CD22, CD72, CD5, PIR-B, ILT-2, LAIR-1 und CD66a rekrutiert. SHP-2 bindet an das ITIM von PD-1 und SHIP an das ITIM von FcγRIIb [42].

SHP-1 ist ein wichtiger Inhibitor des Kalziumsignals und wirkt, indem es Komponenten der BCR-Signal-Kaskade dephosphoryliert. Es entfernt Phosphatgruppen von den Tyrosinkinasen, die durch das BCR-Engagement aktiviert wurden und von den Zielmolekülen der Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel dem BCR-Komplex, dem Adaptorprotein BLNK und der Effektorphospholipase C (PLC). Frühe Schritte der Aktivierung, wie die Mobilisierung von Kalzium (Ca^{2+}), werden dadurch inhibiert. SHIP hingegen inhibiert den Ca^{2+} -Einstrom durch die Hydrolyse des Inositol-Phosphates PIP_3

(Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat). Fehlt PIP3 können wichtige Signalmoleküle, wie die Phospholipase C- γ , der antiapoptotische Faktor Akt, der Austauschfaktor Vav und Tec-Kinasen [54, 55], nicht mehr rekrutiert werden. Das hat zur Folge, dass der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zellen unterbunden wird [40].

1.4 CD83

1.4.1 Struktur und Expression von CD83

CD83 ist ein Typ-I-Transmembranprotein. Es wurde 1992 erstmals als „HB15“ aus einer humanen Tonsillen cDNA kloniert [56]. Ein Jahr später gelang Kozlow *et al.* die Klonierung von CD83 als „BL11“ aus einer humanen B-Lymphozyten cDNA [57]. 1998 wurde CD83 in der Maus identifiziert [58]. Das CD83-Gen besteht aus fünf Exons und ist beim Menschen auf Chromosom 6 [59] und bei der Maus auf Chromosom 13 lokalisiert [58]. Das murine CD83-Gen kodiert für 196 AS. Von diesen 196 AS bilden 21 AS ein Signalpeptid und 175 AS das reife CD83-Protein (Abb. 1.2).

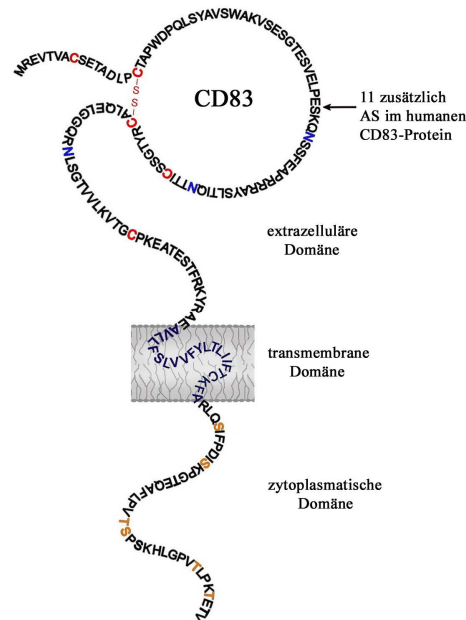


Abb. 1.2: Aminosäuresequenz des murinen CD83. Das reife murine CD83-Protein besteht aus 175 AS. Die in der extrazellulären Domäne rot markierten AS heben die Cysteine (Cys) hervor. Durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁶ und Cys⁷⁷ könnte eine zur variablen Domäne des Ig homologe Domäne ausgebildet werden. Die in der extrazellulären Domäne blau markierten AS zeigen die hypothetisch N-verknüpften Glykosylierungsstellen. Die orange gefärbten AS in der zytoplasmatischen Domäne zeigen die zwischen humanem und murinem CD83 konservierten Serin- und Threoninreste. Die extrazelluläre Domäne des humanen CD83-Proteins enthält 11 zusätzliche AS.

Das reife Protein besteht aus einer extrazellulären Ig-ähnlichen, einer kurzen transmembranen und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. In der Literatur sind heterogene Schätzungen zur Länge der zytoplasmatischen Domäne zu finden. Die Längenangaben schwanken zwischen 39 [58], 40 [56] und 42 AS [57].

Die extrazelluläre Domäne des humanen CD83-Proteins enthält 11 zusätzliche AS, so dass das Protein nach Abspaltung der Signalsequenz eine Länge von 186 AS aufweist [56, 58]. Vergleicht man die AS-Sequenzen von murinem und humanem CD83, ergibt sich eine Identität der AS von 63 % [56-58]. Die Identifizierung von CD83-Homologen, nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei Vögeln [60], Knochen- und Knorpelfischen [61, 62], zeigt die Konservierung dieses Proteins über 450 Millionen Jahre der Vertebratenevolution.

Die AS-Sequenz des CD83-Proteins zeigt eine starke Sequenzhomologie mit Proteinen der Ig-Superfamilie [56, 57]. Zwei (Cys¹⁶ und Cys⁷⁷) der insgesamt fünf in der extrazellulären Domäne lokalisierten Cysteinreste ermöglichen die Ausbildung einer Ig-Domäne (Abb. 1.2). CD83 wurde deshalb der Ig-Superfamilie zugeordnet.

CD83 hat drei potentielle Glykosylierungsstellen (Abb. 1.2). Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass post-translationale Modifikationen zu einer starken Glykosylierung der extrazellulären Domäne des CD83-Proteins führen [56, 57, 63]. Das Molekulargewicht des reifen CD83-Proteins liegt zwischen 40 kDa und 55 kDa [56], das des deglykosylierten CD83-Proteins bei ungefähr 20 kDa.

CD83 wird stark auf aktivierten murinen [63] und humanen [64] DCs exprimiert. CD83 galt deshalb lange als hochspezifischer Reifungsmarker für DCs. Dieses Bild hat sich in den vergangenen Jahren gewandelt, da CD83 *in vitro* und *in vivo* auch auf der Oberfläche vieler anderer Zellen detektiert wurde. Neben verschiedenen B- und T-Zelllinien exprimieren naive B-Lymphozyten [65], aktivierte T- und B-Lymphozyten [56, 66], aktivierte humane Alveolarmakrophagen [67], aktivierte humane Neutrophile [68, 69] und eine durch IL-18-induzierte Gruppe so genannter Helfer-NK-Zellen [70] CD83 auf ihrer Zelloberfläche. Auf einer Subpopulation CD2⁺ CD14⁺ Monozyten wurde CD83 nach IFN- γ Stimulation induziert [71]. Darüber hinaus wird CD83 auf thymischen Epithelzellen (*thymic epithelial cells*, TECs) [72] und bislang uncharakterisiertem Gewebe im Gehirn [57, 58] exprimiert.

In Monozyten, Makrophagen, unreifen und reifen DCs liegt CD83 intrazellulär konstitutiv vorgeformt vor [73]. Für unreife humane DCs wurde gezeigt, dass CD83 in perinukleären

Regionen im Zytosol gespeichert wird. Erst nach Aktivierung erfolgt der Transport des CD83-Proteins an die Zelloberfläche [74]. Auch bei humanen Monozyten und Makophagen wurden intrazelluläre CD83-Speicher nachgewiesen [73, 75]. Bei ruhenden Milz- und B-Zellen konnte hingegen kein CD83 im Zytosol detektiert werden [76], was dafür spricht, dass das auf aktivierten B-Zellen exprimierte CD83 durch *de novo* Proteinsynthese entsteht.

Der Ligand für CD83 ist bislang nicht identifiziert. Diverse Studien zeigen Evidenzen für einen CD83 Liganden (CD83L) auf TECs [72], auf humanen DCs [77], Monozyten [78] und CD8⁺ T-Zellen [78, 79], sowie auf murinen B2-Zellen [80].

1.4.2 Funktion von CD83

1.4.2.1 Einfluss von CD83 auf die T-Zell-Entwicklung

Untersuchungen mit CD83-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass CD83 eine zentrale Funktion bei der Entstehung CD4⁺ T-Zellen im Thymus hat [72, 81]. Die fehlende Expression von CD83 auf TECs führt bei CD83^{-/-} Mäusen zu einer dramatisch reduzierten Frequenz einfach CD4⁺ Thymozyten und zu einer um bis zu 90 % reduzierten Anzahl CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie. CD83mu Mäuse, die eine Punktmutation im CD83 Strukturgen tragen, weisen eine solch dramatische Reduktion der CD83-Expression auf Proteinebene auf, dass die Analyse von Zelllysaten im Western Blot kein CD83-Protein nachweisen lässt [65]. Das lymphoide Kompartiment dieser CD83mu Mäuse weist ähnlich geringe Frequenzen CD4⁺ T-Zellen auf. Die Reifung CD4⁺ T-Zellen in CD83mu Mäusen konnte durch die transgene Expression von CD83 regeneriert werden [81] und der Transfer von CD83^{-/-} Knochenmark in letal bestrahlte Wildtyp Mäuse führte zu normalen Frequenzen CD4⁺ T-Zellen [72]. Diese Experimente und die Tatsache, dass das Fehlen von CD83 weder bei CD83^{-/-} noch bei CD83mu Mäusen einen Einfluss auf die Frequenz und Funktion CD8⁺ T-Zellen hat [72, 81, 82], zeigen, dass die Expression von CD83 auf TECs essentiell für die Entstehung CD4⁺ T-Zellen ist.

Die wenigen CD4⁺ T-Zellen, die in der CD83mu Umgebung heranreifen, weisen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen, die sich in einer Wildtyp Umgebung entwickeln, einen veränderten Phänotyp auf. Nach allogener Stimulation *in vitro* zeigen CD83mu CD4⁺ T-Zellen durch die Expression von CD69 zwar einen aktivierten Phänotyp, proliferieren aber nicht. Auch das Zytokinsekretionsmuster ist verändert [81]. *In vivo* führt

das Fehlen von CD83 zu einer „verzögerten Hypersensitivitätsreaktion“ (*delayed type hypersensitivity*, DTH) vom Typ IV [72, 81], die durch die Reaktion von T-Zellen vermittelt wird. Daten, die mit CD83Igtg Mäusen erhoben wurden, unterstützen ebenfalls die zentrale Rolle von CD83 bei der Entstehung CD4⁺ T-Zellen. CD83Igtg Mäuse exprimieren CD83Ig unter der Kontrolle des MHC-II Promotors. Das Fusionsprotein wird in das Serum und in den extrazellulären Raum sezerniert. In diesen Mäusen entwickeln sich zwar normale Frequenzen CD4⁺ T-Zellen, diese sind allerdings, ähnlich wie die CD4⁺ T-Zellen CD83-defizienter Mäuse, in ihrer Funktionalität stark eingeschränkt [82].

1.4.2.2 Einfluss von CD83 auf die periphere T-Zell-Antwort

Die Applikation löslicher CD83-Varianten *in vitro* und *in vivo* erbrachte Hinweise auch auf eine mögliche biologische Funktion von CD83 bei der Regulation peripherer T-Zell-Antworten. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Gabe der rekombinant exprimierten, löslichen (*soluble*, s) extrazellulären Domäne von CD83 *in vitro* und *in vivo* einen immunsuppressiven Effekt ausübt. *In vivo* wurde zum Beispiel durch die dreimalige Applikation von sCD83 der Ausbruch der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, die als Modell für das frühe entzündliche Stadium der humanen Multiplen Sklerose gilt, verhindert [83]. Weniger eindeutige Ergebnisse erzielte der Einsatz des CD83Ig Fusionsproteins. So sind einerseits immunsuppressive Effekte von CD83Ig auf die Tumorabwehr [84] und für das Überleben von Allotransplantaten [85] beschrieben, andererseits wurden aber nur leichte oder gar keine suppressiven Effekte auf die T-Zell-Stimulation *in vitro* nachgewiesen [86]. Welche Rolle natürlich produziertes sCD83 im Serum gesunder Spender hat, warum die Serumkonzentration an sCD83 bei verschiedenen malignen oder rheumatoiden Erkrankungen [87] und viralen Infektionen [88] erhöht ist und ob lösliche CD83-Spezies tatsächlich einen immunsuppressiven Effekt ausüben, wird gegenwärtig kontrovers diskutiert [89].

1.4.2.3 Kostimulatorische Rolle von CD83 auf APCs

Verschiedene Befunde sprechen dafür, dass es sich bei CD83 um ein weiteres kostimulatorisches Molekül professioneller antigenpräsentierender Zellen (APCs) handelt. So wird auch CD83, neben den klassischen kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, verstärkt auf aktivierten humanen und murinen DCs exprimiert [63, 64].

Verschiedene Viren, wie das Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1), das Vaccinia oder das Pocken Virus, interferieren mit der Expression von CD83 [90-92]. Das HSV-1 induziert zum Beispiel die lysosomale Degradation von CD83 in der infizierten Zelle und vermindert auf diese Weise deren Kapazität, T-Zellen zu stimulieren [92]. Weitere Hinweise dafür, dass CD83 eine kostimulatorische Funktion ausübt, erbrachten Studien im humanen System. Humane DCs, deren CD83-Expressionslevel durch die Transfektion mit kleinen interferierenden RNAs reduziert wird, zeigen ein vermindertes kostimulatorisches Potential, wohingegen die Transfektion der DCs mit CD83-mRNA zu einer gesteigerten Expression von CD83 und einer erhöhten stimulatorischen Kapazität führt [93, 94]. Eine andere Studie zeigte, dass es nur dann zur Aktivierung und Expansion Ag-spezifischer zytotoxischer T-Zellen kommt, wenn die als APCs verwendeten Tumorzellen (K562/HLA-A0201) neben CD80 auch CD83 exprimieren [79].

Hinweise, dass CD83 auch im murinen System kostimulatorisch wirkt, erbrachten Versuche mit einer Melanom-Zelllinie, die künstlich verstärkt CD83 exprimiert [95]. *In vivo* wurde eine gesteigerte T-Zell-vermittelte Tumorabstoßung beobachtet, die durch die Gabe von CD83Ig wieder erlosch [95]. Im Widerspruch zu diesen Befunden steht jedoch die Tatsache, dass CD83-defiziente und CD83tg Knochenmark-DCs eine vergleichbare Kapazität aufweisen, allogene T-Zellen zu stimulieren, obwohl die einen eine verstärkte und die anderen eine verminderte CD83-Expressionsintensität aufweisen [72, 96]. Dieses Resultat schließt eine kostimulatorische Rolle für CD83 nahezu aus und scheint unvereinbar mit den vorher genannten Resultaten.

1.4.2.4 Einfluss von CD83 auf B-Lymphozyten

Auch die B-Zell-Funktion wird durch CD83 beeinflusst. Bereits unreife murine B-Zellen jenseits des prä-B-Zell-Stadiums zeigen eine schwache CD83-Oberflächenexpression [65]. Die Aktivierung der B-Zelle durch TLR- oder BCR-Engagement führt zu einer verstärkten Expression von CD83 auf der Zelloberfläche, wobei die maximale CD83-Expression nach 6 h erreicht ist [76]. In unserer Arbeitsgruppe gewonnene Daten zeigen erstmals, dass B-Zellen in verschiedenen Infektionssystemen (*Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*) die dominante CD83⁺ Zellpopulation darstellen [97]. Untersuchungen mit CD83tg Mäusen ergaben, dass die Überexpression von CD83 mit der Produktion von Immunglobulinen gegen Modell-Ag und Infektionen interferiert [97]. Untersuchungen mit Mäusen, deren B-Zellen verschiedene CD83-Expressionsintensitäten aufweisen, zeigten, dass auch die

B-Zell-Entwicklung durch die Expression von CD83 beeinflusst wird. Die Überexpression von CD83 auf reifenden B-Zellen führt zu einer Anhäufung unreifer transitioneller B-Zellen in der Milz und zu einer reziproken Reduktion reifer, follikulärer B-Zellen [65]. Fehlt CD83, kommt es zu einer verminderten Reifung von Marginalzonen B-Zellen [65]. Auch beeinflusst CD83 die B-Zell-Homöostase. Im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen zeigen CD83tg B-Zellen in der Peripherie einen Selektionsnachteil, CD83mu B-Zellen hingegen einen leichten Selektionsvorteil [65].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

CD83 hat eine zentrale Funktion bei der Reifung CD4⁺ T-Zellen im Thymus [72, 81]. Ob CD83, das verstärkt auf aktivierten APCs exprimiert wird, auch eine kostimulatorische Rolle bei der peripheren T-Zell-Aktivierung hat, ist unklar. Manche Studien zeigen, dass die Expression von CD83 auf APCs einen kostimulatorischen Effekt auf die Aktivierung von T-Zellen ausübt [93-95]. Andere Studien hingegen können keinen kostimulatorischen Einfluss von CD83 nachweisen [72, 96]. In dieser Arbeit sollte durch den Vergleich der kostimulatorischen Kapazität von CD83-überexprimierenden und CD83-defizienten APCs geklärt werden, ob CD83 einen kostimulatorischen Rezeptor für T-Zellen darstellt.

Verschiedene Befunde weisen daraufhin, dass CD83 auch die Funktion muriner B-Zellen beeinflusst. So wird CD83 *in vitro* [76] und *in vivo* [97] verstärkt auf aktivierten B-Zellen exprimiert. Darüber hinaus wurde in unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt, dass B-Zellen in verschiedenen Infektionssystemen (*Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*) die dominante CD83⁺ Zellpopulation darstellen und dass die Überexpression von CD83 in CD83tg Mäusen mit der Ig-Antwort gegen Modell-Ag und Infektionen interferiert [97]. Ob CD83 auch *in vitro* einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung und Funktion muriner B-Lymphozyten ausübt, sollte in dieser Arbeit durch Studien mit Mäusen, die CD83 verstärkt beziehungsweise vermindert exprimieren, genauer analysiert werden. Um die Ig-Antwort CD83-defizienter Mäusen auch *in vivo* untersuchen zu können, sollten Knochenmarkchimären hergestellt werden. Durch das Fehlen von CD83 auf TECs weisen CD83mu Mäuse eine stark reduzierte Frequenz CD4⁺ T-Zellen auf [81]. Nur der Transfer von CD83mu Knochenmark in Wildtyp Mäuse führt zu einer normalen Reifung CD83mu CD4⁺ T-Zellen an Wildtyp TECs und ermöglicht vergleichende Analysen mit anderen Mausstämmen *in vivo*.

Um jenseits des CD83-defizienten und CD83-transgenen Systems die Rolle von CD83 auf die B-Zell-Aktivierung *in vivo* zu untersuchen, sollte in Wildtyp Mäusen natürlicherweise exprimiertes CD83 während einer Modell-Ag-Immunisierung durch den Einsatz eines anti-CD83 mAk engagiert werden. Die Folgen dieses Engagements für die Qualität und Quantität der Ig-Antwort sollten analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
β-Szintillationszähler „1450 Microbeta“	PerkinElmer/Wallac, Freiburg
CO ₂ -Inkubator (Brutschrank)	Thermo Electron LED, Langenselbold
Elektronisch programmierbare Pipette	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Reader (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin
FACSCalibur, Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Software Cell Quest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluorimeter (Hitachi F-2000)	Hitachi Colora Messtechnik, Lorch
Fluorimeter-Küvette	Hitachi Colora Messtechnik, Lorch
Gamma-Bestrahlungsanlage (OB29/4)	STS GmbH, Braunschweig
Kühl- und Gefrieranlage	Liebherr-Hausgeräte, Rostock
Lichtmikroskop	Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Thermo Electron LED, Langenselbold
MidiMACS-Zellseparationssystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brandt, Wertheim
Rührstrudler	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilwerkbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer „Schüttelgerät“	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungsanlage	SG Clear, Barsbüttel
Zellerntegerät „Microcell Harvester“	Inotech, Reppischhof, Schweiz

Zentrifugen:

Megafuge 2,0R

Heraeus-Sepatech, Hanau

Eppendorfszentrifuge 5415D

Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikmaterialien)

Alle mit * versehenen Waren wurden steril bezogen

Chirurgische Einmal-Skalpelle*

Braun, Melsungen

EDTA-Röhrchen

Kabe Labortechnik, Nümbrecht-
Elsenroth

ELISA 96-Loch Platten

Greiner bio-one, Frickenhausen

FACS Röhrchen (5 mL Polystyren)

Sarstedt, Nümbrecht

Handschuhe

Paul Hartmann AG, Heidenheim

Kanülen*

Braun, Melsungen

MACS-Separationssäulen LS*

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm²)

Brandt, Wertheim

Parafilm

Pechiney Plastic Packaging, Inc.,
Wisconsin, USA

Petrischalen (100 x 200 mm)*

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen

Greiner bio-one, Frickenhausen;
Sarstedt, Nümbrecht

Platten für Proteinbestimmung (96-Loch)

Greiner bio-one, Frickenhausen

Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL)

Sarstedt, Nümbrecht

Safelock-Reaktionsgefäße (1,5 mL)

Eppendorf, Hamburg

Schottflaschen

Schütt Labortechnik, Göttingen

Spritzen (1, 5 und 10 mL)*

Braun, Melsungen

Sterilfilter (Porengröße 0,22 und 0,45 µm)*

Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten (5, 10 und 25 mL)*

Greiner bio-one, Frickenhausen

Zellkulturplatten (96-, 24-, 6-Loch)*

Greiner bio-one, Frickenhausen

Zellsiebe "Cell Strainer" (70 µm)*

Becton Dickinson, Heidelberg

Zentrifugenröhrchen (15 und 50 mL)

Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.3.1 Biochemische Arbeiten

Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinitrophenol (DNP)	Sigma, Deisenhofen
Nitroiodophenol-BSA (NIP-BSA)	Biosearch Technologies Inc., Navato, USA
Streptavidin-HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

ELISA-Kits:

IL-2, IL-10 und IFN- γ wurden im Überstand *in vitro* kultivierter Zellen mit Hilfe des DuoSet[®] ELISA Development Kits (R&D Systems, Wiesbaden) quantifiziert.

2.1.3.2 Zellbiologische Arbeiten

Annexin V	BD Pharmingen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Cell Viability Solution (7-AAD)	BD Pharmingen, Heidelberg
Dulbecco's PBS	PAN-Biotech, Frankfurt
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM)	Calbiochem, Bad Soden
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
HEPES	PAA, Linz, Österreich
³ H-Thymidin (1 μ Ci/mL)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

IL-4	Biomol, Hamburg
Incidin Liquid	Ecolab, Düsseldorf
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Lipopolysaccharid (LPS; <i>E. coli</i> 055: B5)	Sigma, Deisenhofen
Mausserum	Sigma, Deisenhofen
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Streptavidin-Alexa-488	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Streptavidin-APC	BD Pharmingen, Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

Kits:

<i>Pan T cell isolation kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>B cell isolation kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

Aluminiumhydroxid (Alum)	Sigma, Deisenhofen
Antibiotikum (Baytril 2,5 %)	Bayer AG, Leverkusen
ChromPure Ratten IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, GB
2,4-Dinitrophenol (DNP)	Sigma, Deisenhofen
Diphtherie Toxin (DT)	Sigma, Deisenhofen
Freud's Adjuvant (komplett, inkomplett)	Sigma, Deisenhofen
<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (KLH)	Sigma, Deisenhofen
4-Hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetyl (NIP)-Ficoll	Biosearch Technologies, Novato, USA

2.1.4 Antikörper

B-Zell-Stimulation:

Hamster anti-Maus CD40 (HM40-3)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus Ig κ (187.1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus Ig κ (RMK00)	CALTAG, Burlingame, USA

T-Zell-Stimulation:

Hamster anti-Maus CD3 (1452C11)	Hybridomüberstand, BNI
---------------------------------	------------------------

ELISA:

Kaninchen anti-Maus Ig (polyklonal; Z0259)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchen anti-Maus Ig-HRP (P0260)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Maus anti-Maus IgMa-Biotin (DS-1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus IgM-HRP	Zymed, Karlsruhe
Ratte anti-Maus IgG1-HRP	Zymed, Karlsruhe
Ratte anti-Maus IgG2b-HRP (LO-MG2b)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-Maus IgG3-HRP (LO-MG3)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ziege anti-Ratte IgG-HRP	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, GB

FACS:

Ratte anti-Maus CD4-APC (CT-CD4)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD4-PE/-APC (RM4-5)	BD Pharmingen, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD11c-PE (HL-3)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD19-FITC/-PE/-APC (1D3)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD40-FITC (3/23)	BD Pharmingen, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD69-PE (H1.2F3)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD80-PE (RMMP-1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD83-FITC/-Biotin (Michel 19)	BNI, Hamburg
Ratte anti-Maus CD86-FITC (RMMP-2)	Serotec, Düsseldorf
Ratte anti-Maus CD86-PE (GL1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD86-Biotin (PO3)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus anti-Maus IgMa-FITC/-Biotin (DS-1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus anti-Maus IgMb-Biotin (AF6-78)	BD Pharmingen, Heidelberg

Maus anti-Maus MHC-I-FITC/-Biotin (AF6-88.5)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus MHC-II-FITC/-PE (M5/114.15.2)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus MHC-II-Biotin (2G9)	BD Pharmingen
Ziege anti-Maus IgM-Cy5	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, GB

Isotypkontrollen:

Hamster IgG1-PE (G235 2356)	BD, Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG1-Biotin (MOPC-31C)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG1-FITC/-PE (R3-34)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a-FITC/-PE/-APC (R35-95)	BD Pharmingen, Heidelberg

Neutralisation:

Ratte anti-Maus IL-10 (JES5-16E3)	BD Pharmingen, Heidelberg
-----------------------------------	---------------------------

2.1.5 Peptide und Proteine

OVA-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ , HPLC-gereinigt (ISQAVHAAHAENEAGR)	JPT Peptide Technologies, Berlin
OVA-Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ , HPLC-gereinigt (SIINFEKL)	MWG Biotech, Ebersberg
Ovalbumin (OVA)-Protein	Sigma, Deisenhofen
Hühner-Eiweiß-Lysozym (HEL)	Sigma, Deisenhofen
murines CD83Ig (mCD83Ig) (Fusionsmolekül aus der extrazellulären Domäne des murinen CD83-Moleküls und dem Fc-Fragment des humanen IgG1)	BNI, Hamburg

2.1.6 Mausstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
C57BL/6J	H-2 ^b	UKE, Hamburg
C57BL/6J-IgH ^a -CD90.1	H-2 ^b ; transgene Maus, trägt das IgH ^a - und Thy1 ^a -Gen der Balb/c Maus [98, 99]	BNI, Hamburg
Balb/c	H-2 ^d	UKE, Hamburg
OT-II	H-2 ^b ; TCR-transgene Maus; TCR erkennt den Komplex aus I-A ^b und dem OVA-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ [100]	UKE, Hamburg
CD83tg	H-2 ^b ; transgene Maus; exprimiert unter der Kontrolle des MHC-I Promotors membranständiges CD83 [76, 96, 97, 101]	UKE, Hamburg
CD83mu	H-2 ^b ; durch Supermutagenese (N-ethyl-N-nitrosourea) generierte CD83mu Maus; Mutation im CD83 Stoppcodon führt zur Verlängerung des CD83-Proteins um 55 AS [81]	BNI, Hamburg Genehmigt durch die Mouse Genetics Cologne Stiftung, München
JHT	H-2 ^b ; B-Zell-defiziente Maus; Blockade der B-Zell-Differenzierung im Knochenmark [102]	BNI, Hamburg
GFPCD11cDTRtg	H-2 ^b ; transgene Maus; exprimiert unter der Kontrolle des CD11c Promotors den DT-Rezeptor; Gabe von DT führt zur Depletion aller CD11c ⁺ Zellen [103]	Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin

Tabelle 2.1: Verwendete Mauslinien

2.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). Fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 min bei 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.7.1 Biochemische Arbeiten

ELISA-Beschichtungspuffer:

Lösung A: 10 mM Na₂CO₃

Lösung B: 20 mM NaHCO₃

Lösungen werden bis zum Erreichen von pH 9,6 gemischt.

ELISA-Blockpuffer:

1xPBS mit 1 % BSA (w/v)

ELISA-Stopplösung:

2 M H₂SO₄

ELISA-Substratpuffer:	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 5,5
ELISA-Substratlösung:	12 mL ELISA-Substratpuffer 200 μL ELISA-TMB-Lösung 1,2 μL 30 % H_2O_2
ELISA-TMB-Lösung:	30 mg Tetramethylbenzidin (TMB) 5 mL Dimethylsulfoxid (DMSO)
ELISA-Waschpuffer:	1xPBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

2.1.7.2 Zellbiologische Arbeiten

Annexin-V-Bindungspuffer:	0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4) 1,4 M NaCl 25 mM CaCl_2 Aqua dest
Ca^{2+} -Messpuffer:	140 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgSO_4 1 mM CaCl_2 20 mM HEPES 1 mM NaH_2PO_4 5,5 mM Glucose → auf pH 7,4 einstellen
CFSE-Stammlösung:	5 mM in DMSO
EGTA/Tris	400 mM EGTA 3 M Tris → auf pH 7,4 einstellen

Erythrozytenlysepuffer:	10 % (v/v) 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 90 % (v/v) 0,16 M NH_4Cl
FACS-Puffer:	1xPBS mit 1 % FCS und 0,1 % Natriumazid (NaN_3)
FACS-Zellfixierer (PFA)	1xPBS mit 1 % Paraformaldehyd
MACS-Puffer	1xPBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA
PBS (20x)	32 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 5,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 164 g NaCl ad 1 l H_2O für 1xPBS ergibt sich hiermit pH 7,2
RPMI/10 % FCS	500 mL RPMI 1640 50 mL FCS 10 mL 1 M HEPES 10 mL 200 mM L-Glutamin 2,5 mL 10 mg/mL Gentamycin
Trypanblau-Lösung:	2 mg Trypanblau in 100 mL 1xPBS

2.2 Methoden

2.2.1 Biochemische Methoden

2.2.1.1 ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-2, IL-10, IFN- γ) im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durch den Einsatz zweier hochspezifischer Antikörper (Ak), die je an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Zuerst wurde eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte mit einem Ak gewünschter Spezifität beschichtet. Hierfür wurden je 50 μ L anti-IL-2, anti-IL-10 beziehungsweise antiIFN- γ (je 1:180 DuoSet[®] ELISA-Kit; R&D Systems) Ak in ELISA-Beschichtungspuffer pro Ansatz aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Ak durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt und freie Oberflächenbindungsstellen mit 100 μ L ELISA-Blockpuffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Nach Entfernen des ELISA-Blockpuffers wurden je 50 μ L der verdünnten oder unverdünnten Zellkulturüberstände (Dreifachwerte), sowie Doppelwerte der jeweiligen Konzentration eines Zytokinstandards pipettiert. Die Bindung des Antigens an den immobilisierten Ak erfolgte über Nacht bei 4 °C. Für den Nachweis des gebundenen Antigens wurden biotinylierte Sekundäreantikörper verwendet. Für diesen zweiten Bindungsschritt wurden die Platten nach dem Waschen mit 50 μ L des jeweiligen Biotin-Ak in PBS/0,1 % BSA für eine Stunde bei RT inkubiert (anti-IL-2-, anti-IL-10- und anti-IFN- γ -Biotin je 1:180 DuoSet[®] ELISA-Kit; R&D Systems). Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer erfolgte die Bindung eines Streptavidin-HRP-Konjugats (*horse radish peroxidase*, HRP). Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/0,1 % BSA und einem Volumen von 50 μ L eingesetzt. Die Bindung erfolgte über eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 μ L ELISA-TMB-Substratlösung pipettiert und die Reaktion, nach Erreichen einer ausreichenden Färbung, durch Zugabe von 25 μ L ELISA-Stopplösung gestoppt. Die Detektion erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm, und die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.1.2 ELISA zum Nachweis von gesamt-Ig im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von polyklonalem Ig erfolgte im Zellkulturüberstand von Milzzellen oder gereinigten B-Zellen, die 7 Tage mit LPS stimuliert wurden. Der Primärantikörper (Kaninchen anti-Maus Ig, unkonjugiert; DAKO: Z0259) wurde 1:2000 in ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt in einem Volumen von 50 µL auf eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte aufgebracht und an diese über Nacht bei 4 °C adsorbiert. Nach einem Wasch- und Blockierungsschritt wurden je 50 µL Zellkulturüberstände in serieller Verdünnung (1:4 bis 1:2048 in PBS/0,1 % BSA) und Medium zur Kontrolle des Plattenhintergrunds aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Sekundärantikörper (HRP-konjugiertes Kaninchen anti-Maus Ig; DAKO: Z0260) 1:2000 in PBS/0,1 % BSA für 1 h bei RT auf der Platte inkubiert (Wasch-, Blockier- und Entwicklungsschritte siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die Menge an gesamt-Ig wurde als relative ELISA Einheit (*relative ELISA unit*, REU) dargestellt und ergibt sich aus $OD_{450\text{ nm}} \text{ Probe} : OD_{450\text{ nm}} \text{ Medium}$.

2.2.1.3 ELISA zum Nachweis von HEL-spezifischem Ig im Zellkulturüberstand oder Serum

Zum Nachweis von HEL-spezifischem Ig im Serum beziehungsweise im Überstand LPS-stimulierter C57BL/6 x IgHELtg und CD83tg x IgHELtg Milzzellen wurde HEL in Beschichtungspuffer (1 µg/mL) in einem Volumen von 50 µL auf eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wasch- und Blockierungsschritt wurden Seren oder Zellkulturüberstände in serieller Verdünnung (1:100 bis 1:102400, beziehungsweise 1:10 bis 1:320) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Nachweis von HEL-spezifischem Ig erfolgte durch die Inkubation mit biotinyliertem Ratte anti-Maus IgM^a (2 µg/ml in PBS/0,1 % BSA) für 1 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Bindung eines Streptavidin-HRP-Konjugats. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/0,1 % BSA und einem Volumen von 50 µL eingesetzt. Die Bindung erfolgte über 1 h bei RT (Wasch-, Blockier- und Entwicklungsschritte siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die Menge an HEL-Ig im Kulturüberstand wurde als REU dargestellt und ergibt sich aus $OD_{450\text{ nm}} \text{ Probe} : OD_{450\text{ nm}} \text{ Medium}$. Der Serum Ig-Titer ergab sich aus der Serum-Verdünnung, die bei $OD_{450\text{ nm}}$ über dem doppelten Plattenhintergrund lag.

2.2.1.4 ELISA zum Nachweis von OVA- oder NIP-spezifischem Ig im Serum

Zum Nachweis von OVA- oder NIP-spezifischem Ig im Serum wurde NIP-BSA oder OVA-Protein (je 1 µg/mL in ELISA-Beschichtungspuffer) in einem Volumen von 50 µL auf eine 96-Loch ELISA-Platte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wasch- und Blockierungsschritt wurden Duplikate seriell verdünnter Seren (1:100 bis 1:102400) und PBS/0,1 % BSA zur Kontrolle des Plattenhintergrunds in einem Volumen von 50 µL aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte der Nachweis des Ag-spezifischen Ig durch die Inkubation mit 50 µL HRP-konjugiertem anti-Maus IgM, IgG1, IgG3 oder IgG2b (1:1000 in PBS/0,1 % BSA) für 1 h bei RT (Wasch-, Blockier- und Entwicklungsschritte siehe Abschnitt 2.2.1.1). Der Ig-Titer ergab sich aus der Serum-Verdünnung, die bei OD_{450 nm} über dem doppelten Plattenhintergrund lag.

2.2.1.5 ELISA zum Nachweis von anti-CD83 mAk im Serum

Zum Nachweis von anti-CD83 mAk im Serum wurde murines CD83Ig (1 µg/mL in ELISA-Beschichtungspuffer) in einem Volumen von 50 µL auf eine 96-Loch ELISA-Platte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wasch- und Blockierungsschritt wurden Duplikate seriell verdünnter Seren (1:50 bis 1:25600) und Duplikate des als Standard verwendeten anti-CD83 mAk mit einer Anfangskonzentration von 10 ng/mL auf die ELISA-Platte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion des anti-CD83 mAk im Serum erfolgte durch die Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-Ratte IgG (1:20000 in PBS/0,1 % BSA) für 1 h bei RT (Wasch-, Blockier- und Entwicklungsschritte siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die Menge an anti-CD83 mAk im Serum wurde mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Wichtige Grundsätze der Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit Zellkulturen wurden in der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dabei wurden sterilisierte Glaswaren und Lösungen sowie sterile Einmal-Plastikwaren verwendet, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu verhindern. Materialien und Lösungen wurden dazu in feuchter Hitze (134 °C) und bei

2,0-2,2 bar Druck über 20 min autoklaviert. Glasmaterial wurde über drei Stunden bei 180 °C sterilisiert. Die Kultivierung und Stimulation von Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C unter 5 %-iger CO₂-Begasung. Wasch- und Pelletierschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, für 5 min bei 300 x g und 4 °C.

2.2.2.2 Präparation muriner Milzzellen

Die Milz einer Maus wurde steril präpariert und in einer Petrischale mit 10 mL Vollmedium mit dem Stempel einer 5 mL-Einmalspritze zerrieben. Um nicht zerriebenes Gewebe abzutrennen, wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (70 µm) gegeben. Die Zellen wurden pelletiert und anschließend zur Lyse der Erythrozyten in 10 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Lyse mit Zellkulturmedium gestoppt, die Zellen dreimal in RPMI/10 % FCS gewaschen, in RPMI/10 % FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.3 Präparation muriner Knochenmarkzellen

Ober- und Unterschenkel einer Maus wurden präpariert. Anschließend wurde der Knochenkanal beidseitig geöffnet und das Knochenmark mit kaltem RPMI-Medium ohne FCS herausgespült. Für den Oberschenkel wurde eine 23G, für den Unterschenkel eine 27G Kanüle verwendet. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das pelletierte Knochenmark in 10 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Der Lysevorgang wurde durch die Zugabe von 20 mL sterilem PBS gestoppt. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit sterilem PBS. Knochensplitter wurden entfernt, indem die Knochenmarkzellen über ein Zellsieb (70 µm) gegeben wurden.

2.2.2.4 Präparation muriner peripherer Blutzellen

Durch Punktion der Schwanzvene wurde Mäusen ca. 20 µL Blut entnommen und direkt in einem EDTA-beschichteten Röhrchen gesammelt, um eine Agglutination zu verhindern. 3 mL Erythrozytenlysepuffer wurden in einem FACS-Röhrchen vorgelegt und das Blut gut darin gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen pelletiert, drei Mal in RPMI/10 % FCS gewaschen und in RPMI/10 % FCS resuspendiert.

2.2.2.5 Präparation muriner Lymphknotenzellen

Der Lymphknoten einer Maus wurde präpariert und mit dem Stempel einer 5 mL-Einmalspritze in einem mit RPMI/10 % FCS benetzten Zellsieb (70 µm) zerrieben. Nach gründlichem Spülen des Zellsiebs mit RPMI/10 % FCS wurden die Zellen pelletiert, in RPMI/10 % FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität wurde Trypanblau verwendet. Trypanblau dringt nur durch die poröse Zellmembran toter Zellen und färbt diese tiefblau. Lebende Zellen hingegen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Da Trypanblau zytotoxisch ist, muss die Beobachtung unmittelbar nach der Farbstoffzugabe durchgeführt werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer mit definiertem Kammervolumen. Dazu wurden 20 µL Zellsuspension mit 80 µL Trypanblau gemischt und dieses Gemisch auf die mit einem Deckglas bedeckte Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl/mL ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor (10^4) und Verdünnungsfaktor (1:5).

2.2.2.7 Anreicherung von B- und T-Zellen aus Milzzellpräparationen

Die Isolation von B-Zellen und T-Zellen aus einer Milzzellsuspension erfolgte mit Hilfe des B-Zell- beziehungsweise Pan T-Zell-Isolierungs-Kits (Miltenyi). Bei dieser Methode werden alle nicht-B- beziehungsweise nicht-T-Zellen durch spezifische Biotin-gekoppelte Ak markiert. Durch anti-Biotin Ak, die an magnetische Beads gekoppelt sind, können die so markierten Zellen anschließend mit Hilfe eines Magneten eliminiert werden.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Reagenzien durchgeführt. Das Zellpellet einer Milz (ca. 1×10^8 Zellen) wurde in 400 µL MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 µL Biotin-Ak Cocktail hinzugegeben und der Ansatz bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 300 µL MACS-Puffer und 200 µL Anti-Biotin Micro Beads wurden die Zellen erneut für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 15 mL MACS-Puffer wurde das Zellpellet in 1 mL MACS-Puffer resuspendiert und auf eine vorgekühlte, mit 3 mL MACS-Puffer äquilibrierte und an einen Magneten gekoppelte LS-Säule pipettiert. Der Durchlauf, der die B- beziehungsweise T-Zellen enthielt, wurde aufgefangen. Die Säule wurde vier Mal mit

3 mL MACS-Puffer gespült und auch dieser Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert in RPMI/10 % FCS gewaschen und resuspendiert. Die Reinheit der B- oder T-Zellen wurde durch spezifische FACS-Färbungen analysiert und betrug zwischen 80 und 98 %.

2.2.2.8 Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bei gereinigten B- oder T-Zellen von Wildtyp und CD83tg Mäusen erfolgte ratiometrisch mit Hilfe des Ca^{2+} -spezifischen Fluoreszenzindikators Fura-2 an einem digitalen Imaging-System. Die Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 sind abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration. So nimmt die Intensität des emittierten Lichts bei 495 nm nach Anregung bei 340 nm mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zu, während die Intensität des emittierten Lichtes bei 495 nm nach Anregung mit 380 nm mit steigender Ca^{2+} -Konzentration abnimmt. Zur quantitativen Beurteilung der Ca^{2+} -Konzentration wird das Verhältnis der Intensitäten der Emission nach Anregung bei 340 nm und nach Anregung bei 380 nm gebildet (Ratio = $I_{340}:I_{380}$). Fura-2 ist aufgrund seiner Größe und Polarität nicht membrangängig. Nur die modifizierte Form Fura-2-AM kann die Zellmembran passieren. Bei Fura-2-AM sind die Carboxylgruppen durch Acetoxymethylestergruppen (AM) geschützt so dass es passiv durch Diffusion, in die Zelle gelangen kann. Fura-2-AM wird durch zytosolische Esterasen zu Fura-2 freier Säure gespalten. Dieses ist aufgrund entschützter Säuregruppen negativ geladen, kann die Membran nicht mehr durchdringen und verbleibt im Zytosol der Zelle. Für die Beladung der Zellen mit Fura-2-AM wurden 3×10^7 gereinigte B- oder T-Zellen für 5 min bei 470 x g pelletiert, in 1 mL warmem Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 4 µl einer 1 mM Fura 2-AM Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 4 µM) und die Zellen für 15 min bei 37 °C unter Lichtabschirmung inkubiert. In dieser Zeit diffundierte das Fura-2-AM in die Zelle. Um dem Ausbleichen des Indikators vorzubeugen, erfolgten ab diesem Zeitpunkt alle weiteren Schritte unter Lichtausschluss. Nach einer 1:5 Verdünnung in 37 °C warmem Zellkulturmedium wurden die Zellen erneut für 15 min bei gleicher Temperatur inkubiert, damit das Fura-2-AM vollständig deesterifiziert werden konnte. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 470 x g und RT pelletiert, einmal in 5 mL Ca^{2+} -Messpuffer gewaschen, in 5 mL Ca^{2+} -Messpuffer resuspendiert und schließlich bis

zur Messung bei RT und unter Lichtausschluss gelagert. Zur Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ wurden 500 μ l Zellsuspension und 500 μ l Ca^{2+} -Messpuffer in eine Quarz-Küvette pipettiert und diese in ein Hitachi F-2000 Fluorimeter überführt. Die Anregungswellenlängen waren auf 340 nm und 380 nm eingestellt und die Analyse der Fluoreszenzintensitäten erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 495 nm. War nach ca. 150 sec eine stabile $[Ca^{2+}]_i$ -Basislinie gegeben, erfolgte die Zugabe von anti-BCR (10 μ g/mL) für die B-Zell-Stimulation, beziehungsweise die Zugabe von anti-CD3 Ak (10 μ g/mL) für die T-Zell-Stimulation. Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde für weitere 10 min analysiert. Zum Schluss wurde jede Messung kalibriert. Der maximale Ratiowert wurde durch die Zugabe von Triton X-100, der minimale Ratiowert durch die Zugabe von EGTA/Tris erhalten.

2.2.2.9 *In vitro* Stimulationsexperimente

Alle Stimulationsexperimente wurden, soweit nicht anders angegeben, in Rundboden 96-Loch Zellkulturplatten mit einem Endvolumen von 200 μ L durchgeführt. Dabei wurde jeder Ansatz in Drei- oder Fünffachwerten angesetzt. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht aller in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Stimulationsexperimente. Der Nachweis von Zytokinen oder Immunglobulinen im Zellkulturüberstand erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten durch spezifische ELISAs (Abschnitt 2.2.1.1 bis Abschnitt 2.2.1.3). Die Proliferation wurde durch den Einbau von 3H -Thymidin bestimmt (Abschnitt 2.2.2.10). Der Nachweis der angegebenen Oberflächenmoleküle erfolgte durchflusszytometrisch (Abschnitt 2.2.2.12).

Spender-organismus	Zellart	Zellzahl/ Vertiefung	Stimulans	Parameter
Wildtyp/ CD83tg	Milzzellen	2x10 ⁵	• LPS (10 µg/mL)	• Proliferation (48 h) • IL-10 (48 h) • Gesamt-Ig (6 d)
			• a-Igκ Ak (1 µg/mL) + a-CD40 Ak (1 µg/mL)	• Proliferation (48 h)
			• anti-CD3 (1 µg/mL)	• Proliferation (48 h) • IFN-γ (48 h)
	B-Zellen (Milz)	2x10 ⁵	• LPS (10 µg/mL)	• Proliferation (48 h/Kinetik) • IL-10 (48 h/Kinetik) • gesamt-Ig (6 d)
C57BL/6 x IgHELtg/ CD83tg x IgHELtg	Milzzellen	2x10 ⁵	• LPS (100, 10, 1 µg/mL)	• HEL-spezif. Ig (48 h)
CD83mu	B-Zellen (Milz)	2x10 ⁵	• LPS (10, 1, 0,1 µg/mL)	• Proliferation (48 h) • IL-10 (48 h) • gesamt-Ig (6 d)
Wildtyp/ CD83tg	B-Zellen (Milz)	1x10 ⁷ /5 mL (6-Loch)	• LPS (10 µg/mL)	• Inzidenz Apoptose (48 h, 72 h, 96 h, 120 h)
Wildtyp/ CD83tg	B-Zellen (Milz)	2x10 ⁵	• LPS (10 µg/mL) • LPS (10 µg/mL) + a-IL-10 Ak (10 µg/mL) • LPS (10 µg/mL) + a-IL-10 Ak (5 µg/mL)	• Proliferation (48 h) • IL-10 (48 h)
C57BL/6 x IgHELtg/ CD83tg x IgHELtg	Milzzellen	2x10 ⁵	• LPS (10 µg/mL) • LPS (10 µg/mL) + a-IL-10 Ak (1 µg/mL)	• gesamt-Ig (4 d)
Wildtyp/ CD83tg/ CD83mu	Milzzellen	2x10 ⁵	• LPS (10 µg/mL)	• FACS (0 h, 48 h): CD40, CD80, CD83, CD86, MHC-II, IgM
OT-II	T-Zellen	1x10 ⁵	• 1x10 ⁵ gereinigte C57BL/6, CD83tg oder CD83mu B-Zellen beladen mit OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (1, 0,1, 0,01 µg/mL)	• Proliferation (48 h) • IL-2 (48 h)
Wildtyp	Milzzellen	1x10 ⁷ /5 mL (6-Loch)	• LPS (10 µg/mL) • a-Igκ Ak (1 µg/mL) + IL-4 (20 ng/mL)	• CD83-Expression: (0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 3 d, 6 d)
BALB/c	B-Zellen (Milz)	1x10 ⁶ /mL (24-Loch)	• 1x10 ⁶ OT-II Milzzellen beladen mit OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (1 µg/mL) • 1x10 ⁶ OT-II Milzzellen + LPS (10 µg/mL)	• CD83-/CD69-Expression auf B- und T-Zellen: (0 h, 24 h, 48 h)
Chimäre (1)/(2) Chimäre (3)+DT Chimäre (3)-DT Chimäre (4)+DT	Milzzellen	1x10 ⁷ /5 mL (6-Loch)		• CD83-Expression auf B- und T-Zellen: (0 h, 24 h, 48 h)

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Stimulationsexperimente.

2.2.2.10 Proliferationstest: Einbau von ^3H -Thymidin

Durch den Einbau von Tritium (^3H)-markiertem Thymidin in neusynthetisierte DNA kann die Proliferationsrate von Zellen bestimmt werden. Die Einbaurate von ^3H -Thymidin ist proportional zur Zellproliferation. Allerdings wird mit dieser Methode die Thymidineinbaurate aller Zellen eines Ansatzes gemessen, so dass Aussagen auf Einzelzellniveau nicht möglich sind. 48 h nach *in vitro* Stimulation wurden 150 μL Kulturüberstand entnommen und durch 125 μL frisches RPMI/10 % FCS und 25 μL ^3H -Thymidin in RPMI/10 % FCS (10 $\mu\text{Ci/mL}$) ersetzt. Für die Messung der eingebauten Radioaktivität wurden die Zellen nach 18 h bei 37 °C mit Hilfe eines Zellerntegerätes aus der Vertiefung entnommen, mit *Aqua dest.* lysiert und auf einen Glasfaserfilter übertragen. Nur die DNA bleibt im Filter hängen, während freies ^3H -Thymidin, das nicht in die DNA inkorporiert wurde, ausgewaschen wird. Der getrocknete Filter wurde mit 5 mL β -Szintillationsflüssigkeit, die β -Strahlung in Lichtblitze umwandelt, versetzt und in eine Folie eingeschweißt. Die Radioaktivität, die in Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) angegeben wird, wurde mit Hilfe eines β -Szintillationszählers bestimmt.

2.2.2.11 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE

Die Methode der CFSE-Färbung ermöglicht die Analyse der Zellproliferation auf Einzelzellniveau. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bindet kovalent an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig an beide Tochterzellen weitergegeben, so dass sich die Fluoreszenzintensität bei jeder Zellteilung halbiert und von der Farbintensität der Zelle indirekt darauf geschlossen werden kann, wie viele Teilungsschritte eine Zelle durchlaufen hat. Für die Markierung mit CFSE wurden je 1×10^7 murine T-Zellen pelletiert und in 10 ml 3 % FCS in PBS resuspendiert. Anschließend wurden 200 μL CFSE (1:100 in PBS verdünnt) hinzu gegeben und für 10 sec sorgfältig gemischt. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Färbung durch Zugabe von 40 ml 3 % FCS in PBS gestoppt. Überschüssiges CFSE wurde durch dreimaliges Waschen mit je 10 ml eiskaltem PBS entfernt. Die CFSE-Färbung wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.2.12 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Ak. Durch die Verwendung unterschiedlich markierter Ak in einem Ansatz können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome sind Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Alexa-488, Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC). Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der an die Zelle gebundenen Ak. Im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension mit Überdruck in eine Meßküvette eingeführt, wodurch die Zellen stark beschleunigt werden und sequenziell durch einen Laserstrahl wandern. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten Ak gemessen. Zellgröße, Zellstruktur, sowie intrazelluläre Bestandteile sind Faktoren, die auf die Lichtstreuung Einfluss nehmen. Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FCS) ist ein Maß für die Zellgröße, wohingegen das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. Um die Internalisierung von Oberflächenmolekülen zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Nach der Erythrozytenlyse wurden pro Färbung 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen pellettiert. Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen für 10 min mit 5 % (v/v) Mausserum in FACS-Puffer auf Eis inkubiert. Für den Nachweis von Zelloberflächenmolekülen wurden entsprechende spezifische Ak in FACS-Puffer verdünnt (Verdünnung siehe Tabelle 2.2) und für 45 min zu den Zellen gegeben.

Verwendete Antikörper und Sekundärreagenzien	Verdünnung
Alle nicht gesondert aufgelisteten FACS-Antikörper	1:100
Ratte anti-Maus CD4-APC	1:400
Ratte anti-Maus CD19-PE/-APC	1:200
Ratte anti-Maus CD83-FITC/-Biotin	1:200
Ratte anti-Maus MHC-II-Biotin	1:250
Streptavidin-Alexa-488	1:800
Streptavidin-APC	1:1000

Tabelle 2.2: Verdünnung der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

Die Zellen wurden anschließend zwei Mal mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen und mit 250 µL PBS/1 % PFA fixiert. Wurden biotinylierte Ak verwendet, erfolgte erst die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärreagenz, und dann die Fixation. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software CellQuestPro.

2.2.2.13 Analyse der Internalisierung transmembraner Moleküle

Milzzellen von C57BL/6, CD83tg oder CD83mu Mäusen wurden für 24 h mit LPS stimuliert, geerntet, in RPMI/10 % FCS gewaschen und mit Mausserum geblockt. Anschließend wurden 5×10^6 Zellen in 1 mL RPMI/10 % FCS mit biotinyliertem anti-CD83, anti-CD86, anti-MHC-I oder anti-MHC-II Ak für 30 min auf Eis inkubiert. Ungebundene Ak wurden durch zweimaliges Waschen entfernt und das Zellpellet in 500 μ L eiskaltem Medium resuspendiert. 250 μ L dieser Zellsuspension wurden anschließend bei 37 °C inkubiert, die restlichen Zellen verblieben als Kontrolle auf Eis. Nach 30 min, 60 min, 90 min, 4 h und 22 h wurde von beiden Ansätzen je 50 μ L Zellsuspension abgenommen und die auf der B-Zelloberfläche verbliebenen, biotinylierten Ak durch die Färbung mit anti-CD19 Ak und Streptavidin-Alexa-488 nachgewiesen.

2.2.2.14 Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen

Phosphatidylserin (PS), das bei vitalen Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist, gelangt bei apoptotischen Zellen auf die Zelloberfläche und kann durch das PS-spezifische Protein Annexin V detektiert werden. Um die Inzidenz von Apoptose in einer mit LPS aktivierten B-Zell-Kultur nachzuweisen, wurden die geernteten Zellen mit Annexin V-Bindungspuffer auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Je 100 μ L dieser Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 5 μ L Biotin-konjugiertem Annexin V versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen für 15 min unter Lichtabschirmung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL Annexin V-Bindungspuffer gewaschen, mit 100 μ L Streptavidin-APC (1:1000 in Annexin V-Bindungspuffer) versetzt und für 15 min unter Lichtabschirmung bei RT inkubiert. Ein weiterer Waschschriff mit 1 mL Annexin V-Bindungspuffer folgte. Zur Bestimmung des Apoptosestadiums wurde der Ansatz für 10 min mit 10 μ L des DNA interkalierenden Avitalfarbstoffs 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) bei RT versetzt. Dieser dringt ausschließlich in Zellen ein, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Nach Zugabe von 180 μ L Annexin V-Bindungspuffer wurden 2×10^4 Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die Frequenz apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt.

2.2.2.15 Analyse der Stimulationskapazität von APCs *in vivo*

Zum Nachweis der Stimulationskapazität von C57BL/6, CD83tg und CD83mu APCs *in vivo* wurden 1×10^7 gereinigte (Abschnitt 2.2.2.7) und CFSE-markierte (Abschnitt 2.2.2.11) OT-II T-Zellen in PBS intravenös (i.v.) in C57BL/6, CD83tg und CD83mu Mäuse transferiert. 24 h später erhielten die Mäuse subkutan (s.c.) in die rechte Hinterpfote 30 µg des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉. 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion des Peptids wurden poplietale und kontralaterale Lymphknoten präpariert, die Lymphknotenzellen mit anti-CD4 Ak gefärbt und die CFSE-Verdünnung bei CD4⁺ OT-II T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.2.16 CD83-Expression auf B-Zellen nach T-Zell-Stimulation *in vivo*

C57BL/6 Mäusen wurden 30 µg des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Kontrollmäuse erhielten 30 µg des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄) s.c. in die rechte Hinterpfote injiziert. Nach 2 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden die poplietalen und kontralateralen Lymphknoten isoliert, die Lymphknotenzellen präpariert, gefärbt und die Expression von CD83 und CD69 auf B- und T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 Gewinnung von Serum

Durch Punktion der Schwanzvene wurde Mäusen ca. 100 µL Blut entnommen. Die Blutprobe wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend bei 15 200 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 T-Zell-abhängige Immunisierung mit den Modellantigenen OVA oder DNP-KLH

OVA und Alum-präzipitiertes DNP-KLH wurden in dieser Arbeit als T-Zell-abhängige Modell-Ag verwendet. OVA wurde zur Verstärkung der Immunantwort zusammen mit Freud's Adjuvant verabreicht. Für den ersten Immunisierungsschritt wurden 2 mg/mL OVA in 1xPBS 1:1 mit komplettem Freud's Adjuvant versetzt und anschließend 200 µg in einem Volumen von 200 µL intraperitoneal (i.p.) in die Maus injiziert. 24 h vor und 24 h

nach der Immunisierung wurden zusätzlich 100 µg anti-CD83 mAk in einem Volumen von 200 µL i.p. appliziert. Vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte eine weitere Immunisierung mit 200 µg OVA in inkomplettem Freud's Adjuvant. DNP-KLH wurde mit PBS auf 1 mg/mL eingestellt und den Mäusen i.p. in einem Volumen von 200 µL verabreicht. Den immunisierten Mäusen wurde wöchentlich Blut abgenommen und OVA-beziehungsweise DNP-spezifisches Ig mittels ELISA im Serum nachgewiesen.

2.2.3.3 T-Zell-unabhängige Immunisierung mit dem Modellantigen NIP-Ficoll

NIP-Ficoll wurde in dieser Arbeit als T-Zell-unabhängiges Modell-Ag verwendet. Für die Immunisierung wurde den Mäusen 200 µg NIP-Ficoll in PBS i.p. verabreicht. In einigen Experimenten wurde zusätzlich ein anti-CD83 mAk (20 µg oder titrierte Mengen) 24 h vor, nach oder vor und nach der Immunisierung mit NIP-Ficoll i.p. injiziert. Den immunisierten Mäusen wurde wöchentlich Blut abgenommen und NIP-spezifisches Ig mittels ELISA im Serum nachgewiesen.

2.2.3.4 Herstellung von Knochenmarkchimären

Die Empfänger-mäuse (IgH^a-kongene C57BL/6, C57BL/6 oder JHT Mäuse) erhielten 8 Gray γ -Bestrahlung durch eine Caesium (¹³⁷Cs)-Quelle. Am folgenden Tag wurde das aus Spender-mäusen (JHT, C57BL/6, CD83tg, CD83mu und CD11cDTRtg Mäuse) präparierte Knochenmark i.v. in die bestrahlten Tiere transferiert. Die Empfänger-mäuse erhielten i.v. entweder 2×10^6 C57BL/6, CD83tg oder CD83mu Knochenmarkzellen oder eine Mischung aus $1,8 \times 10^6$ CD83mu oder Wildtyp und entweder $4,2 \times 10^6$ JHT oder CD11cDTRtg Knochenmarkzellen. Um Infektionen zu vermeiden, wurde den bestrahlten Mäusen eine Woche vor der Bestrahlung bis vier Wochen nach der Bestrahlung 0,5 % (v/v) Baytril im Trinkwasser verabreicht.

2.2.3.5 Depletion CD11c⁺DTRtg DCs *in vivo*

Die Depletion CD11c⁺DTRtg DCs erfolgte durch die Applikation von 8 ng Diphtherie-Toxin (DT) pro Gramm Körpergewicht. Das DT wurde i.p. einen Tag vor und einen und drei Tage nach der Injektion von anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig appliziert. Die Depletion der CD11c⁺DTRtg DCs wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde der *student's t-test* angewandt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des transmembranen Glykoproteins CD83 auf die Funktion muriner B-Lymphozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt wurde der Phänotyp von B-Zellen mit veränderter CD83-Expression *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für diese Analysen standen verschiedene Mauslinien zur Verfügung: Eine am Bernhard-Nocht-Institut generierte CD83 transgene Maus (CD83tg), die CD83 konstitutiv unter der Kontrolle des MHC-Klasse I Promotors exprimiert, so dass CD83 auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden ist [96, 101], und eine von Prof. Ramsdell (Zymogenetics, Seattle, USA) zur Verfügung gestellte CD83-defiziente Maus (CD83mu), die aufgrund einer Fehlsinmutation im CD83-Gen eine stark verringerte Expression des CD83-Proteins aufweist [81]. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung eines anti-CD83 monoklonalen Antikörpers auf die humorale Immunantwort von Wildtyp Mäusen untersucht.

3.1 Teil I: Charakterisierung CD83tg und CD83-defizienter B-Zellen *in vitro* und *in vivo*

3.1.1 CD83 transgene B-Zellen zeigen eine reduzierte Ig-Sekretion und gesteigerte IL-10 Produktion *in vitro*

Zunächst sollte der Einfluss von CD83 *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden Milzzellen von CD83tg oder Wildtyp Mäusen entweder B-Zell-spezifisch mit LPS oder T-Zell-spezifisch mit anti-CD3 Ak stimuliert. Abbildung 3.1-A zeigt, dass CD83tg Milzzellen 48 h nach Toll-like Rezeptor (TLR)-Engagement durch LPS oder BCR-Ligation durch anti-BCR Ak/anti-CD40 Ak schwächer proliferierten als Wildtyp Milzzellen. Auch das nach sechs Tagen LPS-Stimulation im Kulturüberstand CD83tg Milzzellen nachgewiesene gesamt-Ig war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 3.1-C), während die in den Überstand freigesetzte Menge an IL-10 bei CD83tg Milzzellen signifikant erhöht war (Abb. 3.1-B). Dieser Befund schließt einen generellen Defekt von CD83tg B-Zellen aus. Nach BCR-Engagement mit anti-Igk Ak waren kein Ig und auch kein IL-10 im Kulturüberstand nachweisbar.

Eine T-Zell-spezifische Stimulation von CD83tg und Wildtyp Milzzellen durch das Engagement von CD3 führte hingegen bei beiden Gruppen zu einem vergleichbaren Einbau von ^3H -Thymidin und zu sehr ähnlicher IFN- γ -Sekretion (Abb. 3.1-D und -E).

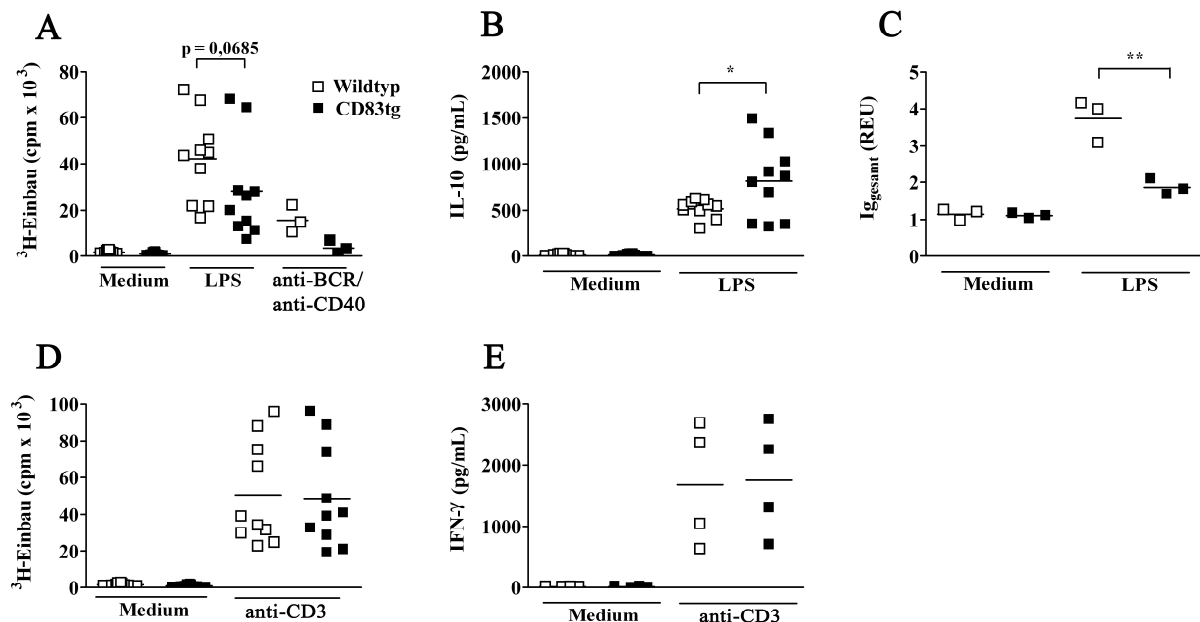


Abb. 3.1: CD83tg Milzzellen zeigen einen veränderten Phänotyp *in vitro*. 2×10^5 Milzzellen von Wildtyp (weiß) oder CD83tg (schwarz) Mäusen wurden in Gegenwart von LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), anti-BCR und anti-CD40 Ak (je 1 $\mu\text{g/mL}$), anti-CD3 Ak (1 $\mu\text{g/mL}$) oder Medium als Negativkontrolle kultiviert. **A und D:** Die Proliferation wurde nach 48 h durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. **B:** IL-10 wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA nach 48 h LPS-Stimulation im Überstand quantifiziert. **C:** Die Analyse des gesamt-Ig im Kulturüberstand (1:1024 verdünnt) erfolgte am Tag sechs der Stimulation mittels ELISA. Das Ergebnis ist als relative ELISA Einheit (*relative ELISA unit*, REU = $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ Probe: $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ Medium) dargestellt. **E:** IFN- γ wurde im Zellkulturüberstand nach 48 h Stimulation mit anti-CD3 Ak mittels spezifischem ELISA quantifiziert. Jedes Quadrat repräsentiert die Analyse einer einzelnen Maus, wobei jeder Stimulationsansatz 5-fach angesetzt wurde. Die Standardabweichung der Mittelwerte (*standard error of the mean*, SEM) lag unter 10 %. Die Linien repräsentieren den Medianwert aller untersuchten Mäuse. Die Signifikanz der beobachteten Unterschiede ist durch Sternchen symbolisiert, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Dieses Resultat zeigt, dass CD83tg B-Zellen in der Milzzell-Kultur einen veränderten Phänotyp aufweisen, CD83tg T-Zellen sich in ihrer Funktion aber nicht von Wildtyp T-Zellen unterscheiden.

3.1.2 CD83tg x IgHELtg B-Zellen sezernieren signifikant weniger Ag-spezifisches Ig *in vivo* und *in vitro*

In Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass in dem Kulturüberstand LPS-aktivierter CD83tg Milzzellen signifikant weniger gesamt-Ig nachweisbar war, als im Kulturüberstand

stimulierter Wildtyp Milzzellen. Ein Nachweis von Ag-spezifischem Ig war in diesem System nicht möglich, da die B-Zellen polyklonal stimuliert wurden. Im folgenden Experiment wurden Mäuse verwendet, die transgen einen für das Hühner-Eiweiß-Lysozym (HEL)-spezifischen BCR exprimieren und entweder auf Wildtyp (C57BL/6 x IgHELtg) oder CD83tg (CD83tg x IgHELtg) Mäuse zurückgekreuzt waren.

Abbildung 3.2-A zeigt, dass naive CD83tg x IgHELtg Mäuse signifikant weniger HEL-spezifisches Ig im Serum aufwiesen als die Kontrollgruppe. Dazu passend führte die *in vitro*-Stimulation der doppelt-tg Milzzellen mit titrierten Mengen LPS zu einer signifikant reduzierten HEL-spezifischen Ig-Sekretion (Abb. 3.2-B).

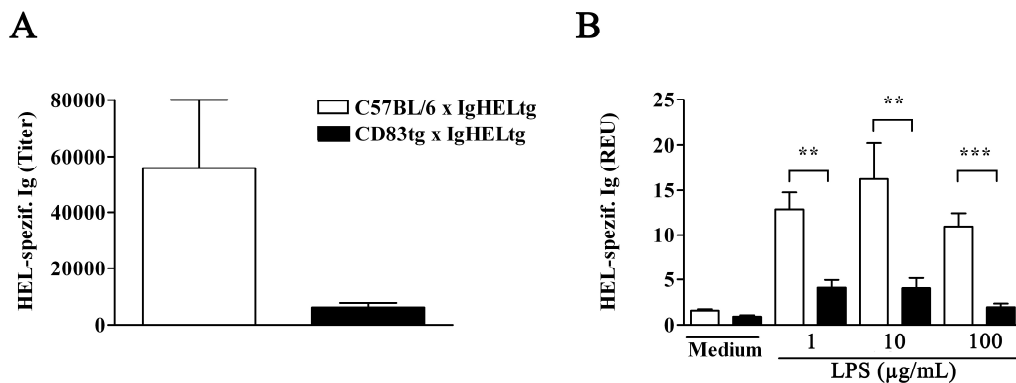


Abb. 3.2: Reduzierte Ig-Sekretion CD83tg x IgHELtg Mäuse *in vivo* und *in vitro*.
A: HEL-spezifisches Ig wurde im Serum naiver C57BL/6 x IgHELtg (weiß) oder naiver CD83tg x IgHELtg Mäuse (schwarz) mit Hilfe eines Ag-spezifischen ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von je sechs analysierten Seren. **B:** 2×10^5 Milzzellen von C57BL/6 x IgHELtg (weiß) oder CD83tg x IgHELtg Mäusen (schwarz) wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen LPS (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) oder ohne weiteren Stimulus (Medium) stimuliert. Der Nachweis von HEL-spezifischem Ig im Überstand erfolgte mittels ELISA. Dargestellt ist die REU eines 1:40 verdünnten Kulturüberstandes. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente und zeigt die aus fünf Replikaten gebildeten Mittelwerte und SEM, (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Dieses Ergebnis zeigt, dass IgHELtg Mäuse spontan Ig sezernieren und dass die zusätzlich transgene Expression von CD83 mit dieser Ig-Freisetzung interferiert.

3.1.3 Verminderte Ig-Sekretion und gesteigerte IL-10 Produktion CD83tg B-Zellen sind unabhängig von akzessorischen Zellen *in vitro*

Im Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass B-Zellen nach B-Zell-spezifischer Stimulation in der CD83tg Milzzellkultur im Vergleich zu B-Zellen der Kontrollkultur weniger proliferierten und weniger Ig, aber mehr IL-10, in den Kulturüberstand sezernierten. CD83tg Mäuse exprimieren CD83 unter der Kontrolle des MHC-I Promotors [96], so dass dieses auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden ist. Um herauszufinden, ob der Phänotyp der CD83tg Milzzellen durch die Expression von CD83 auf den B-Zellen selbst oder durch die Expression von CD83 auf anderen Zellen verursacht wird, und um sicher zu gehen, dass die leicht reduzierte B-Zell-Frequenz in der Milz CD83tg Mäuse [97] keinen Einfluss auf den beobachteten Phänotyp hat, wurden die in Abschnitt 3.1.1 durchgeführten *in vitro*-Stimulationsansätze mit gereinigten CD83tg und Wildtyp B-Zellen wiederholt. Die Reinheit der mit einem Kit zur B-Zell-Isolierung gewonnenen B-Zellen wurde durch FACS-Analysen ermittelt und lag bei > 98 % (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.3 zeigt, dass auch gereinigte, LPS-stimulierte CD83tg B-Zellen weniger proliferierten (Abb. 3.3-A), signifikant weniger gesamt-Ig sezernierten (Abb. 3.3-E) und eine deutlich stärkere IL-10 Freisetzung (Abb. 3.3-C) aufwiesen als die Wildtyp Kontrolle. Der Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp B-Zellen war über einen Zeitverlauf von fünf Tagen zu beobachten (Abb. 3.3-B und -D). Dieses Resultat schließt aus, dass die beobachteten Unterschiede lediglich auf einer veränderten Kinetik der Stimulation beruhten.

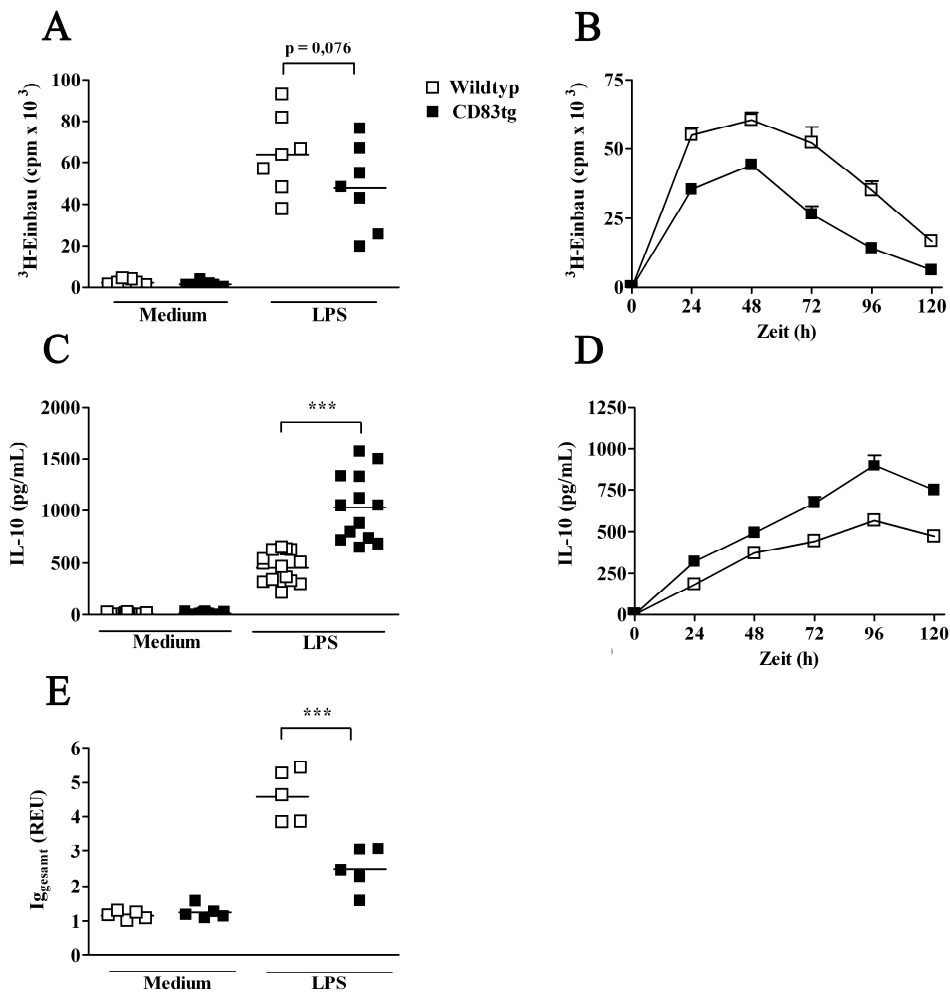


Abb. 3.3: Veränderter Phänotyp gereinigter CD83tg B-Zellen nach LPS-Aktivierung *in vitro*. Gereinigte B-Zellen (2×10^5) aus der Milz von Wildtyp (weiß) und CD83tg (schwarz) Mäusen wurden in Gegenwart von LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) oder Medium als Negativkontrolle stimuliert. **A und B:** Die Proliferation wurde nach 48 h oder zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. **C und D:** Der Nachweis von IL-10 im Kulturüberstand erfolgte nach 48 h oder zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe eines spezifischen ELISA. **E:** Gesamt-Ig im Kulturüberstand (1:1024 verdünnt) wurde am Tag sechs der Stimulation mittels ELISA quantifiziert. Das Ergebnis ist als REU dargestellt. Jedes Quadrat repräsentiert ein einzelnes Experiment, bei dem die B-Zellen aus zwei vereinigten Milzen aufgereinigt wurden. Gezeigt sind jeweils die aus fünf Replikaten gebildeten Mittelwerte. Die SEM lag unter 10 %. Die Linien repräsentieren den Medianwert aller untersuchten Mäuse, (***) $p < 0,001$.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die veränderte Funktion CD83tg B-Zellen unabhängig von akzessorischen Zellen ist, dass die gesteigerte Menge an IL-10 von den B-Zellen selbst produziert wird und dass die verringerte Ig-Sekretion CD83tg Milz- beziehungsweise B-Zell-Kulturen nicht auf die leicht reduzierte B-Zell-Frequenz in der CD83tg Milz [97] zurückzuführen ist.

3.1.4 Überexpression von CD83 interferiert mit dem Kalziumsignal *in vitro*

Während Proliferation, Zytokin- und Ig-Sekretion die Folgen einer produktiven B-Zell-Aktivierung sind, ist der Anstieg der freien, zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration Sekunden nach BCR-Engagement eines der frühesten Ereignisse einer Aktivierung. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration lässt sich quantitativ mit Hilfe von fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren, wie zum Beispiel Fura-2 bestimmen. Um zu testen, ob die Überexpression von CD83 auch einen Einfluss auf frühe Ereignisse der B-Zell-Aktivierung hat, wurde die freie, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 3.4-rechts) und die Änderung dieser intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Abb. 3.4-links) bei gereinigten CD83tg und Wildtyp B-Lymphozyten nach BCR-Engagement durch anti-Ig κ Ak bestimmt.

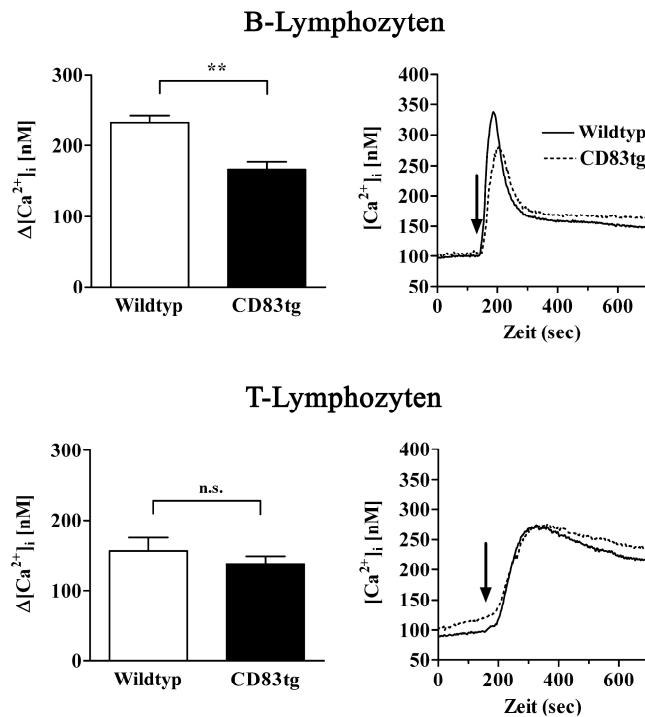


Abb. 3.4: Reduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration bei CD83tg B-Zellen nach BCR-Engagement. Gereinigte B- und T-Lymphozyten aus der Milz von Wildtyp (weiß) und CD83tg (schwarz) Mäusen wurden mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Aktivierung der B-Lymphozyten durch die Stimulation mit anti-BCR Ak (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), beziehungsweise die Aktivierung der T-Lymphozyten durch die Stimulation mit anti-CD3 Ak (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **Rechts:** $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm kalkuliert. Dargestellt ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Wildtyp (durchgehende Linie) und CD83tg (gestrichelte Linie) B- und T-Zellen zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten. **Links:** $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ergibt sich aus der Differenz von maximaler $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Stimulation und basalem $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus je neun unabhängigen Analysen, (** $p < 0,01$).

Abbildung 3.4 zeigt, dass die wenige Sekunden nach BCR-Engagement ermittelte $[Ca^{2+}]_i$ bei CD83tg B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen reduziert war und sich daraus eine signifikant geringere Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) ergab.

Die Analyse von $[Ca^{2+}]_i$ und $\Delta[Ca^{2+}]_i$ bei gereinigten CD83tg und Wildtyp T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 Ak führte hingegen zu keinen Unterschieden (Abb. 3.4).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von CD83 nicht generell mit der frühen Aktivierung CD83tg Lymphozyten interferiert, sondern selektiv einen Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung nach BCR-Engagement hat. Die Verwendung gereinigter T- und B-Zellen zeigt erneut, dass die Überexpression von CD83 auf den B-Zellen selbst und nicht auf anderen Zellen zu dem beobachteten Phänotyp führt.

3.1.5 CD83mu B-Zellen zeigen eine gesteigerte Ig-Sekretion und eine verminderte IL-10 Produktion *in vitro*

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Überexpression von CD83 auf B-Zellen nach LPS-Stimulation *in vitro* eine signifikant gesteigerte IL-10 Antwort bewirkt, und gleichzeitig mit der Proliferation und Ig-Sekretion CD83tg B-Zellen interferiert. Als nächstes stellte sich deshalb die Frage, ob die verminderte Expression von CD83 auf B-Zellen zu einem inversen Phänotyp führt. Abbildung 3.5 zeigt die Proliferation, IL-10 und Ig-Sekretion gereinigter CD83mu B-Zellen nach der Aktivierung mit LPS. Im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen zeigten CD83-defiziente B-Zellen *in vitro* eine ähnliche Proliferation (Abb. 3.5-A), eine leicht gesteigerte Ig-Sekretion (Abb. 3.5-C) und eine signifikant reduzierte IL-10 Antwort (Abb. 3.5-B).

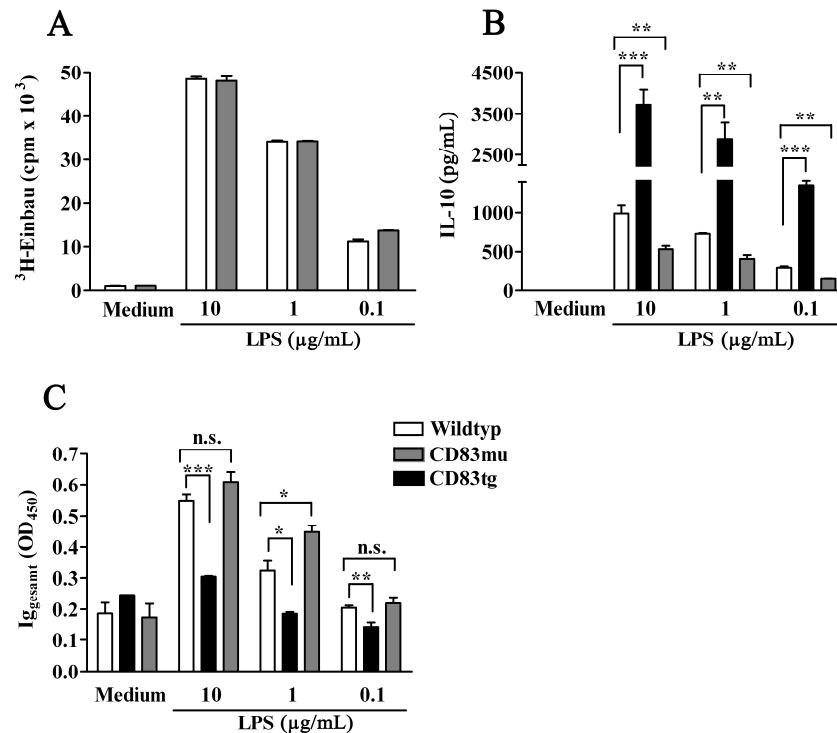


Abb. 3.5: CD83mu B-Zellen zeigen einen schwach inversen Phänotyp *in vitro*. 2×10^5 gereinigte B-Zellen aus der Milz von Wildtyp (weiß), CD83tg (schwarz) oder CD83mu (grau) Mäusen wurden mit titrierten Mengen LPS (10 μg/mL, 1 μg/mL, 0,1 μg/mL) oder Medium als Negativkontrolle kultiviert (Dreifachwerte). **A:** Die Proliferation wurde nach 48 h durch den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. **B:** Der Nachweis von IL-10 erfolgte nach 48 h Stimulation im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA. **C:** Gesamt-Ig im Kulturüberstand (1:1024 verdünnt) wurde am Tag sechs der Stimulation mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten, (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Die CD83mu B-Zellen wiesen somit im Vergleich zu den CD83tg B-Zellen einen inversen Phänotyp auf. Obwohl dieser nicht so ausgeprägt war, zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von CD83 auf B-Zellen positiv mit der IL-10 Antwort und negativ mit der Ig-Sekretion korreliert.

3.1.6 Vergleich der Ig-Antwort von CD83tg und CD83mu Mäusen *in vivo*

Die Charakterisierung CD83tg und CD83mu Mäuse *in vitro* hatte einen schwach reziproken Phänotyp der B-Zellen ergeben. Ob sich dieser Phänotyp auch *in vivo* zeigen würde, sollte durch Immunisierungsstudien mit dem thymusunabhängigen (*thymus independent*, TI) Modell-Ag NIP-Ficoll, das die B-Zellen T-Zell-unabhängig durch Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren aktiviert oder dem thymusabhängigen (*thymus dependent*, TD) Modell-Ag DNP-KLH, das nicht ohne T-Zell-Hilfe zur Aktivierung der

B-Zelle führt, untersucht werden. Da die CD83mu Maus durch das Fehlen von CD83 auf radioresistenten thymischen Epithelzellen eine stark verringerte Frequenz $CD4^+$ T-Zellen aufweist (Abb. 3.6-A) [81], würde dieser Defekt eine TD-Immunisierung verfälschen. Deshalb wurde CD83mu, CD83tg oder als Kontrolle Wildtyp Knochenmark in letal bestrahlte Wildtyp Mäuse transferiert. Diese Technik führt zu einer Beschränkung der Überexpression beziehungsweise Defizienz von CD83 auf das hämatopoetische System, und erlaubt so die Reifung CD83mu Thymozyten an thymischen Epithelzellen von Wildtyp Mäusen [72]. In der Folge reifen vergleichbare Frequenzen $CD4^+$ T-Zellen in Wildtyp, CD83mu und CD83tg Chimären. Abbildung 3.6-B zeigt die Frequenz $CD4^+$ T-Zellen in chimären Wildtyp in Wildtyp und CD83mu in Wildtyp Mäusen.

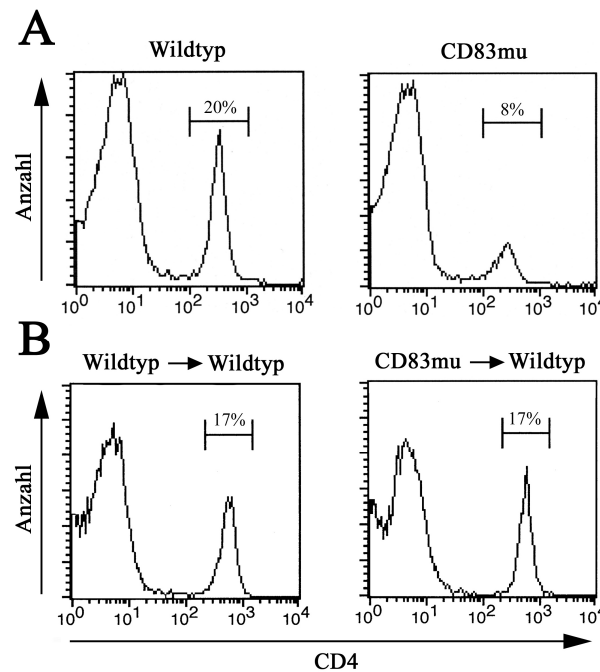


Abb. 3.6: Transfer von CD83mu Knochenmark in letal bestrahlte Wildtyp Mäuse führt zu normaler Frequenz $CD4^+$ T-Zellen. **A:** $CD4^+$ T-Zellen wurden im peripheren Blut naiver Wildtyp und CD83mu Mäuse durch den Einsatz eines anti-CD4 Ak gefärbt und je 2×10^4 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **B:** $CD4^+$ T-Zellen wurden im peripheren Blut chimärer Mäuse (Wildtyp → Wildtyp und CD83mu → Wildtyp) durch den Einsatz eines anti-CD4 Ak gefärbt und je 2×10^4 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil $CD4^+$ T-Zellen im Lymphozytengate an.

Die Chimären wurden entweder mit dem TI-Ag NIP-Ficoll (Abb. 3.7) oder mit dem TD-Ag DNP-KLH (Abb. 3.8) immunisiert. Die Überexpression von CD83 auf hämatopoetischen Zellen führte zu einer stark reduzierten Ig-Antwort, sowohl gegen

T-Zell-unabhängige (Abb. 3.7-A) als auch gegen T-Zell-abhängige Modell-Ag (Abb. 3.8-A). Dabei waren alle Ig-Subklassen gleichermaßen reduziert.

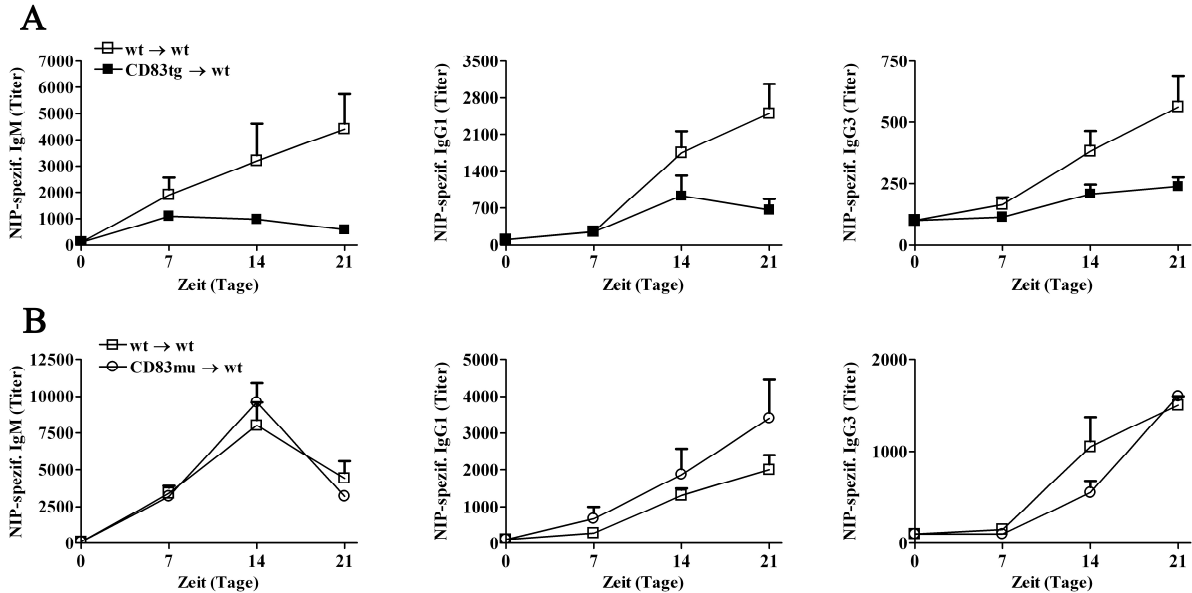


Abb. 3.7: Die transgene Expression von CD83 interferiert mit der Ig-Antwort gegen TI-Ag, die Defizienz von CD83 stört hingegen nicht. 2×10^6 Wildtyp (wt; Quadrat weiß) (A), CD83tg (Quadrat schwarz) (A) oder CD83mu (Kreis weiß) (B) Knochenmarkzellen wurden in letal bestrahlte IgH^a-kongene Wildtyp (wt) Mäuse transferiert. Acht Wochen nach Transfer erfolgte die Immunisierung der Chimären mit dem TI-Ag NIP-Ficoll. Zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten wurden mittels ELISA NIP-spezifisches IgM, IgG1 und IgG3 im Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind als gemittelter Titer aus je fünf Einzeltitern dargestellt und repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken zeigen SEM.

Die Defizienz von CD83 auf hämatopoetischen Zellen führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner generell veränderten humoralen Antwort, weder gegen das T-Zell-unabhängige (Abb. 3.7-B) noch gegen das T-Zell-abhängige (Abb. 3.8-B) Modell-Ag. Es konnte nur eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der T-Zell-unabhängigen IgG1-Antwort (Abb. 3.7-B) und eine leicht, aber nicht für alle Zeitpunkte gültige, Steigerung der T-Zell-abhängigen IgM, IgG1 und IgG2b-Antwort im Vergleich zur Kontrollchimäre beobachtet werden (Abb. 3.8-B).

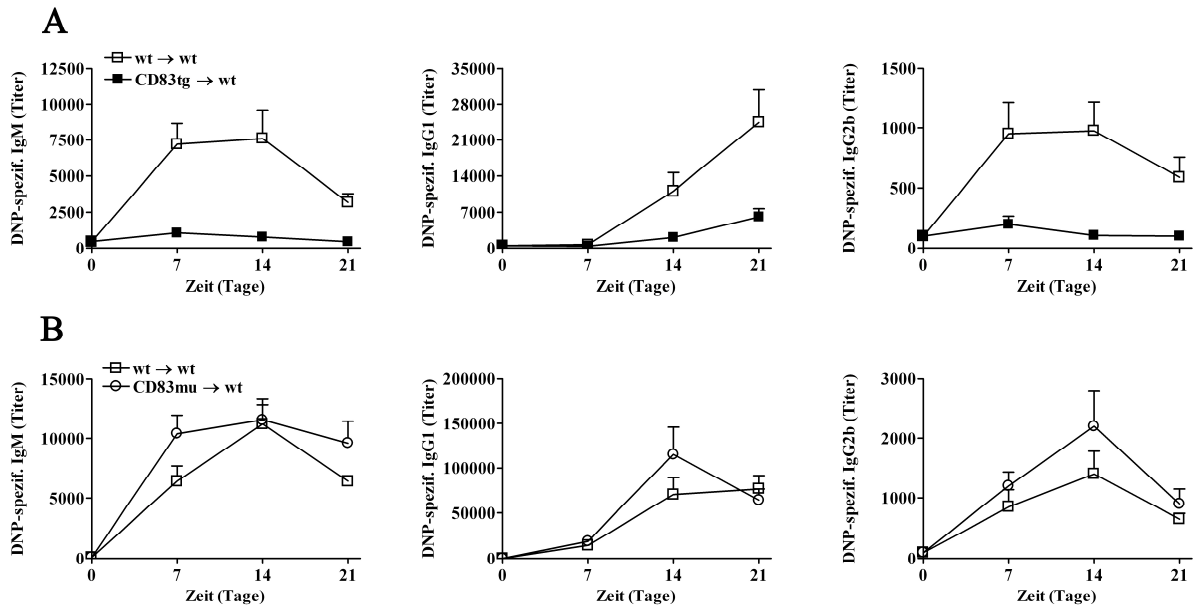


Abb. 3.8: Die transgene Expression von CD83 interferiert mit der Ig-Antwort gegen TD-Ag, die Defizienz von CD83 stört hingegen nicht. 2×10^6 Wildtyp (wt; Quadrat weiß) (AB), CD83tg (Quadrat schwarz) (A) oder CD83mu (Kreis weiß) (B) Knochenmarkzellen wurden in letal bestrahlte IgH^a-kongene Wildtyp Mäuse transferiert. Acht Wochen nach Transfer erfolgte die Immunisierung der Chimären mit dem TD-Ag DNP-KLH. Zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten wurden mittels ELISA DNP-spezifisches IgM, IgG1 und IgG2b im Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind als gemittelter Titer aus je fünf Einzeltitern dargestellt und repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken zeigen SEM.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression von CD83 dramatisch mit der humoralen Antwort gegen TI- und TD-Ag interferiert, wohingegen das Fehlen von CD83 nur eine leichte Steigerung der Ig-Antwort bewirkt. Diese *in vivo*-Befunde stimmen mit den *in vitro* gewonnenen Resultaten überein.

3.1.7 Überexpression von CD83 begünstigt nicht die Inzidenz von Apoptose *in vitro*

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass CD83tg B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen schlechter proliferieren und weniger Ig sezernieren. Es wäre denkbar, dass CD83tg B-Zellen schneller apoptotisch werden. Um darüber Aufschluss zu erhalten, wurde die Inzidenz von apoptotischen und nekrotischen Zellen in CD83tg und Wildtyp Zellkulturen über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Phosphatidylserin (PS), das bei vitalen Zellen auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist, gelangt bei apoptotischen Zellen auf die Zelloberfläche und kann durch das

PS-spezifische Protein Annexin V detektiert werden. Zur Bestimmung des Apoptosestadiums wurden die Zellen zusätzlich mit dem DNA interkalierenden Avitalfarbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) gefärbt. 7-AAD kann ausschließlich in Zellen eindringen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist.

In Abbildung 3.9-A ist exemplarisch eine Färbung von LPS-aktivierten Wildtyp und CD83tg B-Zellen mit Annexin V und 7-AAD dargestellt. B-Zellen mit intakter Zellmembran reagieren auf beide Färbungen negativ, früh-apoptotische B-Zellen lassen sich mit Annexin V, nicht aber mit 7-AAD färben, spät-apoptotische B-Zellen reagieren auf beide Färbungen positiv und nekrotische Zellen lassen sich mit 7-AAD, nicht jedoch mit Annexin V färben. Abbildung 3.9-B zeigt, dass der prozentuale Anteil lebender und spät-apoptotischer Zellen in der Wildtyp und der CD83tg B-Zell-Kultur zu jedem Zeitpunkt vergleichbar war. In beiden Kultursystemen wurden 48 h nach der Stimulation mit LPS 75 % lebende und ca. 10 % spät-apoptotische B-Zellen nachgewiesen.

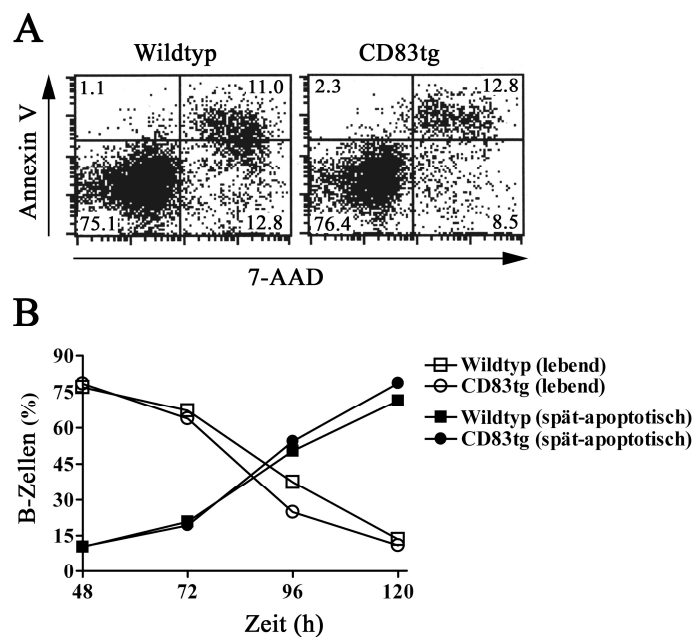


Abb. 3.9: Vergleichbare Inzidenz von Apoptose bei CD83tg und Wildtyp B-Zellen. Gereinigte B-Zellen (2×10^6 /mL) aus der Milz von Wildtyp und CD83tg Mäusen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) stimuliert. Jeweils 1×10^6 B-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit dem interkalierenden Avitalfarbstoff 7-AAD und dem Apoptoseindikator Annexin V gefärbt. **A:** Gezeigt ist eine repräsentative Färbung von Wildtyp und CD83tg B-Zellen (48 h LPS-aktiviert) mit 7-AAD (x-Achse) und Annexin V (y-Achse). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der B-Zellen in dem jeweiligen Quadranten an. **B:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender (weiße Symbole) und spät-apoptotischer (schwarze Symbole) Wildtyp (Quadrat) und CD83tg (Kreis) B-Zellen. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Im Verlauf der Stimulation nahm der prozentuale Anteil lebender B-Zellen stetig, bis zum Tag fünf auf ungefähr 10 % ab und der Anteil spät-apoptotischer B-Zellen stieg entsprechend. In beiden Kulturen waren zu jedem Zeitpunkt nur sehr wenige, aber dennoch vergleichbare Frequenzen früh-apoptotischer und nekrotischer Zellen zu finden (Abb. 3.9-A und Daten nicht gezeigt).

Dieses Resultat zeigt, dass in der CD83tg Zellkultur zu keinem Zeitpunkt mehr B-Zellen spät-apoptotisch oder nekrotisch waren als in der Wildtyp Kultur. Die verminderte *in vitro* Proliferation und Ig-Sekretion der CD83tg B-Zellen kann deshalb nicht auf eine gegenüber den Wildtyp B-Zellen reduzierte Vitalität zurückgeführt werden.

3.1.8 IL-10 hat keinen Einfluss auf die Proliferation und Ig-Sekretion CD83tg B-Zellen *in vitro*

IL-10 ist ein Zytokin mit pleiotroper Wirkung. Neben seiner Funktion als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen [104, 105] sind die meisten für IL-10 beschriebenen Effekte anti-inflammatorisch und immunsuppressiv [106, 107].

CD83tg B-Zellen sezernieren signifikant mehr IL-10 in den Kulturüberstand als Wildtyp B-Zellen. Es wäre daher denkbar, dass die gesteigerte Menge an IL-10 im Kulturüberstand die reduzierte Proliferation und Ig-Sekretion CD83tg B-Zellen verursacht. Um den Einfluss von IL-10 auf die Proliferation CD83tg B-Zellen zu untersuchen, wurden CD83tg und Wildtyp B-Zellen mit LPS stimuliert. Zusätzlich wurde zur Neutralisation des IL-10, das von den B-Zellen in den Kulturüberstand abgegeben wird, ein anti-IL-10 mAk in verschiedenen Konzentrationen in den Stimulationsansatz pipettiert. Die Analyse der IL-10 Sekretion und der Qualität der IL-10 Blockade erfolgte durch den Nachweis von IL-10 im ELISA (Abb. 3.10-A). Abbildung 3.10-A zeigt, dass im Überstand LPS-aktivierter CD83tg B-Zellen signifikant mehr IL-10 gemessen wurde, als im Überstand der Wildtyp B-Zellen. Durch die Zugabe des anti-IL-10 mAk konnte dieser Unterschied ausgeglichen werden, so dass im Kulturüberstand von CD83tg und Wildtyp B-Zellen anstelle von 450 pg/mL und 300 pg/mL nur noch je ungefähr 225 pg/mL IL-10 nachweisbar waren. Die parallel bestimmte Proliferation ist in Abbildung 3.10-B dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass es eine Korrelation zwischen Proliferation und IL-10 Menge im Kulturüberstand gab: Sowohl Wildtyp als auch CD83tg B-Zellen proliferierten nach der partiellen Blockade des

IL-10 mit 5 µg/mL oder 10 µg/mL anti-IL-10 mAk stärker, als die B-Zellen, die ausschließlich mit LPS inkubiert wurden. Dennoch war die Proliferation der CD83tg B-Zellen in allen Ansätzen signifikant schwächer als die der Wildtyp B-Zellen. Um herauszufinden, ob die IL-10 Konzentration im Überstand einen Einfluss auf die Ig-Antwort hat, wurde erneut das IgHELtg System gewählt. Dieses ermöglicht einen Ag-spezifischen Ig-Nachweis. C57BL/6 x IgHELtg und CD83tg x IgHELtg Milzzellen wurden mit LPS stimuliert, das sezernierte IL-10 geblockt (Daten nicht gezeigt) und HEL-spezifisches Ig im Überstand nachgewiesen (Abb. 3.10-C).

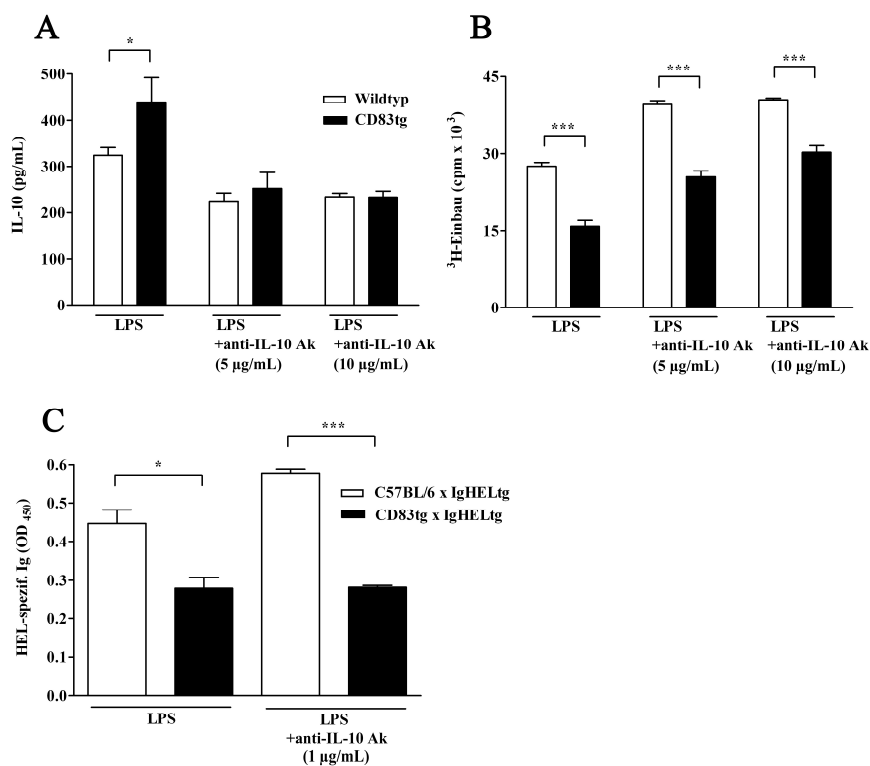


Abb. 3.10: IL-10 hat keinen Einfluss auf die Proliferation und Ig-Sekretion CD83tg B-Zellen. **A und B:** 2×10^5 gereinigte B-Zellen aus der Milz von Wildtyp (weiß) oder CD83tg (schwarz) Mäusen wurden mit LPS (1 µg/mL) alleine oder mit anti-IL-10 mAk (5 µg/mL, 10 µg/mL) kultiviert. **A:** Der Nachweis von IL-10 im Kulturüberstand erfolgte nach 48 h Stimulation mit Hilfe eines spezifischen ELISA. **B:** Die Proliferation wurde ebenfalls nach 48 h durch den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Dreifachwerten. **C:** 2×10^5 Milzzellen von C57BL/6 x IgHELtg (weiß) oder CD83tg x IgHELtg (schwarz) Mäusen wurden mit LPS (10 µg/mL) alleine oder mit anti-IL-10 mAk (1 µg/mL) kultiviert. Der Nachweis von HEL-spezifischem Ig im Kulturüberstand erfolgte am vierten Tag der Stimulation mittels ELISA. Dargestellt ist die OD_{450 nm} des 1:64 in Medium verdünnten Kulturüberstandes. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von Dreifachwerten, (* p < 0,05, *** p < 0,001).

Die Neutralisation von IL-10 führte im Vergleich zum LPS-Kontrollansatz zu einer leichten Steigerung der Ig-Sekretion in der C57BL/6 x IgHELtg nicht aber in der

CD83tg x IgHELtg Milzzell-Kultur. Trotz Angleichung der IL-10 Konzentrationen im Kulturüberstand beider Mausgruppen, blieb der Unterschied in der Ig-Sekretion zwischen C57BL/6 x IgHELtg und CD83tg x IgHELtg Mäusen bestehen. Im Überstand der Kontrollgruppe konnte unabhängig davon, ob das IL-10 neutralisiert worden war oder nicht, signifikant mehr Ig nachgewiesen werden, als im Überstand der doppelt-transgenen Mäuse.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die reduzierte Proliferation und Ig-Freisetzung CD83tg B-Zellen nicht durch die gesteigerte IL-10 Menge im Kulturüberstand verursacht wird, da das Angleichen des IL-10-Niveaus im Überstand von CD83tg und Wildtyp B-Zellen oder von doppelt- und einfach-transgenen Milzzellen nicht zu einem Ausgleich der Unterschiede in der Proliferation oder der Ig-Sekretion führt.

3.1.9 Der Phänotyp CD83tg und CD83mu B-Zellen ist nicht auf eine veränderte Oberflächenflächendichte kostimulatorischer Moleküle zurückzuführen

Um herauszufinden, ob der Phänotyp CD83tg und CD83mu B-Zellen durch eine veränderte Expressionsdichte verschiedener Aktivierungsmarker erklärt werden kann, wurde die Oberflächenexpression von bekannten kostimulatorischen Molekülen auf Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen untersucht. Der Nachweis von CD83, CD86, CD80, CD40, MHC-II und IgM erfolgte durchflusszytometrisch auf naiven und LPS-aktivierten B-Zellen aus der Milz. Abbildung 3.11 zeigt, dass die Expressionsdichte der Moleküle CD80, CD40 und IgM auf naiven und stimulierten Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen vergleichbar war. Unterschiede zwischen den drei Mauslinien gab es hinsichtlich der Oberflächendichte von MHC-II, CD86 und CD83. CD83tg B-Zellen wiesen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen sowohl auf stimulierten als auch auf unstimulierten B-Zellen eine signifikant höhere Dichte der Moleküle MHC-II, CD86 und CD83 auf. LPS-aktivierte CD83mu B-Zellen exprimierten hingegen wesentlich weniger MHC-II, CD86 und CD83 auf der Zelloberfläche als die Kontrollgruppe.

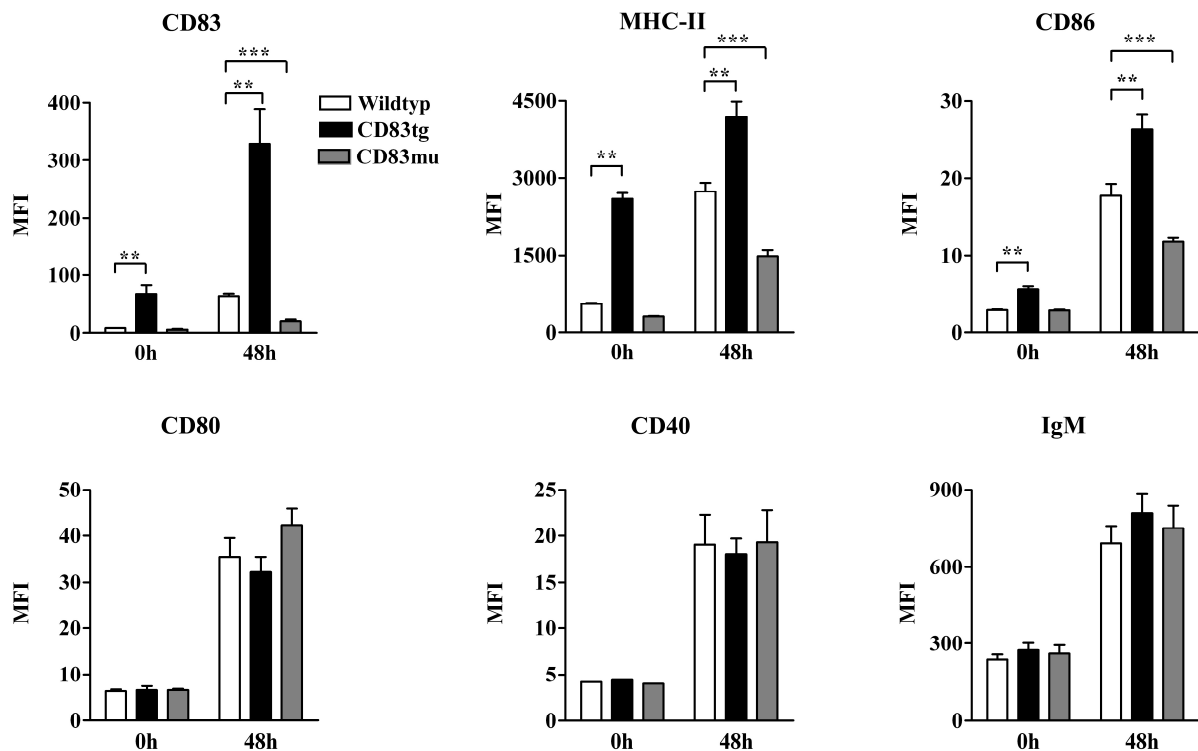


Abb. 3.11: Expression von CD83 korreliert positiv mit der Expression von CD86 und MHC-II auf CD83tg und CD83mu B-Zellen. 2×10^5 naive (0 h) oder 48 h mit LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) stimulierte Milzzellen von Wildtyp (weiß), CD83tg (schwarz) und CD83mu (grau) Mäusen wurden mit einem anti-CD19 Ak und gleichzeitig mit einem Ak gegen CD83, MHC-II, CD86, CD80, CD40 oder IgM gefärbt. 2×10^4 CD19⁺ Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten, (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). MFI = mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*).

Damit ist die verringerte Proliferation und Ig-Antwort CD83tg B-Zellen *in vitro* nicht auf eine erniedrigte Oberflächendichte kostimulatorischer Moleküle zurückzuführen. Ganz im Gegenteil exprimierten CD83tg B-Zellen signifikant mehr und nicht weniger CD86 und MHC-II auf ihrer Zelloberfläche. Umgekehrt exprimierten aktivierte CD83mu B-Zellen, die *in vitro* signifikant mehr Ig in den Überstand produzierten als die Wildtyp Kontrollen, weniger MHC-II und CD86 Moleküle. Diese Analyse zeigt darüber hinaus, dass die Intensität der CD83-Expression auf B-Zellen positiv mit der Expressionsintensität von CD86 und MHC-II korreliert.

3.1.10 Kein Einfluss von CD83 auf die Oberflächenstabilität von MHC-II und CD86

Im vorherigen Abschnitt 3.1.9 wurde gezeigt, dass die Oberflächendichte von CD83 mit der Expressionsintensität von MHC-II und CD86 korreliert. Die Überexpression von CD83 auf B-Zellen führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer gesteigerten Expressionsintensität von MHC-II und CD86, wohingegen CD83-defiziente B-Zellen einen reziproken Phänotyp aufwiesen. Von Kuwano *et al.* [108] wurde 2007 publiziert, dass naive und LPS-aktivierte B-Zellen von CD83^{-/-} Mäusen 25-50 % weniger MHC-II Moleküle auf der Oberfläche exprimieren als Wildtyp Mäuse. Die Autoren konnten zeigen, dass das Fehlen von CD83 eine verstärkte Internalisierung der MHC-II Moleküle von der Zelloberfläche bewirkte. Ob die verminderte Oberflächendichte von MHC-II und CD86 auf CD83mu B-Zellen ebenfalls auf eine gesteigerte Internalisierung zurückzuführen ist und ob *vice versa* die gesteigerte Expression von CD83 auf CD83tg B-Zellen den reziproken Effekt hervorruft, sollte der folgende Versuch zeigen. CD83, CD86, MHC-I und MHC-II Moleküle wurden dazu mit biotinylierten Ak auf LPS-aktivierten B-Zellen von Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäusen gefärbt. Die Bestimmung der Internalisierung erfolgte, indem die biotinylierten Ak, welche zu verschiedenen Zeitpunkten noch auf der Zelloberfläche verblieben waren, mit Steptavidin-Alexa-488 nachgewiesen wurden. Abbildung 3.12-A zeigt, dass es zwischen CD83tg und Wildtyp B-Zellen keinen Unterschied in der Internalisierungskinetik der CD83, CD86 oder MHC-II Moleküle gab. Die Moleküle verschwanden mit einer vergleichbaren Kinetik von der Zelloberfläche. Ebenfalls vergleichbar fiel die Internalisierungskinetik von MHC-I, CD86 und MHC-II bei CD83mu und Wildtyp B-Zellen aus (Abb. 3.12-B). Die für jeden Ansatz bei 4 °C mitgeführte Kontrollfärbung wies keine signifikante Internalisierung der biotinylierten Ak auf.

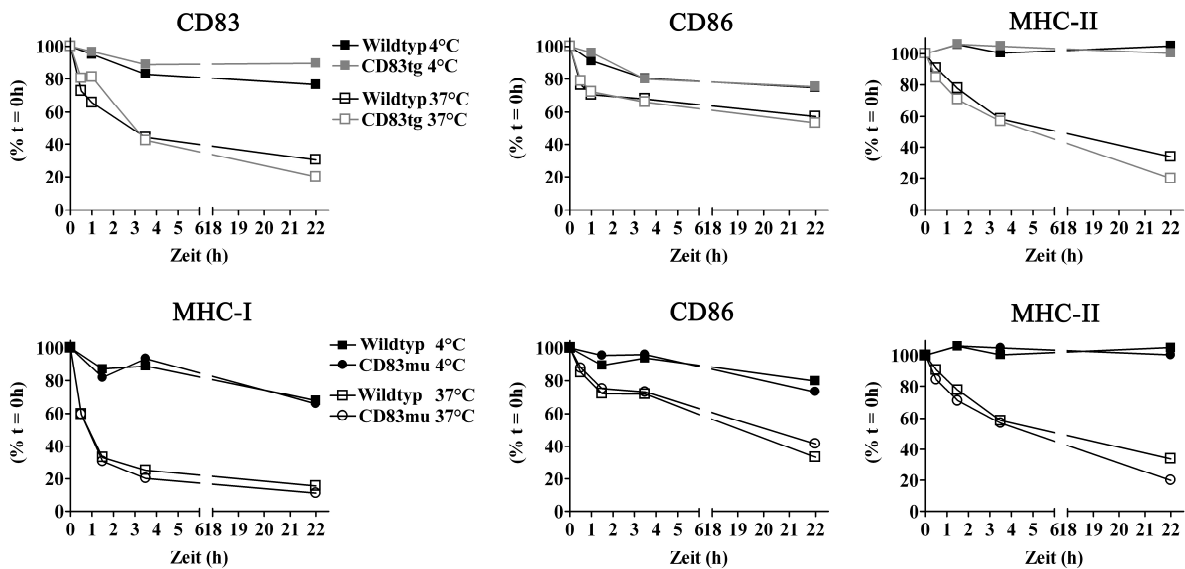


Abb. 3.12: MHC-II und CD86 Moleküle werden mit vergleichbarer Kinetik von der Zelloberfläche von Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen internalisiert. Milzzellen von Wildtyp (Quadrat schwarz: geschlossen und offen), CD83tg (Quadrat grau: geschlossen und offen) und CD83mu (Kreis schwarz: geschlossen und offen) wurden für 24 h mit LPS (10 µg/mL) kultiviert, gewaschen und mit biotinylierten Ak gegen CD83, MHC-I, CD86 oder MHC-II inkubiert. Ungebundene Antikörper wurde durch Waschen entfernt, die Zellen anschließend bei 37 °C (Symbole: offen) und als Kontrolle bei 4 °C (Symbole: geschlossen) inkubiert. Der Nachweis der auf der Oberfläche verbliebenen biotinylierten Ak fand mit Hilfe von Streptavidin-Alexa-488 zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten statt. Zusätzlich wurden die B-Zellen mit einem anti-CD19 Ak gefärbt. 2×10^4 CD19⁺ Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) bei $t = 0$ h wurde auf 100 % gesetzt und die Werte für spätere Zeitpunkte entsprechend kalkuliert. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Dieses Resultat zeigt, dass Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen CD86 und MHC-II Moleküle mit vergleichbarer Kinetik von der Zelloberfläche internalisieren. Ein Einfluss von CD83 auf die Stabilität dieser Moleküle war im Gegensatz zu Kuwano *et al.* [108] nicht zu beobachten.

3.1.11 Untersuchung zum Einfluss von CD83 auf die stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen *in vitro*

T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung APCs, wie DCs oder B-Zellen, die neben der Ag-Präsentation auch die notwendigen kostimulatorischen Signale vermitteln können. Aktivierungsinduzierte Moleküle, die eine kostimulatorische Funktion bei der T-Zell-Aktivierung besitzen, sind zum Beispiel CD80 und CD86 [109]. Auch CD83 wird auf reifen DCs und aktivierten B-Zellen verstärkt exprimiert. Für humane APCs wurde in der

Tat gezeigt, dass die Intensität der CD83-Expression positiv mit der stimulatorischen Kapazität der DCs korreliert [93, 94]. Ob CD83 auch auf murinen APCs eine kostimulatorische Rolle bei der T-Zell-Aktivierung hat, sollte daher als nächstes untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen mit suboptimalen Mengen ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$ - $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$) des Hühnerovalbumin (OVA)-Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen und mit gereinigten CD4⁺ T-Zellen von OT-II Mäusen inkubiert. Der transgene T-Zell-Rezeptor (TCR) der CD4⁺ T-Zellen dieser Tiere ist spezifisch für das im Komplex mit MHC-II (I-A^b) auf der Oberfläche von B-Zellen aus Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäusen präsentierte Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉. Abbildung 3.13 zeigt die Proliferation und IL-2 Sekretion der OT-II T-Zellen nach 48 h Kokultur mit den unterschiedlich stark CD83-exprimierenden B-Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen Unterschiede in der stimulatorischen Kapazität aufwiesen. Die Kokultur mit B-Zellen, die verstärkt CD83 exprimierten, führte im Vergleich zur Stimulation mit Wildtyp B-Zellen zu einer gesteigerten, die Inkubation mit CD83-defizienten B-Zellen hingegen zu einer verminderten Proliferation und IL-2 Sekretion der OT-II T-Zellen (Abb. 3.13).

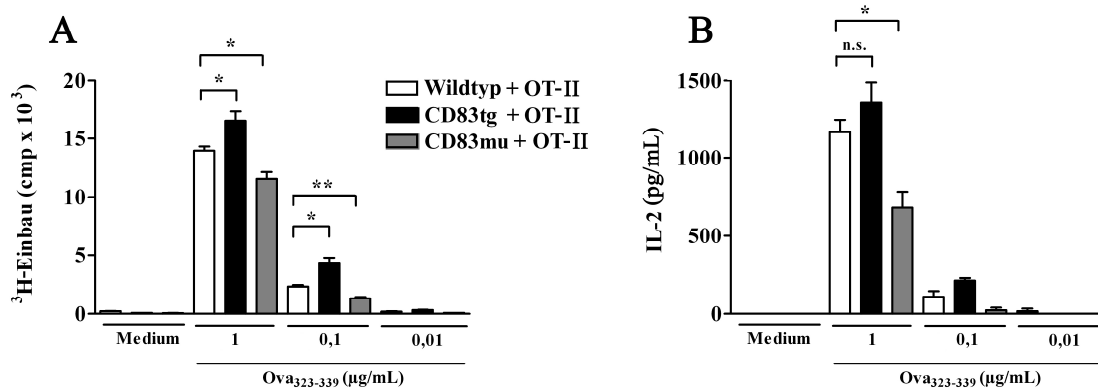


Abb. 3.13: Positive Korrelation zwischen der Intensität der CD83-Expression und der Kapazität CD4⁺ T-Zellen *in vitro* zu stimulieren. 1×10^5 gereinigte B-Zellen aus der Milz von Wildtyp (weiß), CD83tg (schwarz) und CD83mu (grau) Mäusen wurden mit unterschiedlichen Mengen ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $0,01\text{ }\mu\text{g/mL}$) des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen oder verblieben in Medium und wurden anschließend für 48 h mit 1×10^5 gereinigten CD4⁺ OT-II T-Zellen kokultiviert. **A:** Die Proliferation der OT-II T-Zellen wurde nach 48 h durch den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. **B:** Der Nachweis von IL-2 erfolgte nach 48 h Stimulation im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines spezifischen ELISA. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von Dreifachwerten, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Auch die Stimulationskapazität von DCs aus Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäusen wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht [110]. Dabei wurden die DCs mit einem Ag-Überschuss beladen und in die OT-II Zellkultur titriert. Zwar führte die Inkubation mit CD83mu DCs im Vergleich zur Inkubation mit den Wildtyp DCs zu einer etwas schwächeren Proliferation der OT-II T-Zellen, die Kokultur mit CD83tg DCs steigerte die Proliferation der OT-II T-Zellen aber nicht. Ähnliche Versuche wurden mit T-Zellen von OT-I Mäusen durchgeführt. Die CD8⁺ T-Zellen dieser Tiere tragen einen transgenen TCR, der für das im Komplex mit MHC-I (H-2K^b) präsentierte Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ spezifisch ist. Ag-beladene DCs und B-Zellen von Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäusen stimulierten die OT-I T-Zellen hinsichtlich Proliferation und Zytokinsekretion mit vergleichbarer Kapazität [110].

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CD83 keine deutlich kostimulatorische Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen hat. Ausschließlich die Untersuchung von Wildtyp, CD83tg und CD83mu B-Zellen, die mit limitierenden Mengen des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen worden waren, ergab eine positive Korrelation zwischen der Intensität der CD83-Expression und der Kapazität CD4⁺ T-Zellen stimulieren zu können. Ein kostimulatorischer Effekt auf CD8⁺ T-Zellen wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.12 Untersuchung zum Einfluss von CD83 auf die stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu APCs *in vivo*

Um auszuschließen, dass *in vitro*-Artefakte einen kostimulatorischen Effekt von CD83 auf die T-Zell-Aktivierung maskierten, wurde die stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu APCs auf OT-II T-Zellen *in vivo* untersucht. Dazu wurden gereinigte CFSE-markierte OT-II T-Zellen intravenös in Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäuse transferiert. Die Injektion des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ in die rechte Hinterpfote der Mäuse erfolgte einen Tag nach dem Transfer. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die proliferative Antwort der CD4⁺ OT-II T-Zellen auf die mit dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladenen APCs im lokalen Lymphknoten analysiert. Die in Abbildung 3.14 dargestellte CFSE-Verdünnung in den sich teilenden Zellen diente als Parameter für die Proliferation. Die Teilung der T-Zellen setzte im drainierenden Lymphknoten aller drei Wirtsmäuse erst

24 h bis 48 h nach subkutaner Injektion des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ ein. Nach 48 h proliferierten die in CD83tg Mäuse transferierten T-Zellen stärker als die T-Zellen, die in Wildtyp und CD83mu Mäuse injiziert worden waren. Bereits 60 % der transferierten T-Zellen hatten sich vier Mal geteilt. Bei den CD83mu Mäusen waren es hingegen nur 29 % und bei den Wildtyp Mäusen nur 33 % der OT-II T-Zellen, die nach 48 h vier Teilungsschritte durchlaufen hatten. 24 h später befanden sich 50 % der OT-II T-Zellen, denen das Peptid von CD83tg APCs präsentiert wurde in Proliferationsrunde fünf. CD83mu APCs induzierten bei 60 % der transferierten T-Zellen fünf Teilungsschritte während Wildtyp APCs bei 53 % der injizierten T-Zellen zu fünf Teilungen führten.

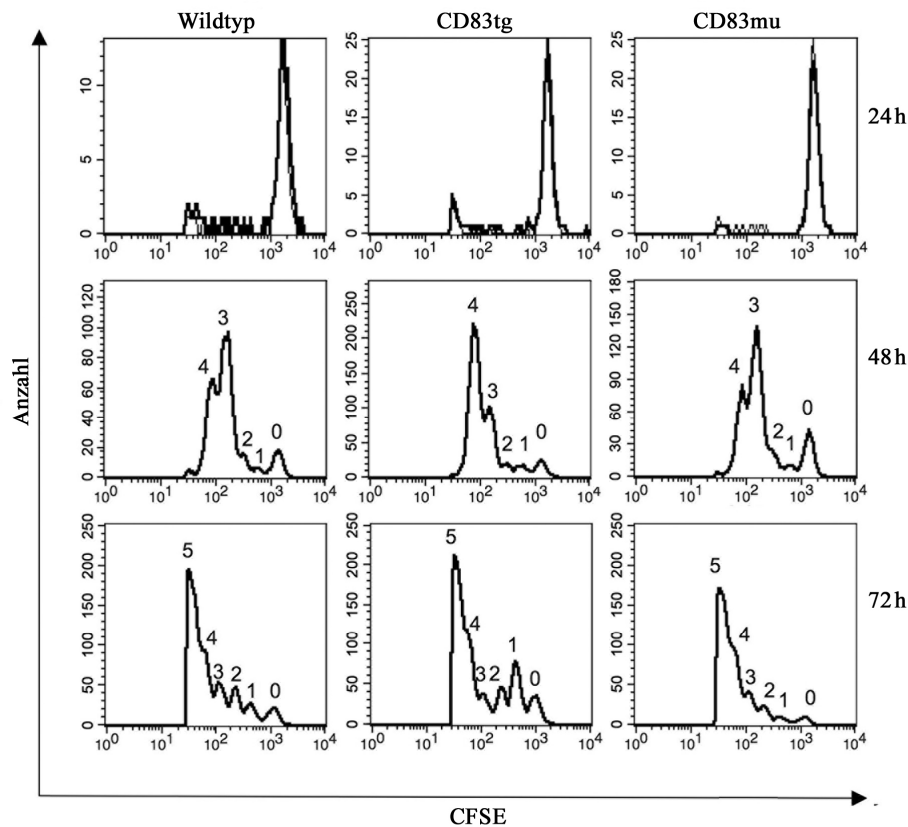


Abb. 3.14: Vergleichbare stimulatorische Kapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu APCs *in vivo*. 5×10^6 gereinigte CFSE-markierte OT-II T-Zellen wurden i.v. in Wildtyp, CD83tg und CD83mu Mäuse transferiert. 24 h nach Transfer erhielten die Mäuse je 30 μ g des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ in die rechte Hinterpfote. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Peptid-Injektion wurden drainierender und kontralateraler Lymphknoten isoliert und die Lymphknotenzellen mit einem anti-CD4 Ak gefärbt. Die Histogramme zeigen die CFSE Verdünnung der CD4⁺ OT-II T-Zellen im drainierenden Lymphknoten. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In den kontralateralen Lymphknoten aller drei Mauslinien wurden zu keinem Zeitpunkt proliferierende OT-II T-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass kein nachhaltiger Unterschied in der Stimulationskapazität von Wildtyp, CD83tg und CD83mu APCs *in vivo* festgestellt werden konnte. Die unterschiedliche Stärke der CD83-Expression führte zu keiner gesteigerten oder verminderten Fähigkeit, CD4⁺ T-Zellen aktivieren zu können. Ausschließlich 48 h nach der Injektion des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ war eine leicht gesteigerte Aktivierung der CD4⁺ OT-II T-Zellen durch CD83tg APCs nachweisbar.

Zusammenfassend wurde keine zentrale kostimulatorische Funktion für CD83 gezeigt. Die Expressionsintensität von CD83 auf APCs hatte keinen Einfluss auf die Stimulationskapazität CD8⁺ T-Zellen. CD83tg APCs zeigten gegenüber Wildtyp APCs eine nur unwesentlich bessere Kapazität CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu stimulieren. Da dieser Unterschied nur bei MHC-II restringierten CD4⁺ T-Zellen zu beobachten war, reflektiert er wahrscheinlich keine stärkere Kostimulation durch CD83 sondern die ebenfalls stärkere Expression von MHC-II auf CD83tg APCs (vgl. Abb. 3.11).

3.1.13 Zusammenfassung Teil I

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression von CD83 nicht mit der Funktion CD83tg T-Zellen *in vitro* interferiert. Gereinigte CD83tg und Wildtyp T-Zellen, die *in vitro* mit anti-CD3 Ak stimuliert wurden, reagierten mit vergleichbarer Proliferation und Zytokinsekretion und ähnlichem maximalen Ca²⁺-Einstrom. *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass die verstärkte CD83-Expression die Funktionalität CD83tg T-Zellen nicht beeinflusst [97]. So war die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf eine *Leishmania major* Infektion in CD83tg und Wildtyp Mäusen vergleichbar. Im Gegensatz dazu interferierte die Überexpression von CD83 mit der Funktion CD83tg B-Zellen. CD83tg B-Zellen zeigten im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen eine reduzierte Proliferation, eine verminderte Ig-Sekretion und einen geringeren maximalen Ca²⁺-Einstrom *in vitro*. Allerdings war die IL-10 Antwort der CD83tg B-Zellen nach LPS-Stimulation *in vitro* im Vergleich zur IL-10 Antwort der Wildtyp B-Zellen gesteigert, wodurch ein genereller Defekt CD83tg B-Zellen ausgeschlossen wurde. Die verminderte Proliferation und Ig-Sekretion der CD83tg B-Zellen wurde nicht durch eine erhöhte Apoptoserate, nicht durch die gesteigerte

IL-10 Sekretion und nicht durch eine reduzierte Expression des BCR oder kostimulatorischer Rezeptoren verursacht. Ganz im Gegenteil war die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und MHC-II sogar gesteigert. Durch die Verwendung gereinigter B-Zellen wurde gezeigt, dass der Phänotyp CD83tg B-Zellen durch die Überexpression von CD83 auf den B-Zellen selbst und nicht auf akzessorischen Zellen verursacht wurde. CD83mu B-Zellen, die eine verminderte CD83-Expression aufwiesen, zeigten einen reziproken Phänotyp. Proliferation und Ig-Sekretion waren im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen gesteigert, die IL-10 Antwort und Expression von CD86 und MHC-II hingegen reduziert. Auch die Analyse der Ig-Antwort beider Mausstämmen *in vivo* zeigte eine dramatisch reduzierte Ag-spezifische Ig-Antwort der CD83tg und eine leicht gesteigerte Ag-spezifische Ig-Antwort der CD83mu Mäuse.

Eine zentrale Rolle für CD83 auf APCs als kostimulatorisches Element der T-Zell-Aktivierung wurde ausgeschlossen. CD83tg APCs zeigten eine nur unwesentlich bessere Stimulation CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Da dieser Unterschied nur bei MHC-II restringierten CD4⁺ T-Zellen zu beobachten war, reflektiert er wahrscheinlich keine stärkere Kostimulation durch CD83 sondern die ebenfalls stärkere Expression von MHC-II auf CD83tg APCs.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle von CD83 bei der Regulation von B-Zell-Funktionen bestätigt. Allerdings birgt der Einsatz genetisch veränderter Mäuse die Gefahr, dass die künstlich verstärkte oder verminderte CD83-Expression bereits während der B-Zell-Entwicklung zur Entstehung dysfunktioneller B-Zellen führt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb die Rolle von CD83 in Wildtyp Mäusen untersucht.

3.2 Teil II: Untersuchungen zur Rolle von CD83 bei der B-Zell-Regulation in Wildtyp Mäusen

3.2.1 Induktion von CD83 auf B-Zellen

3.2.1.1 BCR- oder TLR-Engagement induziert die Expression von CD83 auf B-Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass im Verlauf einer Infektion mit *Leishmania major* B-Zellen die dominante CD83⁺ Zellpopulation darstellen [97]. Um die Kinetik der

CD83-Expression auf aktivierten B-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurden Milzzellen mit dem TLR-Agonisten LPS stimuliert, und CD83 anschließend zu bestimmten Zeitpunkten durchflusszytometrisch auf der Oberfläche CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen. Abbildung 3.15 zeigt, dass CD19⁺ Zellen bereits 3 h nach TLR-Engagement durch LPS verstärkt CD83 auf der Zelloberfläche exprimierten.

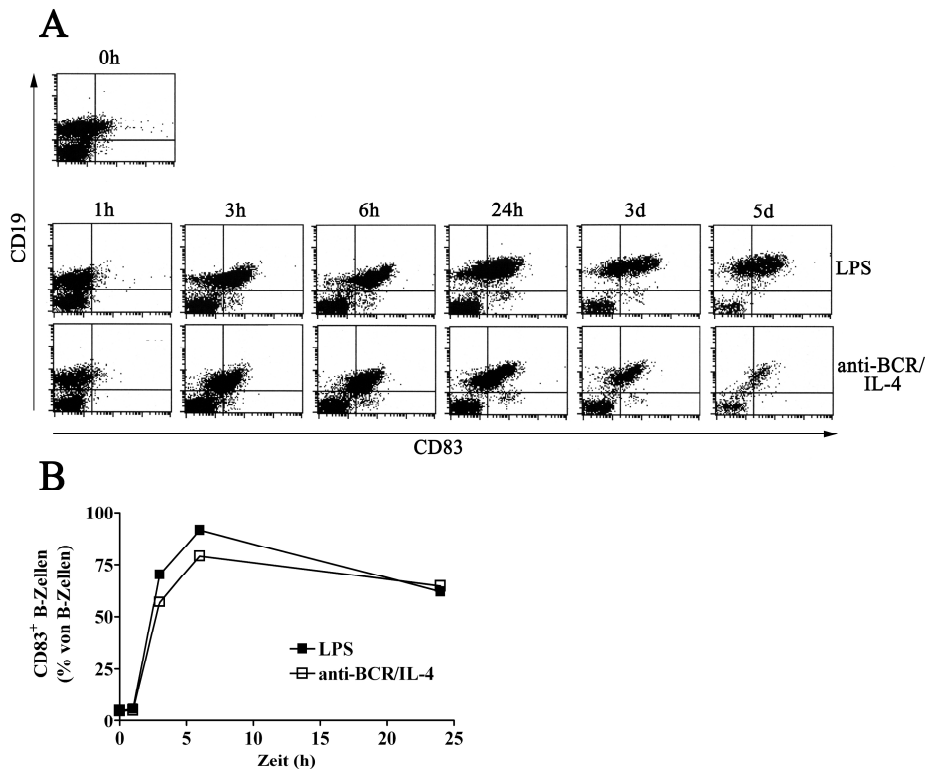


Abb. 3.15: BCR- oder TLR-Engagement induziert CD83 auf B-Zellen. Milzzellen (2×10^6 /mL) von Wildtyp Mäusen wurden mit LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) oder anti-BCR Ak ($1 \mu\text{g/mL}$) in Kombination mit IL-4 (20 ng/mL) stimuliert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem Ak gegen CD19 und einem Ak gegen CD83 gefärbt. Je 2×10^4 Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. **A:** Im Dotplot sind lebende Lymphozyten gezeigt. Die Färbung mit anti-CD19 Ak ist auf der y-Achse, die mit anti-CD83 Ak auf der x-Achse dargestellt. **B:** Gezeigt sind % CD83⁺ B-Zellen von lebenden B-Zellen nach LPS- (schwarz) oder anti-BCR und IL-4-Stimulation (weiß), zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Nach 6 h war die Mehrheit der B-Zellen (92 %) positiv für CD83 (Abb. 3.15-B) und eine stabile Expression von CD83 auf diesen B-Zellen konnte für die folgenden fünf Tage beobachtet werden (Abb. 3.15-A). Die B-Zell-spezifische Stimulation der Zellen mit anti-BCR Ak und IL-4 führte zu einer mit der LPS-Stimulation vergleichbaren CD83-Expressionskinetik (Abb. 3.15-A). Die Aktivierung der B-Zellen durch anti-BCR Ak und IL-4 induzierte jedoch eine etwas geringere Frequenz CD83⁺ B-Zellen. So waren nach 6 h Stimulation nur 79 % der B-Zellen positiv für CD83 (Abb. 3.15-B).

3.2.1.2 TCR-Engagement induziert die Expression von CD83 auf B-Zellen

Im Abschnitt 3.2.1.1 wurde gezeigt, dass eine B-Zell-spezifische Stimulation durch TLR- oder BCR-Engagement die Expression von CD83 auf Wildtyp B-Zellen *in vitro* induziert. *In vivo* führte die Infektion von Wildtyp Mäusen mit *Leishmania major* oder *Trypanosoma cruzi* ebenfalls zu einer Induktion von CD83 auf den B-Zellen [97]. Ob auch ein T-Zell-spezifischer Stimulus die Expression von CD83 auf B-Zellen *in vitro* induziert, sollte der nächste Versuch zeigen. OT-II Mäusen wurde subkutan das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ injiziert. Wie bereits in Abschnitt 3.1.11 beschrieben, ist der transgene TCR der CD4⁺ OT-II T-Zellen spezifisch für das im Komplex mit MHC-II (I-A^b) präsentierte Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉. 2 h, 6 h, 24 h und 48 h nach Peptid-Injektion wurden drainierender und kontralateraler Lymphknoten der Mäuse präpariert und die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und die Expression von CD83 auf CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen analysiert (Abb. 3.16). Bereits 2 h nach Verabreichung des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ waren 90 % der CD4⁺ T-Zellen im drainierenden Lymphknoten positiv für CD69 und somit aktiviert. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte nur nach Applikation des relevanten Peptids, nicht aber nach Injektion des irrelevanten Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ und war somit spezifisch. Zu Beginn waren nur die T-Zellen im drainierenden, nicht aber die T-Zellen im kontralateralen Lymphknoten aktiviert. Die Aktivierung der T-Zellen war somit lokal. Die T-Zell-Population blieb bis 24 h nach Peptid Injektion stark aktiviert. Die steigende Frequenz aktivierter CD4⁺ T-Zellen im kontralateralen Lymphknoten war auf eine systemische Verteilung des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ im Verlauf des Versuchs zurückzuführen. Die im drainierenden Lymphknoten vorhandenen B-Zellen waren ebenfalls aktiviert, da auch sie CD69 exprimierten. Als Folge der Aktivierung war eine sehr schnelle (2 h nach Injektion des Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉) Induktion von CD83 auf 80 % der CD19⁺ Zellen zu beobachten. Erst nach 6 h, beziehungsweise 24 h, wurden 5 bis 10 % der T-Zellen positiv für CD83.

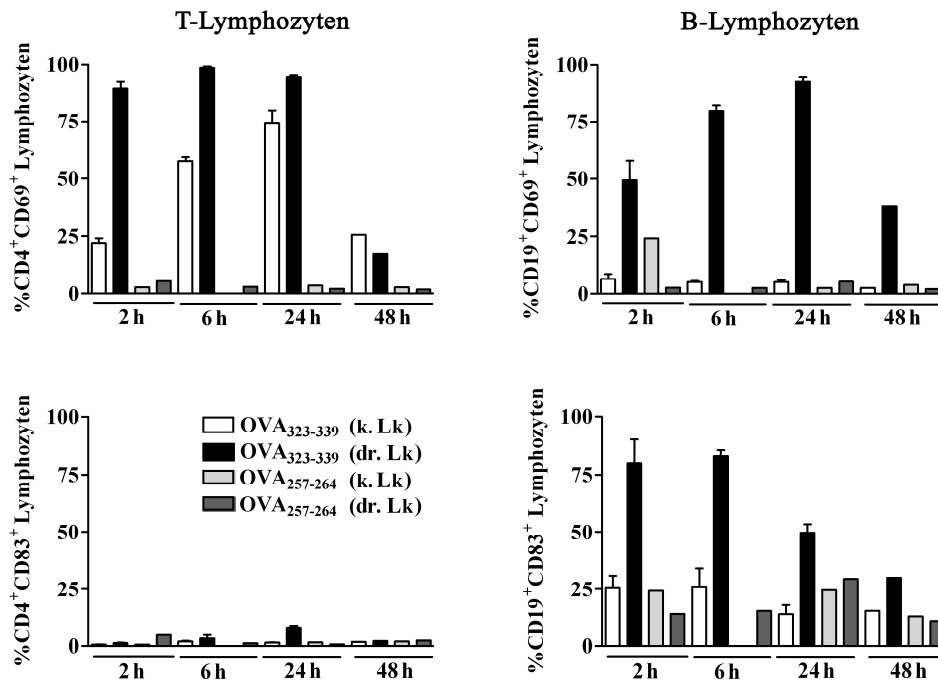


Abb. 3.16: TCR-Engagement induziert die Expression von CD83 auf B-Zellen *in vivo*. OT-II Mäusen wurde subkutan das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ (30 µg) in die rechte Hinterpfote injiziert (dr. Lk: schwarz; k. Lk: weiß). Die Kontrollgruppe erhielt das irrelevante Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (30 µg) (dr. Lk: dunkelgrau; k. Lk: hellgrau). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden drainierende und kontralaterale Lymphknoten präpariert. Die Lymphknotenzellen wurden dreifach mit anti-CD83, anti-CD69 und entweder anti-CD4 (T-Lymphozyten) oder anti-CD19 (B-Lymphozyten) Ak gefärbt. Durchflusszytometrisch wurden je 2×10^4 CD4⁺ oder CD19⁺ Zellen analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten (k. = kontralateral; dr. = drainierend; Lk = Lymphknoten).

Dieser Versuch zeigt, dass die spezifische Stimulation von T-Zellen auch zur Aktivierung von benachbarten B-Zellen führt. Diese Aktivierung wird durch die Expression von CD69 und CD83 auf den B-Zellen sichtbar. Allerdings ist der Mechanismus, der zu diesem Phänomen führt, unbekannt. Ein zellkontaktabhängiger Mechanismus ist wahrscheinlich, da die Inkubation von B-Zellen mit dem Kulturüberstand OVA₃₂₃₋₃₃₉-stimulierter OT-II Milzzellen, der vermeintlich aktivierende, lösliche Faktoren enthält, keine B-Zell-Aktivierung bewirkte (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.3 Aktivierung von Nachbar-B-Zellen ist unabhängig von der Interaktion zwischen Peptid:MHC-II-Komplex und Ag-spezifischer T-Zelle

T-Lymphozyten und APCs, wie zum Beispiel B-Zellen, können miteinander in Kontakt treten, indem der TCR der T-Zelle an seinen spezifischen Peptid:MHC-II-Komplex auf der Oberfläche der B-Zelle bindet. Zusätzlich heftet sich der CD4-Korezeptor der T-Zelle an

das MHC-II Molekül der B-Zelle und verstärkt das durch die Interaktion des TCR mit dem Peptid:MHC-II-Liganden generierte und in die T-Zelle transduzierte Signal. Die spezifische Interaktion zwischen T- und B-Zelle induziert auf der T-Zelle die Expression des CD40L. Dieser bindet an den CD40-Rezeptor auf der B-Zelle und fördert deren Aktivierung. Ob diese Wechselwirkungen für die Expression von CD83 auf der B-Zelle nach T-Zell-spezifischer Stimulation von Bedeutung sind, sollte der folgende Versuch klären. Gereinigte BALB/c B-Zellen wurden entweder mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid beladenen OT-II Milzzellen, mit LPS und unbeladenen OT-II Milzzellen als Positivkontrolle oder mit unbeladenen OT-II Milzzellen als Negativkontrolle kultiviert. Der transgene TCR der CD4⁺ OT-II T-Zellen ist spezifisch für den Komplex aus MHC-II (I-A^b) und dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉, der von C57BL/6 und OT-II APCs, wie DCs oder B-Zellen exprimiert wird. BALB/c Mäuse haben den Haplotyp H-2^d. Der Komplex aus MHC-II (I-A^d) und dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ wird von dem OT-II TCR nicht gebunden. Die aus den BALB/c Mäusen stammenden B-Zellen konnten somit über ihre MHC-II Moleküle keinen Kontakt mit den spezifischen TCRs der OT-II T-Zellen aufnehmen. Die B-Zellen aus den BALB/c oder OT-II Mäusen wurden bei der Durchflusszytometrie durch den Nachweis der kongenen Marker IgM^a (BALB/c) und IgM^b (OT-II und C57BL/6) unterschieden. So konnte die Expression von CD83 und CD69 auf BALB/c und OT-II B-Zellen, die aus derselben Kultur stammten, gemessen werden. Nach 24 h beziehungsweise 48 h waren 6,5 % beziehungsweise 11 % der CD4⁺ OT-II T-Zellen, denen das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ präsentiert wurde, positiv für CD69 (Abb. 3.17). Eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation hatte somit stattgefunden. Der Aktivierungsstand der BALB/c und OT-II B-Zellen war in jeder Situation und zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. Zwischen 5 % (24 h) und 8 % (48 h) der BALB/c beziehungsweise OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid beladenen OT-II B-Zellen exprimierten CD69. In derselben Kultur waren nach 24 h 6 % und nach 48 h 10 % der BALB/c beziehungsweise OT-II B-Zellen positiv für CD83. Als Positivkontrolle wurden die Zellen polyklonal mit LPS aktiviert. Nach 24 h exprimierten 20 % bis 25 % der BALB/c oder OT-II B-Zellen CD69. Eine ebenfalls vergleichbare Expression des aktivierungs-induzierten CD83 war in beiden B-Zell-Gruppen detektierbar.

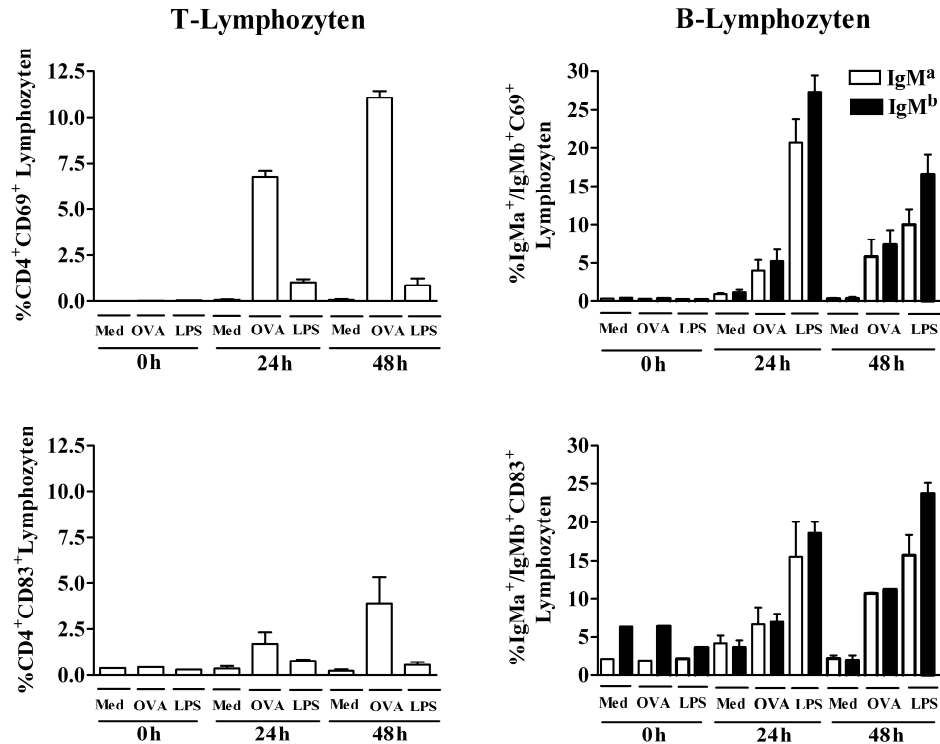


Abb. 3.17: Die Aktivierung von Nachbar-B-Zellen ist unabhängig von der Interaktion zwischen Peptid:MHC-II-Komplex und Ag-spezifischer T-Zelle. 1×10^6 gereinigte BALB/c B-Zellen (IgM^a) wurden mit 1×10^6 OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (1 $\mu\text{g/mL}$) beladenen OT-II Milzzellen (IgM^b) kultiviert. Die Stimulation mit LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) erfolgte als Positivkontrolle, als Negativkontrolle verblieben die Zellen in Medium (Med). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet. Die Analyse der T-Lymphozyten erfolgte durch eine Färbung mit anti-CD4 und anti-CD69 oder anti-CD83 Ak. Zur Unterscheidung der B-Lymphozyten wurde zusätzlich zur Färbung mit anti-CD69 oder anti-CD83 Ak gegen die kongenen Marker IgM^a (weiß) und IgM^b (schwarz) gefärbt. Die Analyse von je 1×10^4 CD4^+ , IgM^{a+} oder IgM^{b+} Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Diese Beobachtung zeigt, dass auch auf B-Zellen, die nicht in der Lage sind über ihre MHC-II Moleküle mit Ag-spezifischen T-Zellen in Kontakt zu treten, CD83 induziert wird.

3.2.2 Engagement von CD83 *in vivo*

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass *in vitro*- und *in vivo*-aktivierte B-Zellen CD83 verstärkt exprimieren. Dabei wird CD83 als Folge von i) BCR-Engagement (Abb. 3.15), ii) TLR-Engagement (Abb. 3.15) und iii) Nachbar-T-Zell-Stimulation (Abb. 3.17 und 3.18) auf den B-Zellen induziert. Diese Befunde, zusammen mit den im CD83tg- und CD83mu-System gewonnenen Resultaten, lassen auf eine biologische Funktion von CD83 in der B-Zell-Stimulation schließen. Um

zu zeigen, dass natürlich exprimiertes CD83 einen regulatorischen Einfluss auf die B-Zell-Funktion hat, wurde CD83 in den folgenden Abschnitten, während der Immunisierung mit verschiedenen Modell-Ag, durch den Einsatz eines anti-CD83 mAk, in Wildtyp Mäusen engagiert.

3.2.2.1 CD83-Engagement hat keinen Einfluss auf die Ig-Antwort gegen

T-Zell-abhängige Ag

Um den Einfluss des CD83-Engagements auf die TD Ig-Antwort von Wildtyp Mäusen zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit dem TD-Ag OVA in Kombination mit komplettem Freund's Adjuvant immunisiert. Einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung wurden zusätzlich 100 µg anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig i.p. verabreicht.

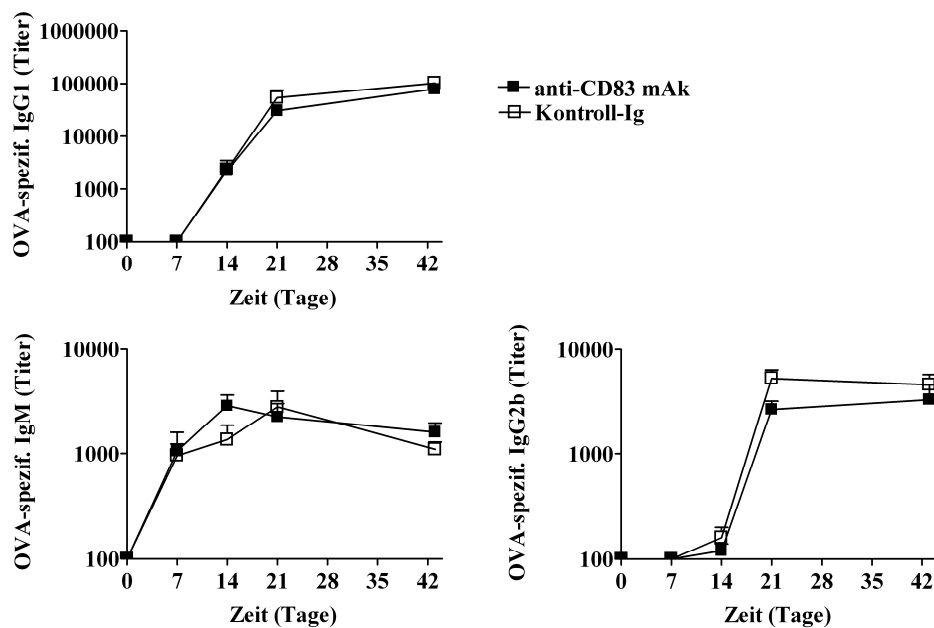


Abb. 3.18: Engagement von CD83 hat keinen Effekt auf die Ig-Antwort gegen das TD Modell-Ag OVA. Wildtyp Mäuse wurden mit dem TD-Ag OVA (200 µg) in komplettem Freund's Adjuvant immunisiert. Die i.p. Injektion von 100 µg anti-CD83 mAk (schwarz) oder Kontroll-Ig (Ratten IgG; weiß) erfolgte einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung. Nach vier Wochen wurde OVA ein zweites Mal (200 µg) in inkomplettem Freund's Adjuvant i.p. appliziert. OVA-spezifisches IgG1, IgM und IgG2b wurden mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten im Serum bestimmt. Gezeigt sind die gemittelten Titer und SEM von je fünf analysierten Seren.

Abbildung 3.18 zeigt, dass die Mäuse, die anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig erhalten hatten, keinen Unterschied in der Ig-Antwort aufwiesen. Die Serumtiter für

OVA-spezifisches IgG1, IgM und IgG2b waren in beiden Gruppen vergleichbar. Auch die Immunisierung mit dem TD-Ag DNP-KLH in Gegenwart von anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig führte zu vergleichbaren Ig-Titern (Daten nicht gezeigt). Das Engagement von CD83 hatte somit keinen Effekt auf die humorale Antwort von Wildtyp Mäusen, die mit TD Modell-Ags immunisiert wurden.

3.2.2.2 CD83-Engagement hat einen dosisabhängigen Effekt auf die IgG1-Antwort gegen T-Zell-unabhängige Ag

Ob das Engagement von CD83, während einer TI-Immunisierung, einen Einfluss auf die Ig-Antwort von Wildtyp Mäusen hat, sollte der nächste Versuch zeigen. Wildtyp Mäuse wurden mit dem TI-Ag NIP-Ficoll immunisiert. Die Injektion verschiedener Konzentrationen anti-CD83 mAk (25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg, 3,12 µg) erfolgte 24 h vor und 24 h nach der Immunisierung. Als Kontrolle wurden 25 µg Kontroll-Ig (Ratten IgG) verabreicht. Abbildung 3.19 zeigt, dass die Injektion von anti-CD83 mAk *in vivo* die Menge an NIP-spezifischem IgG1, nicht aber die Menge an NIP-spezifischem IgM und IgG3 im Serum steigerte.

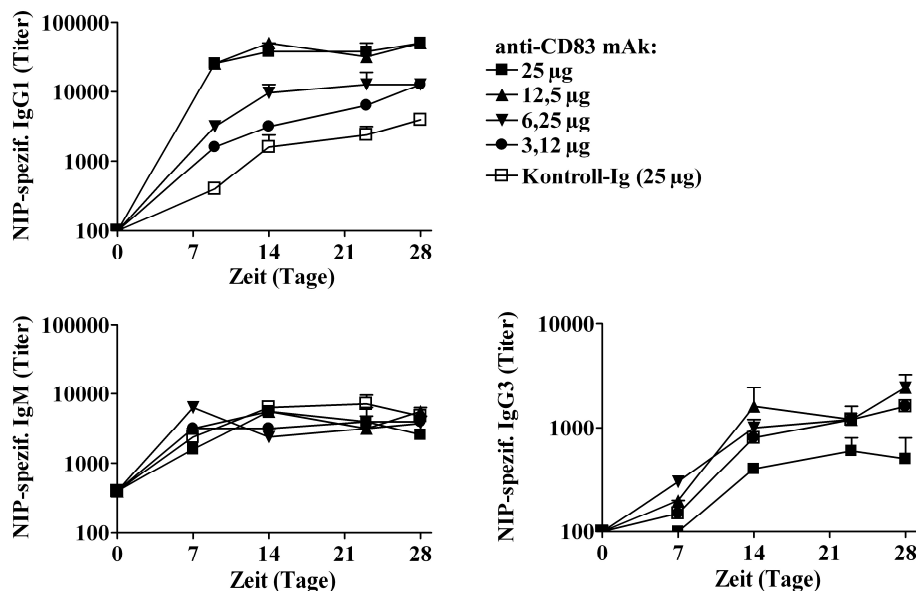


Abb. 3.19: Engagement von CD83 hat einen dosisabhängigen Effekt auf die T-Zell-unabhängige IgG1-Antwort. Wildtyp Mäuse wurden mit dem TI-Ag NIP-Ficoll in PBS (200 µg) i.p. immunisiert. Die i.p. Injektion unterschiedlicher Mengen anti-CD83 mAk (geschlossene Symbole) oder Kontroll-Ig (25 µg; offenes Symbol) erfolgte einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung. NIP-spezifisches IgG1, IgM und IgG3 wurden mittels ELISA zu den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten im Serum bestimmt. Gezeigt sind die gemittelten Titer und SEM von je vier analysierten Seren.

Dabei war die biologische Aktivität des anti-CD83 mAk dosisabhängig. Bereits 3,12 µg anti-CD83 mAk genügten, um im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der IgG1-Antwort zu erreichen. Die Gabe von 12,5 µg anti-CD83 mAk führte im Vergleich zum Kontroll-Ig zu einer 100-fachen Steigerung der IgG1-Antwort.

Dieses Resultat zeigt, dass das Engagement von CD83 während einer TI-Immunisierung einen deutlichen Effekt auf die Ig-Antwort hat. Die Injektion von anti-CD83 mAk führte zu einer dosisabhängigen, bis zu 100-fachen Steigerung, der IgG1-Antwort.

Da das Engagement von CD83 ausschließlich zur Steigerung von NIP-spezifischem IgG1 führte und es sich bei dem anti-CD83 mAk um einen Antikörper aus der Ratte mit dem Isotyp IgG1 handelt und Ratten IgG1 und Maus IgG1 kreuzreagieren, musste ausgeschlossen werden, dass der injizierte anti-CD83 mAk mit dem Nachweis von Ag-spezifischen IgG1 im Serum interferierte. Dazu wurde naives Wildtyp Serum mit 10 µg/mL anti-CD83 mAk versetzt und anschließend im NIP-spezifischen IgG1 ELISA analysiert (Abb. 3.20-A). Das mit dem anti-CD83 mAk versetzte Serum wies, im Vergleich zum naiven Kontroll-Serum, keine Steigerung der optischen Dichte bei OD_{450 nm} im ELISA auf. In der mitgeführten Positivkontrolle, Serum (d₂₁) einer in Gegenwart von anti-CD83 mAk mit NIP-Ficoll immunisierten Maus, konnte hingegen NIP-spezifisches IgG1 nachgewiesen werden.

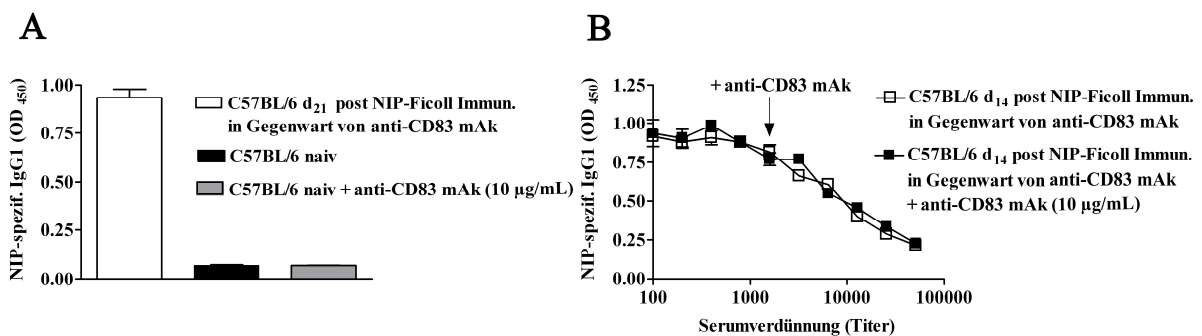


Abb. 3.20: Kein Nachweis von anti-CD83 mAk im NIP-spezifischen IgG1 ELISA. **A:** Das Serum (d₂₁) einer in Gegenwart von anti-CD83 mAk mit NIP-Ficoll immunisierten C57BL/6 Maus (weiß), das Serum einer naiven C57BL/6 Maus (schwarz) und das Serum einer naiven C57BL/6 Maus, dass mit 10 µg/mL anti-CD83 mAk versetzt wurde (grau), wurden im NIP-spezifischen IgG1 ELISA analysiert. Dargestellt sind die mittlere OD_{450 nm} und SEM von Duplikaten. **B:** Das Serum (d₁₄) einer in Gegenwart von anti-CD83 mAk mit NIP-Ficoll immunisierten C57BL/6 Maus (weiß) und das Serum (d₁₄) einer in Gegenwart von anti-CD83 mAk mit NIP-Ficoll immunisierten C57BL/6 Maus, dass mit 10 µg/mL anti-CD83 mAk versetzt wurde (schwarz), wurden im NIP-spezifischen IgG1 ELISA analysiert. Gezeigt sind die mittlere OD_{450 nm} und SEM (y-Achse) von Duplikaten bei entsprechender Serumverdünnung (x-Achse).

In einem zweiten Ansatz wurde Serum (d₁₄) einer in Gegenwart des anti-CD83 mAk mit NIP-Ficoll immunisierten Wildtyp Maus mit 10 µg/mL anti-CD83 mAk versetzt und ebenfalls im NIP-spezifischen IgG1 ELISA untersucht. Auch hier induzierte die Zugabe von anti-CD83 mAk kein zusätzliches Signal im NIP-spezifischen ELISA (Abb. 3.20-B). Diese Resultate zeigen, dass die gesteigerte NIP-spezifische IgG1-Antwort nicht durch einen artifiziellen Nachweis des applizierten anti-CD83 mAk im Serum zustande kommt. Auch zwei weitere anti-CD83 mAk führten zu einer Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls gegen einen Artefakt spricht.

3.2.2.3 Steigerung von NIP-spezifischem IgG1 durch gleichzeitiges Engagement von CD83 und BCR *in vivo*

Die Injektion des anti-CD83 mAk einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung mit NIP-Ficoll führte zu einer Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort. Um herauszufinden, ob ein hoher anti-CD83 mAk Serumspiegel während der Immunisierung für die Steigerung der IgG1-Antwort wichtig ist oder ob die Applikation des anti-CD83 mAk vor oder nach der eigentlichen B-Zell-Aktivierung bereits einen Effekt auf die Ag-spezifische IgG1-Antwort ausübt, erhielten Wildtyp Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten vor, nach oder vor und nach der Immunisierung 20 µg des anti-CD83 mAk. Abbildung 3.21-A zeigt, dass einmalig i.p. applizierter anti-CD83 mAk bereits 4 h nach der Injektion zu fast 100 % im Serum wieder zu finden war. Ein Nachweis des anti-CD83 mAk in der Zirkulation war bis zwei Tage nach Injektion möglich. Die Injektion von 20 µg anti-CD83 mAk zu verschiedenen Zeitpunkten vor, nach oder vor und nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung führte zu unterschiedlich starken IgG1-Antworten (Abb. 3.21-B). Erfolgte die Gabe des anti-CD83 mAk sechs oder zwei Tage vor der Immunisierung, so konnte keine Steigerung der IgG1-Antwort festgestellt werden, da der anti-CD83 mAk zum Zeitpunkt der Immunisierung nur noch in sehr geringer Konzentration, oder gar nicht mehr im Serum vorhanden war (vgl. Abb. 3.21-A). Erfolgte die Injektion des anti-CD83 mAk einen oder sechs Tage nach der Immunisierung kam es ebenfalls zu keiner Modulation der IgG1-Antwort. Die Applikation des anti-CD83 mAk hatte zu spät nach der B-Zell-Aktivierung durch die Immunisierung stattgefunden. Wurde der anti-CD83 mAk jedoch frühestens 24 h vor und spätestens 12 h nach der Immunisierung verabreicht, war eine deutliche, bis zu 18-fach gesteigerte,

Ag-spezifische IgG1-Antwort messbar (Abb. 3.21-B). Das zeigt, dass ein hoher anti-CD83 mAk Serumspiegel im Moment der Immunisierung und B-Zell-Aktivierung für die Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort wichtig ist.

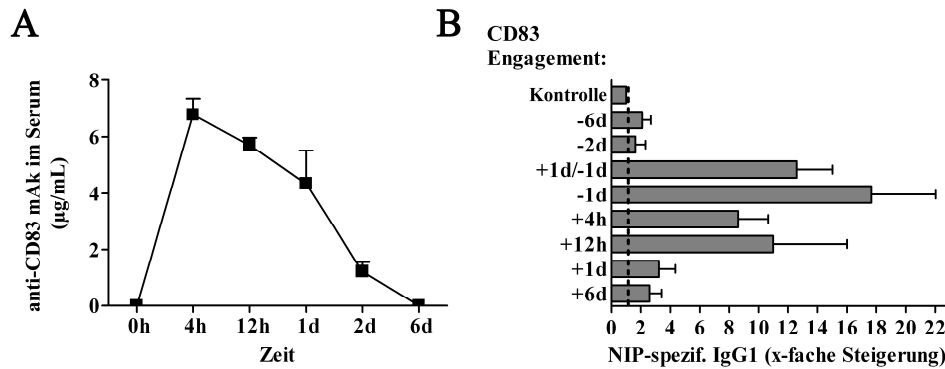


Abb. 3.21: Gleichzeitiges Engagement von CD83 und BCR führt zu optimaler Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort. **A:** Wildtyp Mäusen wurde anti-CD83 mAk (20 µg) i.p. verabreicht. Der Nachweis des injizierten anti-CD83 mAk im Serum der C57BL/6 Mäuse erfolgte mittels spezifischem ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM von je zwei analysierten Seren. **B:** Wildtyp Mäusen wurde anti-CD83 mAk (20 µg) zu den angegebenen Zeitpunkten vor (-), nach (+) oder vor und nach (-/+) der TI-Immunisierung mit NIP-Ficoll i.p. verabreicht. NIP-spezifisches IgG1 wurde am Tag 14 nach Immunisierung mittels ELISA im Serum analysiert. Die Ergebnisse sind als x-fache Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort gegenüber der Kontrollgruppe, die ausschließlich NIP-Ficoll erhalten hatte, dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Weder das Engagement von CD83 auf B-Zellen oder anderen CD83-positiven Zellen vor der eigentlichen B-Zell-Aktivierung noch die Modulation bereits aktivierter B-Zellen durch den anti-CD83 mAk hatten einen Einfluss auf die Ag-spezifische IgG1-Antwort.

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine optimale Steigerung der IgG1-Antwort durch simultanes Engagement von CD83 und BCR erreicht wird und der biologische Effekt des anti-CD83 mAk abhängig von seiner Konzentration im Serum zum Zeitpunkt der Immunisierung und anschließenden B-Zell-Aktivierung ist.

3.2.2.4 Engagement von CD83 auf B-Zellen führt zur Steigerung der IgG1-Antwort

Die in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass i) CD83 verstärkt auf aktivierten B-Zellen *in vitro* (Abschnitt 3.2.1.1) und *in vivo* (Abschnitt 3.2.1.2) exprimiert wird, dass ii) die Überexpression von CD83 auf B-Zellen mit der humoralen Antwort *in vitro* (Abschnitt 3.1.3) und *in vivo* (Abschnitt 3.1.6) interferiert und dass iii) das gleichzeitige Engagement von CD83 und BCR zu einer

Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort führt (Abschnitt 3.2.2.3). Die Vermutung liegt nahe, dass der anti-CD83 mAk CD83 auf der B-Zelle selbst engagiert und dadurch die Funktion der B-Zelle verändert. CD83 wird allerdings nicht nur auf B-Zellen, sondern auch auf vielen anderen Leukozyten, wie zum Beispiel DCs und aktivierten T-Zellen, TECs und noch nicht charakterisierten Zellen im Gehirn exprimiert [111]. Der anti-CD83 mAk würde *in vivo* an alle diese CD83⁺ Zellen binden. Deshalb sollte geklärt werden, welche CD83⁺ Zellpopulation für den biologischen Effekt des CD83-Engagements verantwortlich ist. Dazu wurden gemischte Knochenmarkchimären hergestellt, bei denen CD83 selektiv auf den B-Zellen fehlt. Abbildung 3.22 zeigt schematisch, wie die gemischten Chimären hergestellt wurden. Als Wirtsmäuse wurden B-Zell-defiziente JHT Mäuse verwendet. In diesen Mäusen können sich keine B-Zellen entwickeln, da ihnen die J (*joining*)-Gen-Segmente, die für die somatische Rekombination der schweren Kette wichtig sind, fehlen. Bereits im Knochenmark kommt es so zu einem Abbruch der B-Zell-Differenzierung [102]. Das blutbildende System dieser JHT Mäuse wurde durch eine letale Bestrahlungsdosis zerstört. Anschließend wurde diesen Mäusen eine Mischung aus 70 % JHT (CD83-kompetent) und 30 % CD83mu Knochenmark (1) transferiert (Abb. 3.22). Aus den 70 % JHT Knochenmark konnten sich keine B-Zellen entwickeln. Aus den 30 % CD83mu Knochenmark wuchsen B-Zellen heran, die den Lebensraum der B-Zellen auffüllten, d.h. 100 % der B-Zellen stellten. Alle B-Zellen waren dadurch CD83 defizient. Alle anderen Zellen des hämatopoetischen Systems, wie zum Beispiel T-Zellen oder DCs, entstanden mehrheitlich (70 %) aus JHT Knochenmark und waren somit kompetent CD83 nach Aktivierung verstärkt zu exprimieren. Den Kontroll-Chimären (2) wurde Wildtyp anstelle von CD83mu-Knochenmark transferiert, so dass die B-Zellen in diesen Chimären selektiv aus CD83-kompetentem Knochenmark heranreiften (Abb. 3.22).

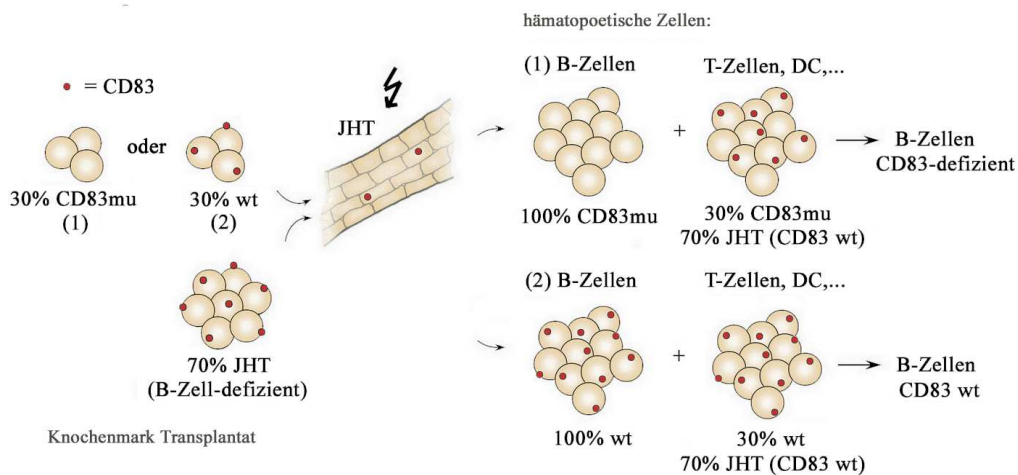


Abb. 3.22: Herstellung gemischter Chimären mit CD83-defizienten B-Zellen. Letal bestrahlten JHT Mäusen wurden $4,2 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von JHT Mäusen und entweder $1,8 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von CD83mu Mäusen (1) oder Wildtyp (wt) Mäusen (2) intravenös transferiert. Die B-Zellen der Chimäre (1) entwickelten sich zu 100 % aus CD83mu Knochenmark und waren somit CD83-defizient. Alle anderen Zellen des hämatopoetischen Systems entstanden mehrheitlich aus JHT (CD83-kompetentem) Knochenmark. Die B-Zellen der Chimäre (2) entwickelten sich zu 100 % aus Wildtyp Knochenmark.

Um sicherzustellen, dass das injizierte Knochenmark richtig und vollständig in den Chimären angewachsen war, wurde acht Wochen nach Transfer die Expression von CD83 auf $CD11c^+$ DCs und $CD19^+$ B-Zellen der Milz untersucht (Abb. 3.23). Bei beiden Chimärengruppen konnte eine Expression von CD83 auf $CD11c^+$ Milz DCs gemessen werden (Abb. 3.23). Chimäre (1), die 30 % CD83mu und 70 % JHT Knochenmark erhalten hatte, wies eine DC Population auf, die CD83 nur schwach exprimierte und bei der Wildtyp Chimäre (2) fehlte und somit die vom CD83mu Knochenmark abstammende DC Population reflektierte. Diese Messung kontrollierte exemplarisch die normale CD83-Expression auf nicht-B-Zellen in beiden Chimären.

Die Analyse der Expression von CD83 auf naiven und LPS-aktivierten $CD19^+$ B-Zellen ergab, dass die B-Zellen der Chimäre (2), welche aus Wildtyp und somit CD83-kompetentem Knochenmark herangereift waren, nach Aktivierung verstärkt CD83 exprimierten (Abb. 3.23). Die B-Zellen der Chimäre (1), die aus CD83-defizientem Knochenmark entstanden waren, zeigten hingegen keine CD83-Expression.

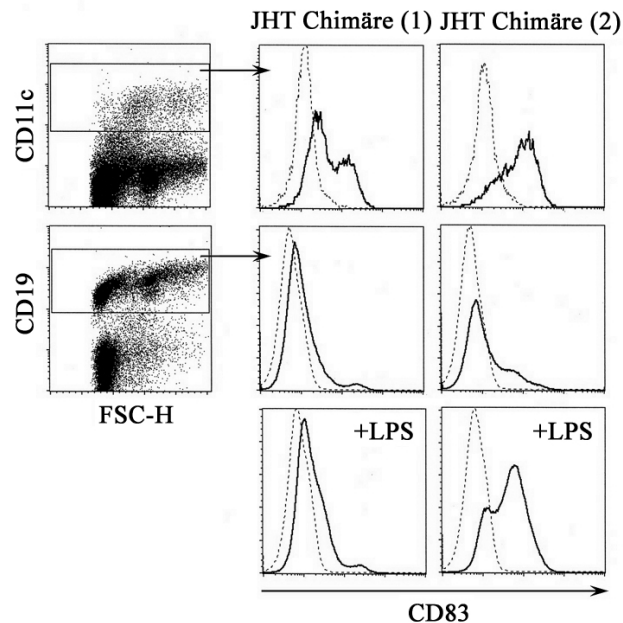


Abb. 3.23: Keine Expression von CD83 auf B-Zellen der Chimäre (1). Acht Wochen nach Knochenmarkstransfer wurde von je zwei Chimären pro Gruppe die Milz präpariert. Eine Inkubation der Milzzellen ($2 \times 10^6/\text{mL}$) erfolgte für 24 h mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) oder Medium. Anschließend wurde die Expression von CD83 auf CD11c^+ DCs und naiven oder aktivierten CD19^+ B-Zellen der Chimäre (1) und der Chimäre (2) durchflusszytometrisch analysiert. Je 2×10^4 CD11c^+ beziehungsweise 1×10^5 CD19^+ Zellen wurden untersucht. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Analysen.

Die Immunisierung beider Chimärengruppen erfolgte mit NIP-Ficoll in Gegenwart von anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig. In Abbildung 3.24 ist die humorale Antwort der Chimären dargestellt. Betrachtet man die Ag-spezifische IgG1-Antwort in Gegenwart von Kontroll-Ig, so zeigt sich, dass im Serum der Chimäre (1), deren B-Zellen CD83-defizient waren, etwas mehr NIP-spezifisches IgG1 detektiert werden konnte als im Serum der Kontroll-Chimäre (2). Die CD83-Defizienz, speziell auf B-Zellen, führte also zu einer leichten Steigerung der B-Zell-Funktion. Die nach der Immunisierung in Gegenwart des anti-CD83 mAk gemessene IgG1-Antwort der Chimäre (1) war mit der IgG1-Antwort, die nach der Injektion von Kontroll-Ig ermittelt wurde, vergleichbar. Die Applikation des anti-CD83 mAk bewirkte somit keine Steigerung der IgG1-Antwort der Chimäre (1). Bei der Kontroll-Chimäre (2) hingegen, deren B-Zellen nach Aktivierung CD83 exprimieren konnten, führte die Gabe des anti-CD83 mAk, im Vergleich zum Kontroll-Ig, zu einem 100-fachen Anstieg des Ag-spezifischen IgG1-Titers im Serum. Bei beiden Chimären konnte keine veränderte IgM- oder IgG3-Antwort nach Verabreichung des anti-CD83 mAk festgestellt werden (Abb. 3.24).

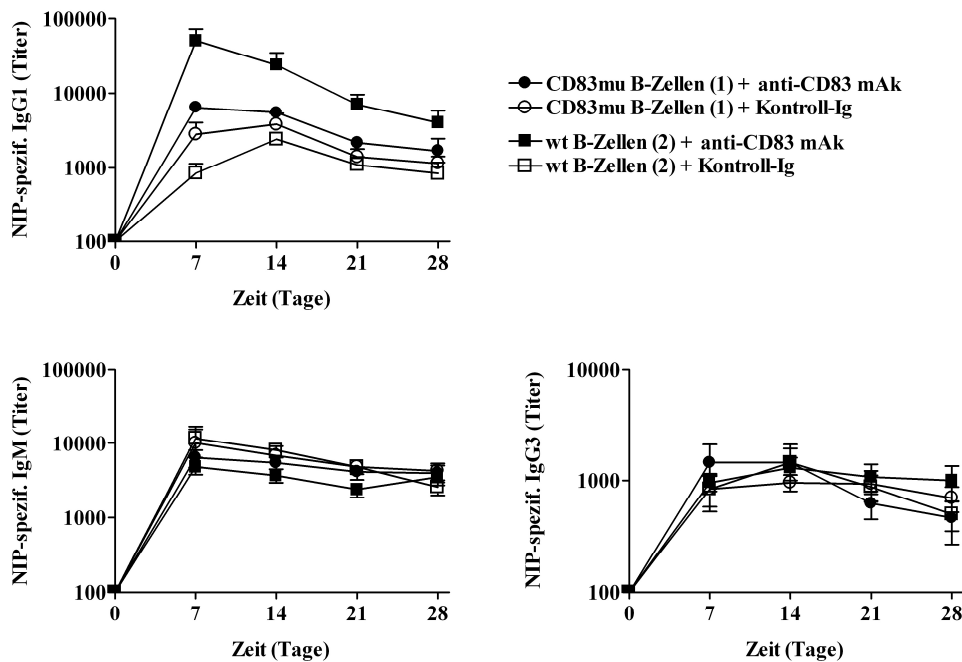


Abb. 3.24: Engagement von CD83 auf B-Zellen führt zu gesteigerter NIP-spezifischer IgG1-Antwort. Acht Wochen nach Knochenmarkstransfer wurden Chimäre (1), mit CD83-defizienten B-Zellen (Kreise), und Chimäre (2), mit CD83-kompetenten B-Zellen (Quadrate), mit dem TI-Ag NIP-Ficoll (200 µg) immunisiert. Die Injektion von anti-CD83 mAk (20 µg; schwarze Symbole) oder Kontroll-Ig (20 µg; weiße Symbole) erfolgte i.p. einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung. NIP-spezifisches IgG1, IgM und IgG3 wurden mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten im Serum bestimmt. Gezeigt sind die gemittelten Titer und SEM von je fünf analysierten Seren. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der anti-CD83 mAk keine biologische Aktivität entfaltet, wenn speziell die B-Zellen kein CD83 exprimieren. Das weist darauf hin, dass die B-Zellen die CD83⁺ Zellpopulation darstellen, die für den biologischen Effekt des CD83-Engagements verantwortlich ist.

3.2.2.5 Engagement von CD83 auf DCs hat keinen Einfluss auf die IgG1-Antwort

Trotz dieses eindeutigen Ergebnisses könnte eingewendet werden, dass die in Abschnitt 3.2.2.4 verwendeten Chimären unterschiedliche Frequenzen CD83-kompetenter CD11c⁺ DCs aufwiesen. So stammten bei Chimäre (2) 100 % der CD11c⁺ DCs aus CD83-kompetentem Knochenmark, während sich bei Chimäre (1) nur 70 % der CD11c⁺ DCs aus dem CD83-kompetenten Knochenmark entwickelten (Abb. 3.22 und 3.23). Da CD11c⁺ DCs zu den wichtigsten akzessorischen Zellen zählen, reife DCs viel CD83 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [64] und angenommen wird, dass CD11c⁺ DCs zum Ig-Klassenswechsel bei TI-Ag, wie zum Beispiel NIP-Ficoll, beitragen [35], musste

ausgeschlossen werden, dass die nicht vorhandene Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort bei Chimäre (1) (Abb. 3.24) auf die reduzierte Frequenz CD83-kompetenter DCs zurückzuführen war. Deshalb wurde ein zweiter Satz gemischter Chimären hergestellt. Diese sollten zum Zeitpunkt der Immunisierung und des CD83-Engagements durch den anti-CD83 mAk keine CD83⁺ DCs aufweisen. In Abbildung 3.25 ist schematisch dargestellt, wie die Herstellung der Chimären erfolgte. Letal bestrahlten Wildtyp Mäusen wurde eine Mischung aus CD11cDTRtg und CD83mu (Chimäre 3) oder Wildtyp und CD83mu (Chimäre 4) Knochenmark transferiert. Die CD11c⁺ Zellen der CD11cDTRtg Mäuse [103] exprimieren zusätzlich den humanen Diphtherie-Toxin (DT) Rezeptor unter der Kontrolle des CD11c-Promotors. Da alle DCs CD11c exprimieren, können sie, sofern sie aus dem CD11cDTRtg Knochenmark heranreifen, durch die Gabe von DT *in vivo* vorübergehend depletiert werden. Acht Wochen nach erfolgreichem Transfer wurden 50 % der Chimären aus Gruppe (3) und alle Chimären der Gruppe (4) mit DT behandelt. Die theoretischen Folgen der DT-Applikation sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Bei Chimäre (3) sollte es zur Depletion der CD11c⁺ DCs (70 %) kommen, die sich aus dem CD11cDTRtg Knochenmark entwickelt hatten. Die übrigen DCs (30 %) dieser Chimäre stammten aus CD83mu Knochenmark, waren somit DT-unempfindlich und blieben erhalten. Alle anderen hämatopoetischen Zelltypen der Chimäre (3) sollten sich zu 30 % aus CD83mu und zu 70 % aus CD11cDTRtg Knochenmark entwickeln. Auf die CD11c⁺ DCs der Chimäre (4), die hergestellt worden war, um eventuelle Nebenwirkungen des DT zu kontrollieren, sollte das DT keinen Einfluss haben. Alle hämatopoetischen Zelltypen dieser Chimäre würden somit zu 30 % aus CD83-defizienten und zu 70 % aus CD83-kompetenten Zellen bestehen. Eine gleiche Zusammensetzung sollte sich für die hämatopoetischen Zellen der Chimäre (3) ergeben, der kein DT injiziert worden war.

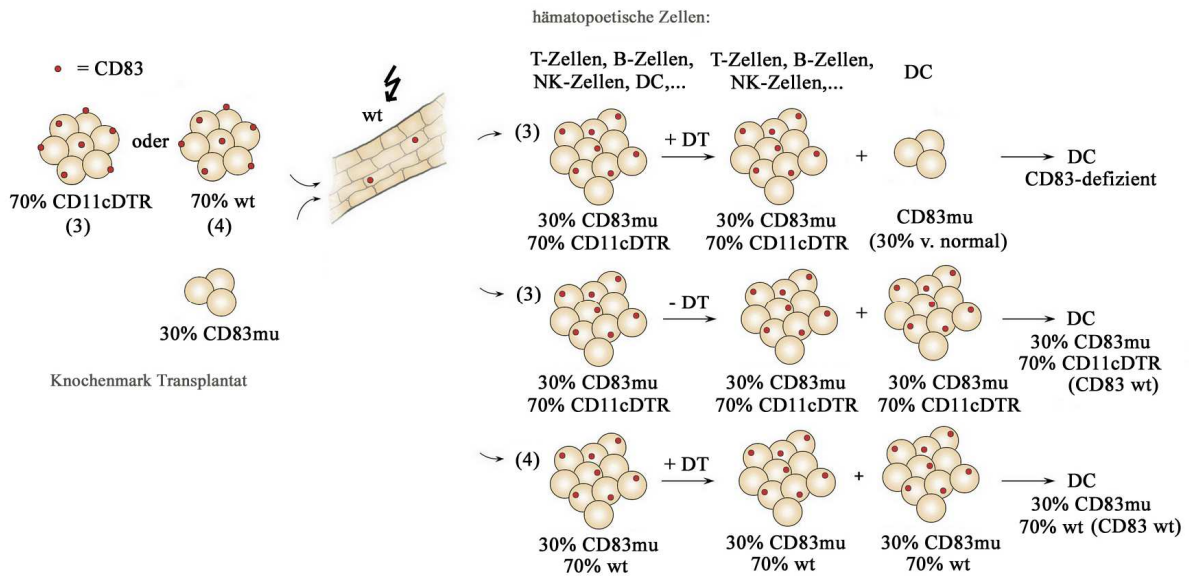


Abb. 3.25: Herstellung gemischter Chimären mit CD83-defizienten CD11c⁺ DCs (I). Lethal bestrahlten Wildtyp (wt) Mäusen wurden $1,8 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von CD83mu und entweder $4,2 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von CD11cDTRtg Mäusen (3) oder Wildtyp Mäusen (4) intravenös transferiert. Die Gabe von Diphtherie-Toxin (DT) führte bei Chimäre (3) zur Depletion aller CD11cDTRtg DCs. Die nicht depletierten DCs (30 %), hatten sich aus CD83mu Knochenmark entwickelt und waren CD83-defizient. Bei Chimäre (3), die kein DT erhalten hatte und bei Chimäre (4), die DT erhalten hatte, entwickelten sich alle hämatoopoetischen Zellen zu 30 % aus CD83mu und zu 70 % aus CD83-kompetentem Knochenmark.

Um die oben beschriebene, theoretische Zellzusammensetzung der Chimären nach DT-Gabe zu überprüfen, wurde die Expression von CD83 auf CD11c⁺ DCs und B-Zellen der Milz untersucht (Abb. 3.26). Wie erwartet, wurden bei Chimäre (3) nach DT-Injektion ausschließlich CD11c⁺ DCs detektiert, die kein CD83 exprimierten (Abb. 3.26, oben Chimäre (3)+DT). Diese hatten sich aus CD83mu Knochenmark entwickelt und waren deshalb nicht empfindlich für das verabreichte DT. Die übrigen 70 % CD11c⁺, aber DT-sensitiven DCs, die CD83 hätten exprimieren können, waren zerstört. Die DC Population der Chimäre (3), die kein DT erhalten hatte (Chimäre (3)-DT), bestand hingegen aus 70 % CD11c⁺ DCs, die vom CD11cDTRtg Knochenmark abstammten und somit CD83 exprimierten und aus 30 % CD83mu DCs, die CD83-defizient waren. Chimäre (4), die ebenfalls DT erhalten hatte, zeigte ein ähnliches Verhältnis an CD83-kompetenten und CD83-defizienten CD11c⁺ DCs, wie Chimäre (3)-DT. Die konstitutive und LPS-induzierte Expression von CD83 auf CD19⁺ B-Zellen war, wie erwartet, in allen drei Chimärengruppen vergleichbar (Abb. 3.26). Die B-Zellen waren zu je 30 % aus CD83mu und zu je 70 % aus CD83-kompetentem Knochenmark gereift.

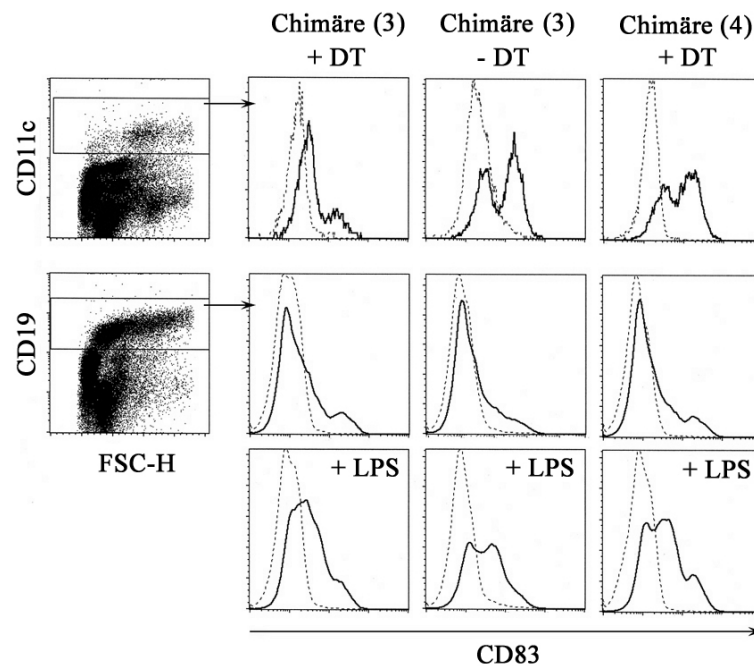


Abb. 3.26: Keine Expression von CD83 auf DCs der Chimäre (3)+DT. Acht Wochen nach Knochenmarktransfer wurde der Hälfte der Mäuse aus Chimärengruppe (3) und allen Mäusen der Chimärengruppe (4) je 8 ng DT pro Gramm Körpergewicht i.p. injiziert. 30 h später wurde von je einer Maus pro Gruppe die Milz präpariert. Die Milzzellen ($2 \times 10^6/\text{mL}$) wurden für 24 h mit LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) stimuliert oder verblieben in Medium. Anschließend wurde die Expression von CD83 auf CD11c⁺ DCs (**oben**) und unstimulierten (**mitte**) oder aktivierten (**unten**) CD19⁺ B-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. 2×10^4 CD11c⁺ beziehungsweise 1×10^5 CD19⁺ Zellen wurden untersucht. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Analysen.

Alle Chimären wurden mit NIP-Ficoll in Gegenwart von anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig immunisiert. Die ermittelten Ag-spezifischen IgG1 Titer im Serum der Mäuse sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Zwischen den Gruppen gab es keinen Unterschied in der NIP-spezifischen IgG1-Antwort. Die Immunisierung in Gegenwart von anti-CD83 mAk führte bei allen Chimärengruppen zu einer um ein bis zwei log-Stufen gesteigerten IgG1-Antwort.

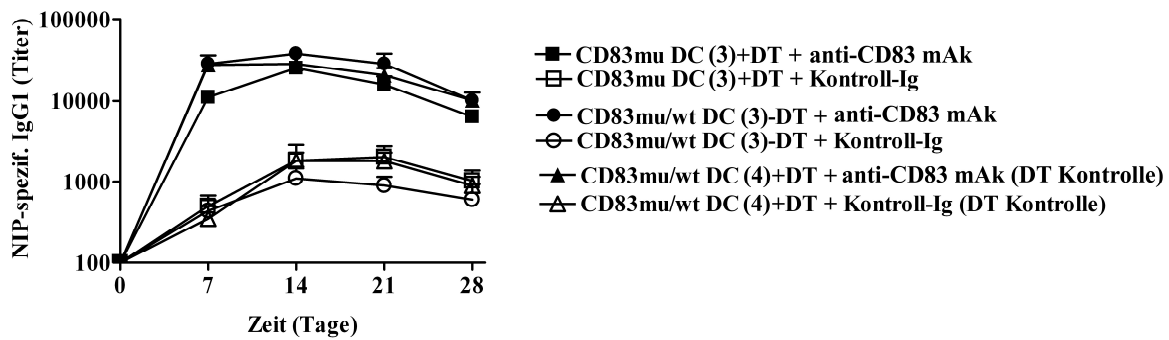


Abb. 3. 27: Engagement von CD83 auf DCs trägt nicht zu gesteigerter NIP-spezifischer IgG1-Antwort bei (I). Acht Wochen nach Knochenmarkstransfer wurde die Hälfte der Mäuse von Chimärengruppe (3) mit DT behandelt (Quadrate), die andere Hälfte unbehandelt gelassen (Kreise). Alle Mäuse der Chimärengruppe (4) erhielten DT (Dreiecke). Die Immunisierung der Chimären erfolgte mit dem TI-Ag NIP-Ficoll (200 µg). Einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung wurde den Mäusen anti-CD83 mAk (20 µg; schwarze Symbole) oder Kontroll-Ig (20 µg; weiße Symbole) i.p. injiziert. Die Bestimmung von NIP-spezifischem IgG1 im Serum der Mäuse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA. Gezeigt sind die gemittelten Titer und SEM von je vier analysierten Seren.

Dieses Resultat zeigt, dass das Engagement von CD83 zu einer gesteigerten IgG1-Antwort führt, auch wenn die CD11c⁺ DCs kein CD83 exprimieren.

Um sicher zu gehen, dass die Anzahl der CD11c⁺ DCs während der Immunisierung und des CD83-Engagements keinen Einfluss auf die Steigerung der T-Zell-unabhängigen IgG1-Antwort hat, wurde ein letzter Satz gemischter Chimären generiert. Chimäre (3) aus Abbildung 3.25 wies nach DT Gabe zwar ausschließlich CD83-defiziente aber auch eine um 70 % reduzierte Frequenz CD11c⁺ DCs auf. Bei den Kontrollchimären (3)-DT und (4)+DT blieben hingegen 100 % der CD11c⁺ DCs zu jedem Zeitpunkt erhalten. Um eine gleiche Frequenz CD11c⁺ DCs während der Immunisierung und dem Engagement von CD83 zu erreichen, wurden letal bestrahlte Wildtyp Mäuse entweder mit einer Mischung aus CD83mu und CD11cDTRtg Knochenmark (5) oder einer Mischung aus Wildtyp und CD11cDTRtg Knochenmark (6) rekonstituiert (Abb. 3.28). Nach der DT-Injektion blieben bei beiden Chimärengruppen nur 30 % der ursprünglichen CD11c⁺ DCs erhalten. Bei Chimäre (5) waren diese ausschließlich CD83-defizient, bei Chimäre (6) hingegen ausschließlich CD83-kompetent. Alle anderen hämatopoetischen Zelltypen der Chimären (5) waren durch 30 % CD83mu und 70 % CD83-kompetente Zellen repräsentiert, die der Chimäre (6) waren zu 100 % fähig CD83 nach Aktivierung zu exprimieren.

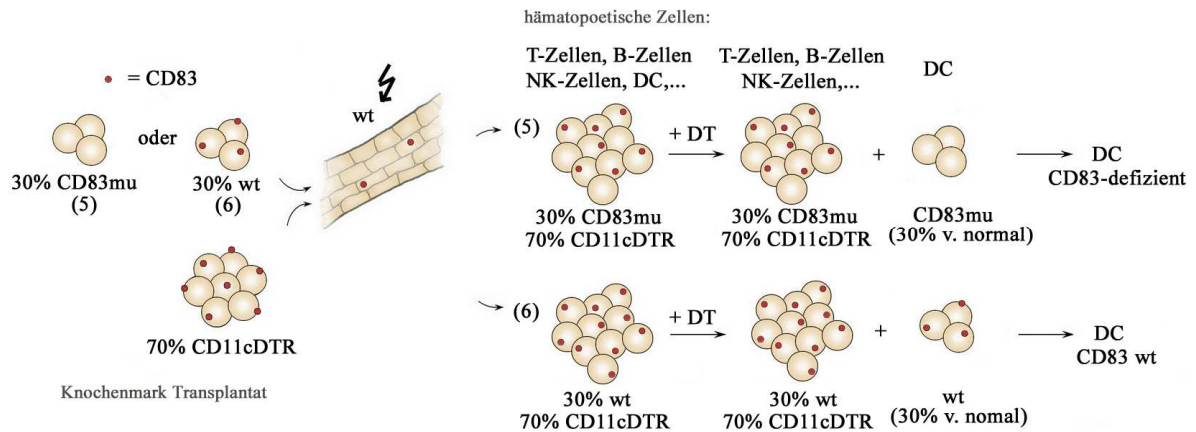


Abb. 3.28: Herstellung gemischter Chimären mit CD83-defizienten CD11c⁺ DCs (II). Letal bestrahlten Wildtyp (wt) Mäusen wurden $4,2 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von CD11cDTRtg Mäusen und entweder $1,8 \times 10^6$ Knochenmarkszellen von CD83mu (5) oder Wildtyp (6) Mäusen intravenös transferiert. Die Gabe von Diphtherie-Toxin (DT) führte bei beiden Chimärengruppen zur Depletion der CD11cDTRtg DCs, die 70 % aller CD11c⁺ DCs ausmachten. Die übrigen CD11c⁺ DCs (30 %) der Chimäre (5) waren alle CD83-defizient, die der Chimäre (6) alle CD83-kompetent. Alle anderen hämatoopoetischen Zelltypen der Chimäre (5) waren zu 30 % aus CD83mu und zu 70 % aus CD83-kompetentem Knochenmark herangereift. Die hämatoopoetischen Zellen der Chimäre (6) entwickelten sich zu 100 % aus CD83-kompetentem Knochenmark.

Beide Chimärengruppen wurden mit NIP-Ficoll in Gegenwart von anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig immunisiert. Die Analyse der Ag-spezifischen IgG1-Antwort ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

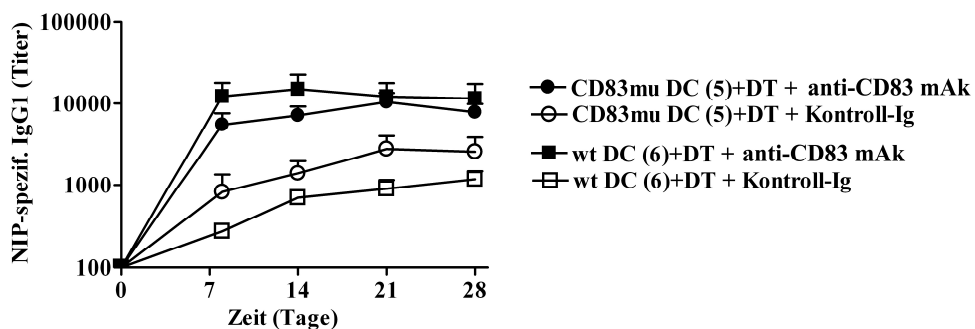


Abb. 3.29: Engagement von CD83 auf DCs trägt nicht zu gesteigerter NIP-spezifischer IgG1-Antwort bei (II). Acht Wochen nach Knochenmarkstransfer wurden Chimäre (5) (Kreise) und Chimäre (6) (Quadrate) mit DT behandelt. Die TI-Immunisierung erfolgte mit NIP-Ficoll (200 µg). Anti-CD83 mAk (20 µg; schwarze Symbole) oder Kontroll-Ig (20 µg; weiße Symbole) wurden einen Tag vor und einen Tag nach der Immunisierung i.p. injiziert. Die Analyse von NIP-spezifischem IgG1 im Serum erfolgte mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt sind die gemittelten Titer und SEM von je fünf analysierten Seren.

Die nach der Gabe von Kontroll-Ig ermittelte IgG1-Antwort war bei Chimäre (5), deren verbliebene CD11c⁺ DCs alle CD83mu waren, im Vergleich zu Chimäre (6), deren

verbliebene CD11c⁺ DCs alle CD83-kompetent waren, leicht gesteigert. Bei beiden Chimärengruppen führte das Engagement von CD83 während der Immunisierung zu einer Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort um ein bis zwei log-Stufen. Die vergleichbare Ag-spezifische IgG1-Antwort nach CD83-Engagement der Chimärengruppen mit unterschiedlichen Frequenzen CD11c⁺ DCs (Abb. 3.27) konnte mit diesem Experiment bestätigt werden. Weder die Anzahl der zum Zeitpunkt der Immunisierung existierenden DCs, noch das Vorhandensein oder Fehlen von CD83 auf den DCs hatte einen Einfluss auf die gesteigerte IgG1-Antwort. Das zeigt, dass das Engagement von CD83 auf DCs durch den anti-CD83 mAk nicht zu dem beobachteten Anstieg der NIP-spezifischen IgG1-Antwort beiträgt.

3.2.3 Zusammenfassung Teil II

Im zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass Wildtyp B-Zellen nach BCR- oder TLR-Engagement CD83 verstärkt exprimieren. Die Expression von CD83 auf B-Zellen *in vitro* und *in vivo* konnte nicht nur durch einen B-Zell-spezifischen sondern auch durch einen T-Zell-spezifischen Stimulus induziert werden. Wurde CD83 in Wildtyp Mäusen während einer T-Zell-unabhängigen B-Zell-Aktivierung durch die Applikation von anti-CD83 mAk *in vivo* engagiert, konnte eine 100-fache Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort beobachtet werden. Diese Steigerung war dosisabhängig und besonders effizient, wenn der anti-CD83 mAk während des BCR-Engagements in hoher Konzentration im Serum vorlag. Es konnte kein Effekt des anti-CD83 mAk auf andere Ig-Subklassen oder auf die Immunisierung mit einem T-Zell-abhängigen Antigen gemessen werden. Durch die Herstellung gemischter Chimären und die Begrenzung der CD83-Defizienz auf B-Zellen oder CD11c⁺ DCs wurde gezeigt, dass das Engagement von CD83 auf den B-Zellen, nicht aber auf CD11c⁺ DCs, zur Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort führt.

4 Diskussion

4.1 CD83 als regulatorisches Element der Aktivierung und Funktion von B-Lymphozyten *in vitro* und *in vivo*

CD83 hat eine zentrale Rolle bei der Entstehung CD4⁺ T-Zellen im Thymus [72, 81]. Darüber hinaus wurde ein Einfluss von CD83 auf periphere T-Zell-Funktionen beschrieben [111]. Neuere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass CD83 auch in die Regulation der B-Zell-Aktivierung und -Funktion involviert ist und dass die aktivierungsinduzierte Expression von CD83 auf B-Zellen eine biologische Funktion repräsentiert. Dafür sprechen folgende Evidenzen: Während einer Infektion mit *Leishmania major* stellten B-Zellen die dominante CD83⁺ Zellpopulation dar [97]. Die Expression von CD83 auf den B-Zellen korrelierte dabei strikt mit dem Ort und der Kinetik der Infektion. Die künstliche Überexpression von CD83 in CD83tg Mäusen führte zu einer dramatischen Reduktion der Ig-Antwort gegen Modell-Ag Immunisierungen und Infektionen [97]. In CD83tg Mäusen wird CD83 unter der Kontrolle des MHC-I Promotors exprimiert und ist somit nicht nur auf B-Zellen, sondern auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden [96, 101]. Anhand von gemischten CD83tg/Wildtyp Chimären, deren hämatopoetische Zellen zu 50 % aus CD83tg und zu 50 % aus Wildtyp Knochenmark heranreiften, wurde gezeigt, dass die reduzierte Ig-Antwort der CD83tg Mäuse auf die Überexpression von CD83 auf den B-Zellen selbst und nicht auf die Expression von CD83 auf akzessorischen Zellen zurückzuführen war [97]. In diesen Chimären reagierten ausschließlich die Wildtyp B-Zellen auf die Immunisierung mit TI- und TD-Modell-Antigenen. Das zeigt, dass die Präsenz CD83tg B-Zellen und CD83tg akzessorischer Zellen keinen Einfluss auf die Funktion der Wildtyp B-Zellen hatte, und dass akzessorische und somatische Wildtyp Zellen zu keiner Rettung des CD83tg Phänotyps führten. Durch dieses Experiment wurde ebenfalls ausgeschlossen, dass lösliche Faktoren, wie zum Beispiel sCD83 für die fehlende Ig-Antwort verantwortlich waren [97].

Die Rolle von CD83 bei der B-Zell-Aktivierung und -Funktion wurde in dieser Arbeit weiter untersucht. Es wurde gezeigt, dass CD83 nicht nur als Folge eines B-Zell-spezifischen Stimulus durch TLR- oder BCR-Engagement *in vitro* (Abb. 3.15), sondern auch als Konsequenz der Stimulation von Nachbar-T-Zellen (Abb. 3.16 und 3.17) *in vitro* und *in vivo* binnen weniger Stunden auf der B-Zell-Oberfläche induziert wird. Der

Mechanismus dieser so genannten „Aktivierung unbeteiligter Nachbarzellen“ wird in der Literatur als *bystander activation* bezeichnet. Die Induktion von CD83 auf unbeteiligten B-Zellen war kontaktabhängig, aber unabhängig von der Interaktion zwischen MHC-II:Peptid-Komplex und spezifischem TCR (Abb. 3.17). Jones *et al.* haben gezeigt, dass CD80 auf Nachbar-B-Zellen *in vitro* ebenfalls unabhängig von löslichen Faktoren und unabhängig von der TCR/MHC-Interaktion induziert wird [112]. Der für die Induktion von CD80 essentielle Kontakt war die Bindung des CD40L auf der aktivierten T-Zelle an CD40 auf der benachbarten B-Zelle. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die Induktion von CD83 auf B-Zelle, die sich in direkter Nachbarschaft aktivierter T-Zellen befinden, denkbar. In dieser Arbeit generierte Daten zeigen eine schnelle Induktion von CD83 auf B-Zellen, sowohl nach B- als auch nach T-Zell-spezifischer Stimulation. Dieser Befund wurde mit einer BCRtg Maus [113] und einer CD83 Reportermaus [114] reproduziert. Die aktivierungsinduzierte Expression von CD83 auf B-Zellen, die Tatsache, dass CD83 eine vergleichbare Expressionskinetik aufweist wie die ebenfalls aktivierungsinduzierten kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [113] und der Befund, dass CD83 nach der B-Zell-Aktivierung *in vitro* [76] und *in vivo* [113] noch vor dem frühen Aktivierungsmarker CD69 auf der B-Zell-Zelloberfläche erscheint, zeigen, dass es sich bei CD83 um einen sehr sensitiven Marker der frühen B-Zell-Aktivierung handelt. Der Nachweis von CD83 auf B-Zellen könnte somit, vergleichbar mit dem Nachweis von CD69 auf T-Zellen, ein sensibles Mittel darstellen, um Aktivierung an Entzündungsorten zu messen.

Einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Rolle von CD83 bei der Aktivierung und Funktion muriner B-Lymphozyten erfolgte durch *in vitro*-Studien mit CD83tg und CD83mu B-Zellen. Die artifizielle Überexpression von CD83 auf gereinigten CD83tg B-Zellen führte *in vitro* im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen zu einer normalen Stimulation CD8⁺ T-Zellen und nur zu einer unwesentlich besseren Stimulation CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.13). Eine zentrale Rolle für CD83 auf APCs, als kostimulatorisches Element der T-Zell-Aktivierung, wurde daher ausgeschlossen.

Darüber hinaus zeigten CD83-überexprimierende B-Zellen *in vitro* eine reduzierte Proliferation (Abb. 3.3), eine verminderte Ig-Sekretion (Abb. 3.3) und einen verringerten maximalen Ca²⁺-Einstrom (Abb. 3.4). Diesem veränderten Phänotyp lag kein genereller Defekt zugrunde, da CD83tg B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen signifikant mehr

IL-10 in den Kulturüberstand sezernierten (Abb. 3.3) und eine verstärkte Expressionsintensität der kostimulatorischen Moleküle CD86 und MHC-II aufwiesen (Abb. 3.11). CD83-defiziente B-Zellen hingegen zeigten *in vitro* den reziproken Phänotyp (Abb. 3.5). Proliferation und Ig-Antwort waren im Vergleich zum Wildtyp leicht gesteigert, die IL-10 Sekretion und Expressionsintensitäten von CD86 und MHC-II hingegen leicht vermindert (Abb. 3.11). Die Verwendung gereinigter B-Zellen schloss aus, dass die verstärkte oder verminderte Expression von CD83 auf akzessorischen Zellen einen Effekt auf den beobachteten Phänotyp hatte. Der CD83tg beziehungsweise CD83mu Phänotyp wurde somit auch *in vitro*, wie bereits *in vivo* gezeigt [97], durch die Überexpression beziehungsweise das Fehlen von CD83 auf den B-Zellen selbst hervorgerufen.

Der funktionelle Defekt der CD83tg B-Zellen war weder auf eine erhöhte Apoptoserate (Abb. 3.9) noch auf eine reduzierte Expression des BCR oder kostimulatorischer Rezeptoren, wie zum Beispiel CD40 (Abb. 3.11), zurückzuführen. Auch die gesteigerte IL-10 Konzentration im Überstand der CD83tg B-Zellen konnte den Phänotyp der CD83tg B-Zellen nicht erklären (Abb. 3.10).

Die Untersuchung der B-Zell-Funktion CD83-defizienter Mäuse *in vivo* zeigte zunächst widersprüchliche Resultate. Fujimoto *et al.* publizierten, dass die Immunisierung CD83-defizienter Mäuse mit dem TD-Ag DNP-KLH zu einer im Vergleich zu Wildtyp Mäusen reduzierten Ig-Antwort führte [72]. Dieses Ergebnis könnte einerseits auf die fehlende Expression von CD83, andererseits aber auch auf die dramatisch reduzierte Frequenz CD4⁺ T-Zellen in den CD83mu Mäusen [81] zurückzuführen sein. Zur Klärung der Frage wurden in dieser Arbeit Chimären hergestellt. Der Transfer von CD83mu Knochenmark in Wildtyp Mäuse erlaubte die Reifung CD4⁺ T-Zellen in normaler Frequenz ([72], Abb. 3.6-B) und führte gleichzeitig dazu, dass sich alle hämatopoetischen Zellen aus CD83mu Knochenmark entwickelten und somit kein CD83 exprimierten. Die Immunisierung dieser Chimären mit TI- oder TD-Modell-Ag führte zu normalen oder sogar leicht gesteigerten Ig-Antworten (Abb. 3.7-B und 3.8-B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die von Fujimoto *et al.* beschriebene Beobachtung auf das Fehlen von T-Helferzellen und nicht auf das Fehlen von CD83 zurückzuführen war.

Während die Überexpression von CD83 auf B-Zellen zu einer dramatischen Reduktion der Ig-Antwort führte ([97], Abb. 3.7-A und 3.8-A), zeigte das Fehlen von CD83 nicht den

reziproken Effekt (Abb. 3.7-B und 3.8-B). Die humorale Antwort in Abwesenheit von CD83 war normal oder nur leicht gesteigert. Diese Diskrepanz zeigt deutlich die Grenzen des CD83tg beziehungsweise CD83-defizienten Systems. Um jenseits der artifiziellen Systeme die Rolle von CD83 auf die B-Zell-Aktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurde CD83 in Wildtyp Mäusen durch den Einsatz eines anti-CD83 mAk engagiert. Das Engagement von natürlicherweise exprimiertem CD83 während einer Immunisierung mit dem TI Modell-Ag NIP-Ficoll führte zu einer bis zu 100-fachen Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort (Abb. 3.19). Der Effekt des anti-CD83 mAk war dosisabhängig und besonders effizient, wenn der Antikörper während der B-Zell-Aktivierung in hoher Konzentration im Serum vorlag. Das Engagement von CD83 vor der B-Zell-Aktivierung, oder 48 h danach, hatte keinen Effekt auf die IgG1-Antwort (Abb. 3.21). Da CD83 auf vielen Geweben und Zellen, wie zum Beispiel auf TECs [72] oder auf aktivierter Leukozyten, wie DCs [63, 66, 114], B- oder T-Zellen [80, 113] exprimiert wird, musste getestet werden, welche CD83⁺ Population *in vivo* den biologischen Effekt des anti-CD83 mAk vermittelt. Dazu wurden gemischte Chimären hergestellt, in denen die CD83-Defizienz entweder auf B-Zellen oder auf CD11c⁺ DCs beschränkt war. Fehlte CD83 auf CD11c⁺ DCs, führte die Injektion des anti-CD83 mAk dennoch zur Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Antwort (Abb. 3.27 und Abb. 3.29). Fehlte CD83 jedoch auf den B-Zellen, war keine Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort mehr messbar (Abb. 3.24). Das zeigt eindeutig, dass das Engagement von CD83 auf den B-Zellen und nicht auf CD11c⁺ DCs die Steigerung der IgG1-Antwort induzierte. In dieser Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, dass natürlicherweise in Wildtyp Mäusen auf Wildtyp B-Zellen exprimiertes CD83 eine regulatorische Rolle bei der B-Zell-Antwort hat.

4.2 CD83: ein weiterer inhibitorischer B-Zell-Rezeptor?

Das über den BCR vermittelte Signal wird durch ein breites Spektrum koexprimierter Rezeptoren entweder positiv oder negativ beeinflusst [41, 42]. Aktivierende Moleküle, wie zum Beispiel der CD19/CD21/CD81-Korezeptorkomplex, verringern den Schwellenwert, der für die Aktivierung der reifen B-Zellen durch den BCR-Komplex notwendig ist [115]. Negative Korezeptoren, wie zum Beispiel FcγRIIb, CD72 oder CD22, attenuieren die

BCR-vermittelte Signaltransduktion, erhöhen dadurch die Aktivierungsschwelle der B-Zelle und verhindern eine Hyperstimulation der B-Zell-Population. Das über den BCR weitergeleitete Nettosignal ergibt sich aus der relativen Stärke der positiven und negativen Signale und bestimmt letztendlich das Schicksal der B-Zelle.

Folgende in dieser Arbeit generierte Daten unterstützen die Hypothese, dass auch CD83 ein aktivierungsinduzierter, regulatorischer Korezeptor für den BCR ist, der inhibierende Signale in die B-Zelle vermittelt (Abb. 4.1):

- 1) CD83 wird auf naiven B-Zellen nur schwach, auf aktivierten B-Zellen hingegen stark exprimiert. Beeinflusst CD83 das BCR-vermittelte Signal negativ, würde die verstärkte Expression von CD83 während der B-Zell-Aktivierung zur Abschwächung des BCR-vermittelten Signals führen, die Aktivierungsschwelle der B-Zelle heraufsetzen und zur Begrenzung der proliferativen Antwort der B-Zelle beitragen.
- 2) Der Anstieg der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach BCR-Engagement ist bei CD83-überexprimierenden B-Zellen signifikant reduziert. Dieses ist ein Hinweis auf eine durch CD83-vermittelte Abschwächung des über den BCR transduzierten Signals, die bei den CD83tg B-Zellen zu früh, dass heißt bereits im Moment der Stimulation, auftritt.
- 3) CD83tg B-Zellen zeigen eine signifikant reduzierte Proliferation und Ig-Sekretion *in vitro*, sowie eine verminderte Ig-Sekretion *in vivo*. Im Rahmen unserer Hypothese würde das auf CD83tg B-Zellen stark exprimierte, negativ regulierende CD83 das über den BCR empfangene Aktivierungssignal abschwächen, was zu den beobachteten attenuierten B-Zell-Funktionen führt.
- 4) In Übereinstimmung damit zeigen CD83mu B-Zellen eine leicht erhöhte Ig-Sekretion *in vitro* und *in vivo*. In diesem System würde CD83 als inhibitorischer Korezeptor fehlen und eine Abschwächung des BCR-Signals durch CD83 entfallen. Als Konsequenz wäre die Signalgebung über den BCR verstärkt.
- 5) Das Engagement von Wildtyp CD83 durch einen anti-CD83 mAk während der Immunisierung mit dem TI-Ag NIP-Ficoll induziert eine bis zu 100-fache Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort. Im Rahmen der Hypothese würde der Effekt des anti-CD83 mAk als neutralisierend gedeutet. Durch die Bindung des anti-CD83 mAk an das aktivierungsinduzierte CD83 würde das normalerweise über CD83 transduzierte negative Signal blockiert. Der dosisabhängige Effekt des Antikörpers auf die Steigerung

der IgG1-Antwort könnte in diesem Zusammenhang als partielle Neutralisation des CD83-vermittelten Signals verstanden werden.

Die Übermittlung von Signalen über CD83 könnte tonisch erfolgen oder die Bindung von CD83 an einen bislang nicht identifizierten CD83 Liganden voraussetzen. Aufgrund der Datenlage ist auch eine homotypische Interaktion von CD83 nicht auszuschließen [116].

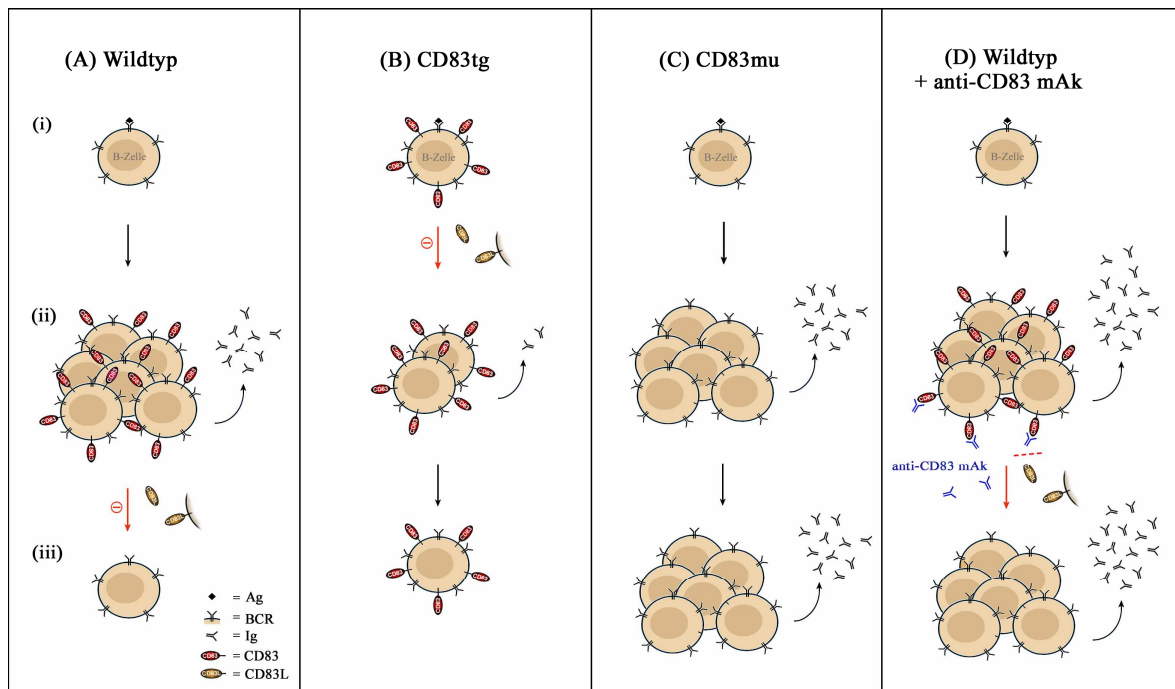


Abb. 4.1: Hypothese zur Rolle von CD83 bei der B-Zell-Funktion. **A:** (i) Ruhende Wildtyp B-Zellen exprimieren CD83 nur auf Hintergrundniveau. (ii) CD83 wird auf Wildtyp B-Zellen *in vitro* und *in vivo* aktivierungsinduziert exprimiert. (iii) CD83 transduziert negative Signale (abhängig von der Bindung an den CD83 Liganden (CD83L) oder tonisch) in die B-Zelle. Dieses negative Signal trägt zu den regulatorischen Mechanismen bei, die die Aktivierungsschwelle der B-Zell-Population kontrollieren. **B:** (i) CD83tg B-Zellen exprimieren CD83 konstitutiv. (ii) Die verfrühte Expression von CD83 auf CD83tg B-Zellen führt zu einem verfrühten und verstärkten Empfang negativer Signale. (iii) Als Konsequenz zeigen CD83tg B-Zellen eine reduzierte Proliferation (*in vitro*) und Ig-Sekretion (*in vitro* und *in vivo*). **C:** (i) Ruhende CD83mu B-Zellen exprimieren kein CD83. (ii) Die Expression von CD83 auf aktivierten CD83mu B-Zellen ist stark reduziert, so dass CD83mu B-Zellen weniger CD83-vermittelte negative Signale empfangen. (iii) CD83mu B-Zellen zeigen eine normale Proliferation *in vitro* und eine normale bis leicht gesteigerte Ig-Sekretion *in vitro* und *in vivo*. **D:** (i) siehe A (i). (ii) Der anti-CD83 mAk engagiert das auf der aktivierten B-Zelle exprimierte CD83. (iii) Das Engagement von CD83 führt zu einer gesteigerten Ig-Antwort *in vivo*. Im Rahmen der Hypothese wird der Effekt des anti-CD83 mAk als neutralisierend gedeutet indem dieser das normalerweise über CD83 transduzierte negative Signal blockiert.

In unserer Arbeitsgruppe gewonnene Resultate zur B-Zell-Reifung und -Homöostase unterstützen ebenfalls die Hypothese, dass CD83 das BCR-vermittelte Signal attenuiert:

Die Stärke des BCR-vermittelten Signals trägt entscheidend dazu bei, in welche B-Zell-Subpopulation sich eine reifende B-Zelle entwickelt [117]. So begünstigen starke BCR-vermittelte Signale die Entwicklung von follikulären B-Zellen, während schwache Signale eher die Bildung von Marginalzonen B-Zellen fördern [118-120]. In Einklang damit führt die Überexpression von CD83 auf reifenden B-Zellen zu einer Anhäufung unreifer transitioneller B-Zellen in der Milz und zu einer reziproken Reduktion reifer follikulärer B-Zellen [65]. Dieser Befund könnte durch ein stark attenuiertes BCR-Signal, das durch die verstärkte Expression von CD83 zustande kommt, interpretiert werden. Fehlt CD83 als putativ inhibierender Rezeptor hingegen, entwickeln sich passend zum Signalstärkemodell weniger Marginalzonen B-Zellen [65]. Durch das Fehlen von CD83 würde das BCR-vermittelte Signal im Rahmen der Hypothese weniger attenuiert und deshalb stärker ausfallen.

Auch die B-Zell-Homöostase ist abhängig von BCR-vermittelten Signalen. So muss das über den BCR transduzierte Signal eine gewisse Stärke aufweisen, um Überlebenssignale zu vermitteln [121]. Passend dazu zeigen CD83tg B-Zellen, deren BCR-vermitteltes Signal im Rahmen der Hypothese stark attenuiert wird, im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen in der Peripherie einen Selektionsnachteil. CD83mu B-Zellen, denen CD83 als inhibierender Regulator fehlt, weisen hingegen einen leichten Selektionsvorteil auf [65].

Darüber hinaus weist CD83 strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen negativen B-Zell-Regulatoren auf. Die Aminosäuresequenz des CD83-Proteins zeigt eine starke Sequenzhomologie mit Proteinen der Ig-Superfamilie [56, 57]. Die Cysteinreste an Position 16 und an Position 77 ermöglichen die Ausbildung einer Ig-Domäne, weshalb CD83 der Ig-Superfamilie zugeordnet wurde. Bis auf CD72, ein Mitglied der Lektin-ähnlichen Moleküle, gehören auch alle bekannten inhibitorischen B-Zell-Rezeptoren, wie zum Beispiel CD22, PD-1 oder CD5, zur Ig-Superfamilie [42].

Neben den genannten Hinweisen, dass es sich bei CD83 um einen negativen B-Zell-Regulator handelt, bleiben verschiedene Fragen und widersprüchliche Befunde dennoch offen und werden im Folgenden diskutiert:

- i) Wie transduziert CD83, dessen kurzer zytoplasmatischer Teil keine Tyrosinreste und somit keine Signalmotive besitzt, regulatorische Signale in die B-Zelle?
- ii) Warum zeigt die chimäre JHT/CD83mu Maus, der CD83 selektiv auf B-Zellen fehlt, keine überschießende Ig-Antwort?
- iii) Wenn der anti-CD83 mAk *in vivo* neutralisierend wirkt, kann der Phänotyp CD83tg B-Zellen durch die Applikation des anti-CD83 mAk revertiert werden?
- iv) Warum führt das Engagement von CD83 während einer T-Zell-unabhängigen Immunisierung ausschließlich zur Steigerung von IgG1?
- v) Warum hat das Engagement von CD83 keinen Effekt auf die Ig-Antwort gegen T-Zell-abhängige Ag?

4.2.1 Wie transduziert CD83, dessen kurzer zytoplasmatischer Teil keine Tyrosinreste und somit keine Signalmotive besitzt, regulatorische Signale in die B-Zelle?

Protein-Tyrosinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen können ein zentrales Ereignis bei der Signaltransduktion sein. Aktivierende Rezeptoren tragen in der intrazellulären Domäne sogenannte Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (*immunoreceptor tyrosine-based activatory motives*, ITAMs), inhibierende Rezeptoren hingegen weisen in der zytoplasmatischen Domäne eine oder mehrere Tyrosininhibierungssequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motives*, ITIMs) auf [43]. In speziellen Aminosäuresequenzen sind ein (ITIM) beziehungsweise zwei (ITAM) Tyrosine angeordnet, die nach Phosphorylierung eine Bindungsstelle für sogenannte SH2-Domäne-tragende Proteine schaffen und dadurch die Weiterleitung eines Signals in die Zelle ermöglichen. Intrazelluläre Signalproteine können aber nicht nur über SH2-Domänen, sondern auch über SH3-Domänen wechselwirken [122]. SH3-Bindungsmotive bestehen aus prolinreichen, ungefähr 10 AS langen Peptiden [123]. In der intrazellulären Domäne von humanem und murinem CD83 sind keine Tyrosinreste oder prolinreichen Sequenzen vorhanden [56, 58]. Eine direkte Tyrosinphosphorylierung von CD83, sowie die Wechselwirkung mit Proteinen, die eine SH2- oder SH3-Domäne tragen, ist somit nicht möglich. Allerdings stellen Protein-Tyrosinphosphorylierungen nur einen Bruchteil (<1 %) der Phosphorylierungsereignisse einer Zelle dar. Ein Großteil der Signaltransduktionswege

(95 %), wie zum Beispiel die Zytokin-Signaltransduktion, wird durch die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten gesteuert [124, 125]. Das Verhältnis der Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin liegt bei 1800:200:1 [126]. In der zytoplasmatischen Domäne von murinem (m) und humanem (h) CD83 wurden Serin- und Threoninreste nachgewiesen. Der intrazelluläre Teil von mCD83 enthält insgesamt neun Serin- und Threoninreste, der zytoplasmatische Teil von hCD83 enthält sechs Serin- und Threoninreste [56, 58]. Diese könnten als potentielle Kinasesubstrate dienen und für die Transduktion eines Signals über CD83 in die Zelle verantwortlich sein. Zwar konnten Zhou *et al.* keine Phosphorylierung von hCD83 nachweisen [56], dennoch lässt die Konservierung von sechs Serin/Threonin-Resten in der intrazellulären Domäne von murinem und humanem CD83 eine Funktion dieser AS vermuten. Das Fehlen bekannter Signalmotive und intrazellulärer Phosphorylierungen lässt einen direkt von CD83 ausgehenden Signaltransduktionsweg zwar unwahrscheinlich erscheinen, schließt eine signaltransduzierende Funktion für CD83 aber nicht aus. Eine Assoziation von CD83 mit anderen signalgebenden Molekülen, die CD83 mit der BCR-Signalkaskade verknüpfen, wäre denkbar. BCR, MHC-Klasse II Moleküle und der LPS Rezeptor CD14 sind Beispiele für eine solche indirekte Signalgebung. Sie alle tragen keine eigenen Signalmotive in ihren kurzen zytoplasmatischen Domänen, und erst die Ligandenbindung induziert die Assoziation mit Signalmotiv-tragenden Molekülen. So signalisiert der BCR über das ITAM-tragende Heterodimer aus Ig α und Ig β [39] und CD14 über die Interaktion mit dem TLR-4 [127]. Der experimentelle Hinweis für MHC-II-assozierte Rezeptoren stammt von Lang *et al.* [128]. Sie haben gezeigt, dass die Interaktion des auf der B-Zelle exprimierten Peptid:MHC-II-Komplexes mit dem spezifischen TCR zu einer Assoziation der MHC-II Moleküle mit dem signaltransduzierenden Ig α - β -Dimer führt. Eine zweite Studie mit humanen B-Zell-Linien zeigte, dass HLA-DR die Aktivierung der Src-Kinase Lyn bewirkt, indem es mit CD20, einem B-Zell-spezifischen Signalmolekül, dass die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung bewirkt, assoziiert [129, 130]. Darüber hinaus wurde für HLA-DR auf humanen B-Zellen gezeigt, dass es multimolekulare Komplexe mit verschiedenen Zelloberflächen-Rezeptoren, wie CD19 und Mitgliedern der Tetraspanin Familie (CD37, CD53, CD81, CD82), eingehen kann [131]. Auch wenn die Immunpräzipitation bisher keine kopräzipitierten Moleküle von CD83 zeigte ([56], unpublizierte Daten Dr. K. Lüthje), könnte die Interaktion zwischen CD83 und dem putativ

assoziierten Molekül zu schwach sein, um immunopräzipitativ eine physikalische Interaktion nachweisen zu können. Dieses war auch der Grund, weshalb keine Interaktion zwischen CD86 und CD19 nachgewiesen werden konnte, obwohl bekannt ist, dass CD19 die Verbindung zwischen CD86, das selbst keine eigenen Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil trägt, und der Aktivierung der PI3-Kinase darstellt [132].

4.2.2 Warum zeigt die chimäre JHT/CD83mu Maus, der CD83 selektiv auf B-Zellen fehlt, keine überschießende Ig-Antwort?

Wenn CD83 das BCR-Signal negativ beeinflusst und die Neutralisation eines putativ negativen Signals durch das Engagement von CD83 auf der Wildtyp B-Zelle eine 100-fache Steigerung der IgG1-Antwort bewirkt, sollte bei den chimären JHT/CD83mu Mäusen, deren B-Zellen kein putativ negativ regulierendes CD83 exprimieren, ein ähnlicher Anstieg der IgG1-Antwort zu beobachten sein. Bei Mäusen, bei denen die CD83-Defizienz auf die B-Zellen restringiert war, war die IgG1-Antwort tatsächlich gesteigert. Diese Steigerung der IgG1-Antwort war allerdings viel schwächer ausgeprägt, als die Steigerung, die durch die Gabe des anti-CD83 mAk in Wildtyp Mäuse verursacht wurde. Da CD83mu B-Zellen CD83 während ihrer gesamten Entwicklung und Lebenszeit fehlt, wäre denkbar, dass andere regulatorische Mechanismen die fehlende negative Regulation durch CD83 übernehmen. Dieses würde erklären, weshalb die lebenslang bestehende CD83-Defizienz keinen so starken Effekt auf die IgG1-Antwort hat, wie die plötzliche Unterbrechung der negativen Signaltransduktion in Wildtyp Mäusen durch die Präsenz eines putativ neutralisierenden anti-CD83 mAk. Tatsächlich exprimieren CD83mu B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen weniger MHC-II und weniger CD86 auf ihrer Zelloberfläche, wohingegen CD83tg B-Zellen den reziproken Phänotyp zeigen [76, 108]. Sowohl MHC-II als auch CD86 transduzieren kostimulatorische Signale in die B-Zelle [132-134]. So induziert die Kreuzvernetzung von MHC-II Molekülen in humanen und murinen B-Zell-Linien einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des intrazellulären Signalmoleküls zyklisches Adenosin-Monophosphat [135-137]. Verschiedene Publikationen beschreiben einen positiven Effekt der MHC-II Ligation auf die B-Zell-Differenzierung, -Proliferation und -Zytokinproduktion [138, 139]. Darüber hinaus haben Tabata *et al.* gezeigt, dass die Ligation von HLA-DR die Produktion von IgM

Antikörpern induziert [140]. Die gesteigerte B-Zell-Aktivität nach CD86 Engagement führt unter anderem zu vermehrter IgG1 und IgE Produktion [141-143], einer erhöhten Frequenz anti-apoptotischer Faktoren [134] und einer Induktion des B-Zell-spezifischen Oktamer-Transkriptionsfaktors (TF) Oct-2 und des TF NFκB, die durch die Bindung an den 3'-IgH (*heavy chain*)-Verstärker das Level an produziertem IgG1 regulieren [144]. Diese verminderte beziehungsweise verstärkte Expression der Kostimulatoren MHC-II und CD86 könnte somit tatsächlich eine Kompensation für die ebenfalls verminderte oder verstärkte Expression des putativ negativen Regulators CD83 sein. Eine verminderte MHC-II und CD86 Expression führt zu einer Reduktion positiver Signale und kompensiert das Fehlen der negativen Signale durch CD83 auf CD83^{mu} B-Zellen, eine verstärkte Expression der Kostimulatoren führt zu einer Verstärkung positiver Signale und kompensiert die durch die CD83 Überexpression auf CD83^{tg} B-Zellen gesteigerte negative Regulation. Ein zusätzlicher Effekt der reduzierten beziehungsweise verstärkten Oberflächenexpression von MHC-II ist die bessere, beziehungsweise schlechtere Fähigkeit der B-Zellen, Peptide an T-Zellen präsentieren zu können und dadurch mehr oder weniger kostimulatorische Signale über die Interaktion von CD40L auf der T-Zelle mit CD40 auf der B-Zelle zu erhalten [12].

Die *in vivo*-Kompensation könnte letztendlich nur durch die plötzliche Deletion von CD83 in induzierbaren knock-out beziehungsweise durch die unmittelbar verstärkte Expression von CD83 in konditionellen transgenen Mäusen adressiert werden. Es wäre zu erwarten, dass der gezielte Verlust von CD83 in reifen B-Zellen einen vergleichbaren steigernden Effekt auf die Ig-Antwort ausübt wie der anti-CD83 mAk, da ein putativ negativ transduzierender Rezeptor plötzlich entfällt.

4.2.3 Wenn der anti-CD83 mAk *in vivo* neutralisierend wirkt, kann der Phänotyp CD83^{tg} B-Zellen durch die Applikation des anti-CD83 mAk revertiert werden?

Im Rahmen der Hypothese wird postuliert, dass die reduzierte Ig-Antwort CD83^{tg} B-Zellen auf die verstärkte Expression von CD83 und die dadurch gesteigerte Transduktion negativer Signale zurückzuführen ist. Die steigernde Wirkung des anti-CD83 mAk auf die Ig-Antwort von Wildtyp Mäusen ließe sich in diesem

Zusammenhang als Blockade des CD83-vermittelten Signals verstehen. Daraus ergibt sich die Forderung, dass CD83tg B-Zellen in Gegenwart des anti-CD83 mAk eine normale Ig-Antwort zeigen sollten. Entsprechende Experimente sind allerdings kompliziert, da CD83tg Mäuse CD83 auf allen kernhaltigen Zellen exprimieren [96, 101]. So band der in CD83tg Mäuse injizierte anti-CD83 mAk an sämtliche CD83-exprimierende Zellen (alle hämatopoetischen Zellen bis auf Erythrozyten) und Gewebe wie zum Beispiel Muskel- und Endothelzellen und wurde sequestriert (Daten nicht gezeigt). Um die Adsorption des anti-CD83 mAk an umgebendes Gewebe zu verhindern, wurden zwei experimentelle Strategien gewählt: CD83tg oder Wildtyp B-Zellen wurden in *recombination activating gene* (Rag)-defiziente Mäuse, denen selbst reife B- und T-Lymphozyten fehlen, transferiert. In einem zweiten Ansatz wurden chimäre JHT/CD83tg Mäuse hergestellt, in denen die B-Zellen ausschließlich aus CD83tg Knochenmark heranreifen und nur 20 % aller anderen hämatopoetischen Zellen CD83tg waren. Die Immunisierung mit dem TI-Ag NIP-Ficoll in Gegenwart des anti-CD83 mAk führte in beiden Fällen zu keiner Rettung der CD83tg B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Der Befund, dass CD83tg nicht aber Wildtyp B-Zellen aus der Zirkulation verschwanden, lässt vermuten, dass die CD83tg B-Zellen in beiden Ansätzen durch Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) [145] depletiert wurden. Das Wildtyp B-Zellen dieses Schicksal nicht widerfährt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass CD83tg B-Zellen unphysiologisch viel, dass heißt bis zu 10-mal mehr CD83 auf ihrer Oberfläche exprimieren als Wildtyp B-Zellen [97], an das der anti-CD83 mAk binden und die ADCC auslösen könnte. Die Spaltung des anti-CD83 mAk (Ratten IgG1) in bivalente, kreuzvernetzende F(ab)₂- oder monovalente Fab-Fragmente würde eine Möglichkeit darstellen, die ADCC zu umgehen. Die Aussage, dass Ratten IgG1, wie in der Literatur beschrieben, schwer zu spalten beziehungsweise unvedaulich ist [146], konnte auch in dieser Arbeit nicht revidiert werden.

4.2.4 Warum führt das Engagement von CD83 während einer T-Zell-unabhängigen Immunisierung ausschließlich zur Steigerung von IgG1?

Die verstärkte negative Regulation durch die Überexpression von CD83 in CD83tg Mäusen führt zu einer dramatischen Reduktion der Ig-Antwort sowohl gegen TI, als auch gegen TD Modell-Ag [97]. Der inhibierende Effekt wirkt sich dabei auf alle Isotypen gleichermaßen aus. Die Blockade dieses negativen Signals durch den anti-CD83 mAk sollte deshalb ebenfalls einen Effekt auf alle Isotypen erwarten lassen. Allerdings führte das Engagement von CD83 während einer TI-Immunisierung ausschließlich zu Steigerung der IgG1-Antwort (Abb. 3.19). Verschiedene Mechanismen könnten zur selektiven Steigerung der IgG1-Antwort beitragen. Das Engagement von CD83 könnte mehr B-Zellen zum Klassenwechsel zu IgG1 triggern und somit eine erhöhte Frequenz IgG1-sezernierender B-Zellen induzieren. Andererseits könnten B-Zellen, die den Klassenwechsel bereits vollzogen haben, durch das CD83-Engagement zu verstärkter IgG1-Sekretion angeregt werden. Die Menge an reifem IgG1, das eine B-Zelle, die den Klassenwechsel von IgM zu IgG1 vollzogen hat, produziert, wird über die Aktivität einer 3'-IgH transkriptionsverstärkenden Region am IgH-Lokus reguliert. Deletionen an diesem transkriptionsverstärkenden Element ermöglichen der B-Zelle zwar noch den Klassenwechsel zu IgG1, verhindern aber die Produktion optimaler IgG1-Mengen [147]. Der 3'-IgH-Verstärker enthält etliche Oktamersequenzen mit der Konsensussequenz 5'-ATGCAAAT-3'. An diese Sequenz bindet der B-Zell-spezifische Oktamer-TF Oct-2 mit seinem Koaktivator OCA-B (*Oct coactivator from B cells*) [148]. Die Aktivität von Oct-2 und OCA-B am 3'-IgH-Verstärker determiniert die Menge an produziertem IgG1. Neben Octameren Bindeproteinen wird die Aktivität des Verstärkers auch durch NFκB reguliert [148, 149]. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von CD86 auf B-Zellen zu einer gesteigerten IgG1-Produktion führt. Dabei war die gesteigerte IgG1-Antwort nicht auf einen erhöhten Klassenwechsel zu IgG1, sondern auf eine erhöhte IgG1-Sekretion pro B-Zelle zurückzuführen [142, 143]. Als möglicher Mechanismus für die Steigerung der IgG1-Antwort nach CD86-Engagement wird die Induktion des TF Oct-2 und dessen Bindung an den 3'-IgH-Verstärker beschrieben. Darüber hinaus wird durch das Engagement von CD86 die Expression der antiapoptotischen Faktoren Bfl und Bcl-x(L) induziert, die Expression des proapoptotischen Faktors Caspase 8 hingegen vermindert,

was einen überlebensfördernden und somit auch einen auf die IgG1-Antwort positiven Effekt haben könnte [134, 144].

Das Engagement von CD83 könnte auch positive Signale in die B-Zelle vermitteln, die einen oder mehrere der oben genannten Wege, die zu gesteigerter IgG1-Antwort führen, fördern. Diese Theorie würde allerdings fordern, dass chimäre Mäuse, deren B-Zellen defizient für CD83 sind und dadurch weniger positive Signale erhalten, eine im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen schwächere NIP-spezifische IgG1-Antwort generieren. Die IgG1-Antwort der Mäuse, denen CD83 selektiv auf den B-Zellen fehlte, war im Vergleich zur Kontrollgruppe aber leicht gesteigert (Abb. 3.24). Die mit CD83tg und CD83mu Mäusen *in vitro* und *in vivo* generierten Daten und die Tatsache, dass die Bindung eines putativ neutralisierenden anti-CD83 mAk an aktivierungsinduziertes CD83 die IgG1-Antwort steigert, legen nahe, dass der anti-CD83 mAk die Transduktion negativer Signale, die im Normalfall einen inhibierenden Effekt auf die IgG1-Antwort ausgeübt hätten, verhindert.

4.2.5 Warum hat das Engagement von CD83 keinen Effekt auf die Ig-Antwort gegen T-Zell-abhängige Ag?

TI-Ag aktivieren B-Zellen, indem sie mit ihren hoch repetitiven Strukturen ein multivalentes Engagement des Ag-spezifischen BCR bewirken [19, 20]. Diese Arbeit zeigt, dass nur das simultane Engagement von CD83 und BCR eine optimale Steigerung der T-Zell-unabhängigen IgG1-Antwort bewirkt (Abb. 3.21). Diese wurde erreicht, indem der Antikörper frühestens 24 h vor oder spätestens 12 h nach der Immunisierung i.p. injiziert wurde. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Expressionsintensität von CD83 6 h nach B-Zell-Aktivierung durch TLR- oder BCR-Engagement bereits maximal ist [97]. Der Wirkungszeitraum des anti-CD83 mAk lässt darauf schließen, dass auch TI-Ag zu einer schnellen B-Zell-Aktivierung und aktivierungsinduzierten CD83-Expression führen. Die Reaktion auf TD-Ag ist hingegen etwas komplexer. Zwar wird auch in diesem Fall durch die Bindung des Ag und der Quervernetzung des BCR ein Signal in die B-Zelle transduziert, dieses reicht zur Reaktion auf TD-Ag allerdings nicht aus. Das Ag muss erst durch Endozytose internalisiert, proteolytisch gespalten und als Peptidfragment im Komplex mit MHC-II präsentiert werden [10, 11], bevor eine T_H-Zelle, die für eben dieses

Peptid spezifisch ist, an diesen Komplex bindet und über die Interaktion von CD40L mit CD40 das zweite Signal in die B-Zelle vermittelt und diese erst dadurch vollständig aktiviert. Es wäre denkbar, dass die zur B-Zell-Aktivierung durch TD-Ag notwendigen Ereignisse mehr Zeit beanspruchen, als die Aktivierung der B-Zelle durch TI-Ag. Die Konsequenz wäre eine bei der TD-Immunisierung im Vergleich zur TI-Immunisierung erst später auftretende, aktivierungsinduzierte Expression von CD83. Ein möglicher Grund für die nach üblicher Applikation des anti-CD83 mAk (24 h vor und 24 h nach der Immunisierung) ausbleibende Steigerung der TD IgG1-Antwort könnte ein versetztes Auftreten von maximaler CD83-Expression und hoher anti-CD83 mAk-Serumkonzentration sein.

Auch wäre denkbar, dass die B-Zell-Aktivierung durch TI-Ag, im Vergleich zur B-Zell-Aktivierung durch TD-Ag, das empfindlichere System darstellt. Eine Ig-Antwort gegen TD-Ag ließe sich dann leichter induzieren als eine Ig-Antwort gegen TI-Ag, so dass TD-Ag bereits eine optimale Ig-Antwort bewirken, die eine Steigerung dieser kaum möglich macht.

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit erworbenen Daten zeigen, dass CD83 die Funktion und Aktivierung muriner B-Zellen reguliert. Hinweise dafür wurden sowohl durch das Engagement von CD83 in Wildtyp Mäusen, als auch durch die Analyse CD83tg und CD83mu Mäuse gewonnen. In den nicht-konditionellen CD83tg und CD83mu Mäusen betrifft die im Vergleich zum Wildtyp verstärkte beziehungsweise verminderte CD83-Expression jede Zelle (CD83mu), beziehungsweise jede kernhaltige (CD83tg) Zelle und jedes Entwicklungsstadium. Natürlicherweise exprimieren B-Zellen CD83 erst jenseits des prä-B-Zell-Stadiums [65]. Die artifiziell verstärkte oder verminderte Expression von CD83 während der B-Zell-Reifung könnte zu einem intrinsischen Defekt der B-Zellen führen, so dass die gesteigerte beziehungsweise reduzierte Ig-Freisetzung in CD83mu oder CD83tg B-Zellen keine Konsequenz der veränderten CD83-Expression während der aktuellen Stimulation, sondern einen bei der Zellreifung erworbenen Defekt reflektiert. Auch wäre denkbar, dass die lebenslang verstärkte oder verminderte Expression von CD83 zu Kompensationsmechanismen einer Zelle führt, die die eigentlichen Konsequenzen der

Überexpression beziehungsweise Defizienz reduzieren. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die CD83mu Maus im Vergleich zur CD83tg Maus nur einen schwach reziproken Phänotyp aufweist (Abb. 3.5 und 3.7 und 3.8). Die verminderte Expression von CD86 und MHC-II auf CD83mu B-Zellen (Abb. 3.11) wurde als kompensatorischer Mechanismus für das Fehlen des putativ negativen Regulators CD83 interpretiert. Nur die Herstellung von konditionellen CD83tg und CD83^{-/-} Mäusen, bei denen eine verstärkte oder verminderte Expression von CD83 B-Zell-spezifisch erst auf reifen B-Zellen induziert wird, könnte einen Reifungsdefekt der nicht-konditionellen CD83tg und CD83mu B-Zellen ausschließen und die Frage klären, ob die gesteigerte beziehungsweise reduzierte Expression von CD86 und MHC-II auf CD83tg beziehungsweise CD83mu B-Zellen als ein kompensatorischer Mechanismus verstärkter beziehungsweise verminderter negativer Regulation durch CD83 verstanden werden kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch natürlicherweise auf B-Zellen exprimiertes CD83 eine wichtige Rolle spielt. Dieses wird durch die dramatische Steigerung der NIP-spezifischen IgG1-Anwort nach Applikation des anti-CD83 mAk deutlich. Der Mechanismus dieser Steigerung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Neben einem direkten Effekt auf die CD83-vermittelte Signaltransduktion wäre auch die Blockade des CD83L (Neutralisation eines negativen Signals) denkbar. Ob das Engagement von CD83 während einer Immunisierung das in die Zelle transduzierte Signal verändert, könnte durch die Analyse des Phosphorylierungsmusters mittels anti-Phosphotyrosin Western Blot untersucht werden. Blockiert der anti-CD83 mAk tatsächlich ein negatives Signal, wäre eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung von Tyrosinkinasen denkbar. Die Untersuchung der Expressionsprofile von Wildtyp B-Zellen, die während der Immunisierung entweder mit anti-CD83 mAk oder Kontroll-Ig konfrontiert wurden, könnte ebenfalls Hinweise zum Wirkmechanismus des anti-CD83 mAk liefern. Mit Hilfe eines DNA-Mikroarrays [150, 151] ließe sich feststellen, ob die Zellen sich in ihrem Genexpressionsmuster der für die Signalgebung und Funktion einer B-Zellen relevanten Gene unterscheiden.

Die Hypothese, dass der anti-CD83 mAk die Transduktion eines negativen Signals in die B-Zelle blockiert, könnte durch den Einsatz löslicher CD83-Spezies getestet werden. Stimmt die Hypothese, sollte der Einsatz von sCD83 ebenfalls einen steigernden Effekt auf die IgG1-Antwort ausüben. Die nur schwache Affinität von sCD83 für den

CD83-Liganden könnte durch die Verwendung von sCD83-Oligomeren umgangen werden.

Die Spaltung eines anti-CD83 mAk (der zu einer anderen Ig-Subklasse gehört, als der in dieser Arbeit verwendete anti-CD83 mAk) in kreuzvernetzende F(ab)₂- beziehungsweise monovalente Fab-Fragmenten würde ebenfalls klären, ob es sich bei dem anti-CD83 mAk um einen neutralisierend- oder einen agonistisch-wirkenden Antikörper handelt. Eine Steigerung der IgG1-Antwort durch F(ab)₂- und Fab-Fragmente würde für einen neutralisierenden Effekt des anti-CD83 mAk sprechen. Hätte nur das F(ab)₂-Fragment diese Wirkung, wäre ein agonistischer Effekt des anti-CD83 mAk und eine damit verbundene positive Signaltransduktion in die Zelle nahe liegend.

Das Engagement von CD83 auf CD83tg B-Zellen führte in dieser Arbeit vermutlich zu einer durch ADCC ausgelösten Depletion der CD83tg B-Zellen. Um den Phänotyp CD83tg B-Zellen *in vivo* zu retten, wäre ebenfalls der Einsatz von F(ab)₂- oder Fab-Fragmenten viel versprechend.

5 Zusammenfassung

CD83 hat eine zentrale Funktion bei der Reifung CD4⁺ T-Zellen im Thymus [72, 81]. In dieser Arbeit wurde der regulatorische Einfluss von CD83 auf die Aktivierung und Funktion muriner B-Lymphozyten analysiert und die Rolle von CD83 als kostimulatorischer Rezeptor bei der peripheren T-Zell-Aktivierung untersucht. Für diese Studien wurden Mausstämme verwendet, die CD83 transgen exprimierten oder CD83-defizient waren. Die Injektion eines anti-CD83 mAk in Wildtyp Mäuse ermöglichte jenseits der artifiziellen Systeme Untersuchungen zur Rolle von natürlicherweise exprimiertem CD83 auf die B-Zell-Aktivierung *in vivo*.

Es wurde gezeigt, dass die aktivierungsinduzierte Expression von CD83 auf murinen B-Lymphozyten eine biologische Funktion repräsentiert: CD83 übt eine Rolle bei der Regulation von B-Zell-Funktionen aus.

Die Analyse CD83tg B-Zellen *in vitro* zeigte, dass die Überexpression von CD83 mit der Funktion CD83tg B-Zellen interferiert. CD83tg B-Zellen wiesen im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen eine reduzierte Proliferation, eine verminderte Ig-Sekretion und eine geringere maximale freie intrazelluläre Kalziumkonzentration *in vitro* auf. Der Nachweis, einer im Vergleich zum Wildtyp gesteigerten IL-10 Antwort, schloss einen generellen Defekt der CD83tg B-Zellen aus. Die reduzierte Proliferation und verminderte Ig-Sekretion der CD83tg B-Zellen war weder durch eine erhöhte Apoptoserate, noch durch die gesteigerte IL-10 Sekretion oder eine reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle zu erklären. Ganz im Gegenteil war die Expressionsdichte der kostimulatorischen Moleküle CD86 und MHC-II auf CD83tg B-Zellen sogar gesteigert. Der Einsatz gereinigter B-Zellen zeigte, dass der Phänotyp CD83tg B-Zellen durch die Überexpression von CD83 auf den B-Zellen selbst und nicht durch die Überexpression von CD83 auf akzessorischen Zellen verursacht wurde. Die verminderte Expression von CD83 auf CD83mu B-Zellen führte zu einem reziproken Phänotyp. Proliferation und Ig-Sekretion waren im Vergleich zu Wildtyp B-Zellen gesteigert, die IL-10 Antwort und Expression von CD86 und MHC-II hingegen reduziert. Da CD83mu Mäuse durch das Fehlen von CD83 auf TECs eine reduzierte Frequenz CD4⁺ T-Zellen aufweisen, wurden in dieser Arbeit für die Analyse der Ig-Antwort CD83-defizienter Mäuse *in vivo* Knochenmarkchimären hergestellt. In diesen reiften normale Frequenzen CD4⁺ T-Zellen aus CD83mu Knochenmark an Wildtyp TECs. In Übereinstimmung mit den *in vitro* generierten Daten zeigte sich auch *in vivo* eine

dramatisch reduzierte Ag-spezifische Ig-Antwort der CD83tg und eine leicht gesteigerte Ag-spezifische Ig-Antwort der CD83mu Mäuse.

Ein Einfluss von CD83 auf die Funktion muriner T-Lymphozyten wurde nicht nachgewiesen. Gereinigte T-Zellen von CD83tg und Wildtyp Mäusen reagierten *in vitro* mit vergleichbarer Proliferation, Zytokinsekretion und ähnlichem maximalen Kalziumeinstrom. Auch eine zentrale Rolle von CD83 auf APCs als kostimulatorisches Element der T-Zell-Aktivierung wurde ausgeschlossen. CD83tg APCs zeigten eine nur unwesentlich bessere Stimulation CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Da dieser Unterschied nur bei MHC-II-restringierten CD4⁺ T-Zellen zu beobachten war, reflektiert er wahrscheinlich keine stärkere Kostimulation durch CD83, sondern die ebenfalls stärkere Expression von MHC-II auf CD83tg APCs.

CD83 wird natürlicherweise verstärkt auf aktivierten Wildtyp B-Lymphozyten exprimiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht nur ein B-Zell-spezifischer, sondern auch ein T-Zell-spezifischer Stimulus die Expression von CD83 auf B-Zellen induziert. Wurde CD83 in Wildtyp Mäusen während einer T-Zell-unabhängigen B-Zell-Aktivierung engagiert, kam es zu einer 100-fachen Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort. Diese Steigerung war dosisabhängig und besonders effizient, wenn der anti-CD83 mAk während des BCR-Engagements in hoher Konzentration im Serum vorlag. Durch die Herstellung gemischter Chimären und die Begrenzung der CD83-Defizienz auf B-Zellen oder CD11c⁺ DCs wurde gezeigt, dass das Engagement von CD83 auf den B-Zellen, nicht aber auf CD11c⁺ DCs, zur Steigerung der Ag-spezifischen IgG1-Antwort führt. In dieser Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, dass natürlicherweise in Wildtyp Mäusen auf Wildtyp B-Zellen exprimiertes CD83 eine regulatorische Rolle bei der B-Zell-Antwort hat.

1. Ohteki, T. (2007): The dynamics of dendritic cell: mediated innate immune regulation. *Allergol Int* **56**:209-14.
2. Sato, K. and S. Fujita (2007): Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* **56**:183-91.
3. van Vliet, S.J., J. den Dunnen, S.I. Gringhuis, T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk (2007): Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* **19**:435-40.
4. Kirwan, S.E. and D.N. Burshtyn (2007): Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol* **19**:46-54.
5. Gordon, S. (2002): Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**:927-30.
6. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197-216.
7. Rus, H., C. Cudrici, and F. Niculescu (2005): The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* **33**:103-12.
8. Mitchell, G.F. (2008): Selection, memory and selective memories: T cells, B cells and Sir Mac 1968. *Immunol Cell Biol* **86**:26-30.
9. Cohn, M., N.A. Mitchison, W.E. Paul, A.M. Silverstein, D.W. Talmage, and M. Weigert (2007): Reflections on the clonal-selection theory. *Nat Rev Immunol* **7**:823-30.
10. Lanzavecchia, A. (1985): Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* **314**:537-9.
11. Clark, L.B., T.M. Foy, and R.J. Noelle (1996): CD40 and its ligand. *Adv Immunol* **63**:43-78.
12. Bishop, G.A. and B.S. Hostager (2003): The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:297-309.
13. Smith, K.G., T.D. Hewitson, G.J. Nossal, and D.M. Tarlinton (1996): The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* **26**:444-8.
14. McHeyzer-Williams, M.G. and R. Ahmed (1999): B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* **11**:172-9.
15. Berek, C., A. Berger, and M. Apel (1991): Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**:1121-9.
16. Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**:751-8.
17. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch (1997): Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**:133-4.
18. Hasbold, J., A.B. Lyons, M.R. Kehry, and P.D. Hodgkin (1998): Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol* **28**:1040-51.
19. Vos, Q., A. Lees, Z.Q. Wu, C.M. Snapper, and J.J. Mond (2000): B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* **176**:154-70.
20. Jeurissen, A., J.L. Ceuppens, and X. Bossuyt (2004): T lymphocyte dependence of the antibody response to 'T lymphocyte independent type 2' antigens. *Immunology* **111**:1-7.
21. Pecanha, L.M., C.M. Snapper, F.D. Finkelman, and J.J. Mond (1991): Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-

- mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence. *J Immunol* **146**:833-9.
22. Mond, J.J., A. Lees, and C.M. Snapper (1995): T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**:655-92.
 23. Mond, J.J., P.K. Mongini, D. Sieckmann, and W.E. Paul (1980): Role of T lymphocytes in the response to TNP-AECM-Ficoll. *J Immunol* **125**:1066-70.
 24. Mongini, P.K., K.E. Stein, and W.E. Paul (1981): T cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens. *J Exp Med* **153**:1-12.
 25. Endres, R.O., E. Kushnir, J.W. Kappler, P. Marrack, and S.C. Kinsky (1983): A requirement for nonspecific T cell factors in antibody responses to "T cell independent" antigens. *J Immunol* **130**:781-4.
 26. Van den Eertwegh, A.J., R.J. Noelle, M. Roy, D.M. Shepherd, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, W.J. Boersma, and E. Claassen (1993): In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J Exp Med* **178**:1555-65.
 27. Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani (1994): The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **1**:167-78.
 28. Renshaw, B.R., W.C. Fanslow, 3rd, R.J. Armitage, K.A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B.L. Davison, and C.R. Maliszewski (1994): Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* **180**:1889-900.
 29. Xu, J., T.M. Foy, J.D. Laman, E.A. Elliott, J.J. Dunn, T.J. Waldschmidt, J. Elsemore, R.J. Noelle, and R.A. Flavell (1994): Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* **1**:423-31.
 30. Leiva, L.E., B. Butler, J. Hempe, A.P. Ortigas, and R.U. Sorensen (2001): Up-regulation of CD40 ligand and induction of a Th2 response in children immunized with pneumococcal polysaccharide vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:233-40.
 31. Dullforce, P., D.C. Sutton, and A.W. Heath (1998): Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat Med* **4**:88-91.
 32. Harding, C.V., R.W. Roof, P.M. Allen, and E.R. Unanue (1991): Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2740-4.
 33. Park, S.H. and A. Bendelac (2000): CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature* **406**:788-92.
 34. Castigli, E., S.A. Wilson, S. Scott, F. Dedeoglu, S. Xu, K.P. Lam, R.J. Bram, H. Jabara, and R.S. Geha (2005): TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* **201**:35-9.
 35. Litinskiy, M.B., B. Nardelli, D.M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti (2002): DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-9.
 36. Stein, J.V., M. Lopez-Fraga, F.A. Elustondo, C.E. Carvalho-Pinto, D. Rodriguez, R. Gomez-Caro, J. De Jong, A.C. Martinez, J.P. Medema, and M. Hahne (2002): APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* **109**:1587-98.
 37. Sze, D.M., K.M. Toellner, C. Garcia de Vinuesa, D.R. Taylor, and I.C. MacLennan (2000): Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* **192**:813-21.

38. O'Connor, B.P., M.W. Gleeson, R.J. Noelle, and L.D. Erickson (2003): The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev* **194**:61-76.
39. DeFranco, A.L. (1997): The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* **9**:296-308.
40. Gold, M.R. (2002): To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. *Trends Pharmacol Sci* **23**:316-24.
41. Poe, J.C., M. Hasegawa, and T.F. Tedder (2001): CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Int Rev Immunol* **20**:739-62.
42. Pritchard, N.R. and K.G. Smith (2003): B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* **108**:263-73.
43. Muta, T., T. Kurosaki, Z. Misulovin, M. Sanchez, M.C. Nussenzweig, and J.V. Ravetch (1994): A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **368**:70-3.
44. Daeron, M., S. Latour, O. Malbec, E. Espinosa, P. Pina, S. Pasmans, and W.H. Fridman (1995): The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**:635-46.
45. Daeron, M. (1997): Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* **15**:203-34.
46. Doody, G.M., L.B. Justement, C.C. Delibrias, R.J. Matthews, J. Lin, M.L. Thomas, and D.T. Fearon (1995): A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269**:242-4.
47. Gary-Gouy, H., J. Harriague, A. Dalloul, E. Donnadieu, and G. Bismuth (2002): CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* **168**:232-9.
48. Chen, T., W. Zimmermann, J. Parker, I. Chen, A. Maeda, and S. Bolland (2001): Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J Leukoc Biol* **70**:335-40.
49. Meyaard, L., G.J. Adema, C. Chang, E. Woollatt, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips (1997): LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* **7**:283-90.
50. Kubagawa, H., P.D. Burrows, and M.D. Cooper (1997): A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5261-6.
51. Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella, and M. Lopez-Botet (1997): A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* **186**:1809-18.
52. Adachi, T., H. Flaswinkel, H. Yakura, M. Reth, and T. Tsubata (1998): The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. *J Immunol* **160**:4662-5.
53. Smith, K.G., D.M. Tarlinton, G.M. Doody, M.L. Hibbs, and D.T. Fearon (1998): Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J Exp Med* **187**:807-11.
54. Fluckiger, A.C., Z. Li, R.M. Kato, M.I. Wahl, H.D. Ochs, R. Longnecker, J.P. Kinet, O.N. Witte, A.M. Scharenberg, and D.J. Rawlings (1998): Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *Embo J* **17**:1973-85.

55. Scharenberg, A.M., O. El-Hillal, D.A. Fruman, L.O. Beitz, Z. Li, S. Lin, I. Gout, L.C. Cantley, D.J. Rawlings, and J.P. Kinet (1998): Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo J* **17**:1961-72.
56. Zhou, L.J., R. Schwarting, H.M. Smith, and T.F. Tedder (1992): A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* **149**:735-42.
57. Kozlow, E.J., G.L. Wilson, C.H. Fox, and J.H. Kehrl (1993): Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood* **81**:454-61.
58. Twist, C.J., D.R. Beier, C.M. Disteché, S. Edelhoff, and T.F. Tedder (1998): The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization. *Immunogenetics* **48**:383-93.
59. Berchtold, S., T. Jones, P. Muhl-Zurbes, D. Sheer, G. Schuler, and A. Steinkasserer (1999): The human dendritic cell marker CD83 maps to chromosome 6p23. *Ann Hum Genet* **63**:181-3.
60. Hansell, C., X.W. Zhu, H. Brooks, M. Sheppard, S. Withanage, D. Maskell, and I. McConnell (2007): Unique features and distribution of the chicken CD83+ cell. *J Immunol* **179**:5117-25.
61. Ohta, Y., E. Landis, T. Boulay, R.B. Phillips, B. Collet, C.J. Secombes, M.F. Flajnik, and J.D. Hansen (2004): Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *J Immunol* **173**:4553-60.
62. Donate, C., N. Roher, J.C. Balasch, L. Ribas, F.W. Goetz, J.V. Planas, L. Tort, and S. MacKenzie (2007): CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol* **23**:877-85.
63. Berchtold, S., P. Muhl-Zurbes, C. Heufler, P. Winklehner, G. Schuler, and A. Steinkasserer (1999): Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett* **461**:211-6.
64. Zhou, L.J. and T.F. Tedder (1995): Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **154**:3821-35.
65. Luthje, K., B. Kretschmer, B. Fleischer, and M. Breloer (2008): CD83 regulates splenic B cell maturation and peripheral B cell homeostasis. *Int Immunol* **20**:949-60.
66. Wolenski, M., S.O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, G. Grossschupff, K. Tenner-Racz, P. Racz, B. Fleischer, and A. von Bonin (2003): Expression of CD83 in the murine immune system. *Med Microbiol Immunol* **192**:189-92.
67. Nicod, L.P., S. Joudrier, P. Isler, A. Spiliopoulos, and J.C. Pache (2005): Upregulation of CD40, CD80, CD83 or CD86 on alveolar macrophages after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* **24**:1067-75.
68. Iking-Konert, C., C. Wagner, B. Deneffle, F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G.M. Hansch (2002): Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* **130**:501-8.
69. Yamashiro, S., J.M. Wang, D. Yang, W.H. Gong, H. Kamohara, and T. Yoshimura (2000): Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* **96**:3958-63.

70. Mailliard, R.B., S.M. Alber, H. Shen, S.C. Watkins, J.M. Kirkwood, R.B. Herberman, and P. Kalinski (2005): IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* **202**:941-53.
71. Di Pucchio, T., C. Lapenta, S.M. Santini, M. Logozzi, S. Parlato, and F. Belardelli (2003): CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**:358-67.
72. Fujimoto, Y., L. Tu, A.S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D.A. Steeber, and T.F. Tedder (2002): CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* **108**:755-67.
73. Cao, W., S.H. Lee, and J. Lu (2005): CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* **385**:85-93.
74. Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj (1998): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **188**:1359-68.
75. Klein, E., S. Koch, B. Borm, J. Neumann, V. Herzog, N. Koch, and T. Bieber (2005): CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* **17**:477-87.
76. Kretschmer, B., K. Luthje, A.H. Guse, S. Ehrlich, F. Koch-Nolte, F. Haag, B. Fleischer, and M. Breloer (2007): CD83 modulates B Cell function in vitro: increased IL-10 and reduced Ig secretion by CD83Tg B cells. *PLoS ONE* **2**:e755.
77. Lechmann, M., D.J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C.G. Figdor, G. Schuler, and A. Steinkasserer (2001): The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* **194**:1813-21.
78. Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, K.E. Hellstrom, I. Hellstrom, and J.A. Ledbetter (2001): CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol* **166**:3865-72.
79. Hirano, N., M.O. Butler, Z. Xia, S. Ansen, M.S. von Bergwelt-Baildon, D. Neuberg, G.J. Freeman, and L.M. Nadler (2006): Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* **107**:1528-36.
80. Cramer, S.O., C. Trumpfheller, U. Mehlhoop, S. More, B. Fleischer, and A. von Bonin (2000): Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol* **12**:1347-51.
81. Garcia-Martinez, L.F., M.W. Appleby, K. Staehling-Hampton, D.M. Andrews, Y. Chen, M. McEuen, P. Tang, R.L. Rhinehart, S. Proll, B. Paeper, M.E. Brunkow, A.G. Grandea, 3rd, E.D. Howard, D.E. Walker, P. Charmley, M. Jonas, S. Shaw, J.A. Latham, and F. Ramsdell (2004): A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4+ T cells. *J Immunol* **173**:2995-3001.
82. Luthje, K., S.O. Cramer, S. Ehrlich, A. Veit, C. Steeg, B. Fleischer, A. Bonin, and M. Breloer (2006): Transgenic expression of a CD83-immunoglobulin fusion protein impairs the development of immune-competent CD4-positive T cells. *Eur J Immunol* **36**:2035-45.

83. Zinser, E., M. Lechmann, A. Golka, M.B. Lutz, and A. Steinkasserer (2004): Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *J Exp Med* **200**:345-51.
84. Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, and J.A. Ledbetter (2002): Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* **168**:2599-602.
85. Xu, J.F., B.J. Huang, H. Yin, P. Xiong, W. Feng, Y. Xu, M. Fang, F. Zheng, C.Y. Wang, and F.L. Gong (2007): A limited course of soluble CD83 delays acute cellular rejection of MHC-mismatched mouse skin allografts. *Transpl Int* **20**:266-76.
86. Pashine, A., U. Gopfert, J. Chen, E. Hoffmann, P.S. Dietrich, and S.L. Peng (2008): Failed efficacy of soluble human CD83-Ig in allogeneic mixed lymphocyte reactions and experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for a lack of therapeutic potential. *Immunol Lett* **115**:9-15.
87. Hock, B.D., L.F. Haring, A. Steinkasserer, K.G. Taylor, W.N. Patton, and J.L. McKenzie (2004): The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res* **28**:237-41.
88. Senechal, B., A.M. Boruchov, J.L. Reagan, D.N. Hart, and J.W. Young (2004): Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* **103**:4207-15.
89. Prazma, C.M. and T.F. Tedder (2008): Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander? *Immunol Lett* **115**:1-8.
90. Engelmayer, J., M. Larsson, M. Subklewe, A. Chahroudi, W.I. Cox, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj (1999): Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* **163**:6762-8.
91. Jenne, L., G. Schuler, and A. Steinkasserer (2001): Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol* **22**:102-7.
92. Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber, and A. Steinkasserer (2000): Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* **74**:7127-36.
93. Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, S. Tuyaerts, J. Corthals, J.L. Aerts, A. Bonehill, K. Thielemans, and K. Breckpot (2007): CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* **37**:686-95.
94. Prechtel, A.T., N.M. Turza, A.A. Theodoridis, and A. Steinkasserer (2007): CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* **178**:5454-64.
95. Yang, S., Y. Yang, J. Raycraft, H. Zhang, S. Kanan, Y. Guo, Z. Ronai, I. Hellstrom, and K.E. Hellstrom (2004): Melanoma cells transfected to express CD83 induce antitumor immunity that can be increased by also engaging CD137. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4990-5.
96. Wolenski, M., S.O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, B. Fleischer, and A. von Bonin (2003): Enhanced activation of CD83-positive T cells. *Scand J Immunol* **58**:306-11.
97. Breloer, M., B. Kretschmer, K. Luthje, S. Ehrlich, U. Ritter, T. Bickert, C. Steeg, S. Fillatreau, K. Hoehlig, V. Lampropoulou, and B. Fleischer (2007): CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. *Eur J Immunol* **37**:634-48.

98. Taylor, B.A., D.W. Bailey, M. Cherry, R. Riblet, and M. Weigert (1975): Genes for immunoglobulin heavy chain and serum prealbumin protein are linked in mouse. *Nature* **256**:644-6.
99. Trowbridge, I.S. and C. Mazauskas (1976): Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins. *Eur J Immunol* **6**:557-62.
100. Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, and F.R. Carbone (1998): Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* **76**:34-40.
101. Wolenski, M. (2003): Murines CD83: Funktionelle Charakterisierung eines Aktivierungsmarkers auf Zellen des Immunsystems. *Dissertation BNI-Immunologie*.
102. Gu, H., Y.R. Zou, and K. Rajewsky (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**:1155-64.
103. Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang (2002): In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**:211-20.
104. Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y.J. Liu (1995): Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* **268**:720-2.
105. Burdin, N., C. Van Kooten, L. Galibert, J.S. Abrams, J. Wijdenes, J. Banchereau, and F. Rousset (1995): Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* **154**:2533-44.
106. Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**:683-765.
107. Pestka, S., C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, and P.B. Fisher (2004): Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* **22**:929-79.
108. Kuwano, Y., C.M. Prazma, N. Yazawa, R. Watanabe, N. Ishiura, A. Kumanogoh, H. Okochi, K. Tamaki, M. Fujimoto, and T.F. Tedder (2007): CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells. *Int Immunol* **19**:977-92.
109. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman (2002): The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**:116-26.
110. Kretschmer, B., K. Luthje, S. Ehrlich, A. Osterloh, M. Piedavent, B. Fleischer, and M. Breloer (2008): CD83 on murine APC does not function as a costimulatory receptor for T cells. *Immunol Lett* **120**:87-95.
111. Breloer, M. and B. Fleischer (2008): CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol* **29**:186-94.
112. Jones, K.W. and C.J. Hackett (1996): Activated T hybridomas induce upregulation of B7-1 on bystander B lymphoma cells by a contact-dependent interaction utilizing CD40 ligand. *Cell Immunol* **174**:42-53.
113. Prazma, C.M., N. Yazawa, Y. Fujimoto, M. Fujimoto, and T.F. Tedder (2007): CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *J Immunol* **179**:4550-62.
114. Lechmann, M., N. Shuman, A. Wakeham, and T.W. Mak (2008): The CD83 reporter mouse elucidates the activity of the CD83 promoter in B, T, and dendritic cell populations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11887-92.

115. O'Rourke, L., R. Tooze, and D.T. Fearon (1997): Co-receptors of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **9**:324-9.
116. Lechmann, M., N. Kotzor, E. Zinser, A.T. Prechtel, H. Sticht, and A. Steinkasserer (2005): CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:132-9.
117. Matthias, P. and A.G. Rolink (2005): Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* **5**:497-508.
118. Casola, S. (2007): Control of peripheral B-cell development. *Curr Opin Immunol* **19**:143-9.
119. Harnett, M.M., E. Katz, and C.A. Ford (2005): Differential signalling during B-cell maturation. *Immunol Lett* **98**:33-44.
120. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran (2004): Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev* **197**:206-18.
121. Lam, K.P., R. Kuhn, and K. Rajewsky (1997): In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**:1073-83.
122. Pawson, T. (1995): Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-80.
123. Ren, R., B.J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore (1993): Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**:1157-61.
124. Perlmutter, R.M., S.D. Levin, M.W. Appleby, S.J. Anderson, and J. Alberola-Ila (1993): Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Annu Rev Immunol* **11**:451-99.
125. McCubrey, J.A., W.S. May, V. Duronio, and A. Mufson (2000): Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* **14**:9-21.
126. Mann, M., S.E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O.N. Jensen, and A. Pandey (2002): Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**:261-8.
127. Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake, and H.R. Petty (2000): Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* **165**:3541-4.
128. Lang, P., J.C. Stolpa, B.A. Freiberg, F. Crawford, J. Kappler, A. Kupfer, and J.C. Cambier (2001): TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers. *Science* **291**:1537-40.
129. Leveille, C., J.G. Castaigne, D. Charron, and R. Al-Daccak (2002): MHC class II isotype-specific signaling complex on human B cells. *Eur J Immunol* **32**:2282-91.
130. Leveille, C., A.L.-D. R., and W. Mourad (1999): CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* **29**:65-74.
131. Angelisova, P., I. Hilgert, and V. Horejsi (1994): Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* **39**:249-56.
132. Kin, N.W. and V.M. Sanders (2006): CD86 stimulation on a B cell activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and phospholipase C gamma 2/protein kinase C alpha beta signaling pathways. *J Immunol* **176**:6727-35.
133. Bishop, G.A., S.A. Haxhinasto, L.L. Stunz, and B.S. Hostager (2003): Antigen-specific B-lymphocyte activation. *Crit Rev Immunol* **23**:149-97.

134. Suvas, S., V. Singh, S. Sahdev, H. Vohra, and J.N. Agrewala (2002): Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* **277**:7766-75.
135. Mooney, N.A., C. Grillo-Courvalin, C. Hivroz, L.Y. Ju, and D. Charron (1990): Early biochemical events after MHC class II-mediated signaling on human B lymphocytes. *J Immunol* **145**:2070-6.
136. Cambier, J.C., M.K. Newell, L.B. Justement, J.C. McGuire, K.L. Leach, and Z.Z. Chen (1987): Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* **327**:629-32.
137. Lane, P.J., F.M. McConnell, G.L. Schieven, E.A. Clark, and J.A. Ledbetter (1990): The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J Immunol* **144**:3684-92.
138. Charron, D., S. Brick-Ghannam, R. Ramirez, and N. Mooney (1991): HLA class-II-mediated B-lymphocyte activation: signal transduction and physiologic consequences. *Res Immunol* **142**:467-74.
139. Scholl, P.R. and R.S. Geha (1994): MHC class II signaling in B-cell activation. *Immunol Today* **15**:418-22.
140. Tabata, H., T. Matsuoka, F. Endo, Y. Nishimura, and S. Matsushita (2000): Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J Biol Chem* **275**:34998-5005.
141. Jeannin, P., Y. Delneste, S. Lecoanet-Henchoz, J.F. Gauchat, J. Ellis, and J.Y. Bonnefoy (1997): CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J Biol Chem* **272**:15613-9.
142. Kasproicz, D.J., A.P. Kohm, M.T. Berton, A.J. Chruscinski, A. Sharpe, and V.M. Sanders (2000): Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J Immunol* **165**:680-90.
143. Podojil, J.R. and V.M. Sanders (2003): Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation. *J Immunol* **170**:5143-51.
144. Podojil, J.R., N.W. Kin, and V.M. Sanders (2004): CD86 and beta2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells. *J Biol Chem* **279**:23394-404.
145. Young, J.D. and Z.A. Cohn (1987): Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv Immunol* **41**:269-332.
146. Rousseaux, J., R. Rousseaux-Prevost, and H. Bazin (1983): Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Methods* **64**:141-6.
147. Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogne (2001): Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**:187-99.
148. Tang, H. and P.A. Sharp (1999): Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity* **11**:517-26.
149. Michaelson, J.S., M. Singh, C.M. Snapper, W.C. Sha, D. Baltimore, and B.K. Birnstein (1996): Regulation of 3' IgH enhancers by a common set of factors, including kappa B-binding proteins. *J Immunol* **156**:2828-39.

150. Pollack, J.R., C.M. Perou, A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, A. Pergamenschikov, C.F. Williams, S.S. Jeffrey, D. Botstein, and P.O. Brown (1999): Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* **23**:41-6.
151. Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-70.