

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR  
NEPHROLOGIE  
LEITER: PROF. DR. BERNHARD BANAS  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*WIRKUNG VON INTERLEUKIN-3 AUF HUMANE B-ZELLEN UND REGULATION  
IHRER INTERLEUKIN-3 REZEPTOR EXPRESSION*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sophia Metz

2017



AUS DER ABTEILUNG  
FÜR  
NEPHROLOGIE  
LEITER: PROF. DR. BERNHARD BANAS  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*WIRKUNG VON INTERLEUKIN-3 AUF HUMANE B-ZELLEN UND REGULATION  
IHRER INTERLEUKIN-3 REZEPTOR EXPRESSION*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sophia Metz

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Jonathan Jantsch
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Dezember 2017

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	11
1.1 Lymphozyten.....	11
1.1.1 B-Lymphozyten.....	11
1.1.2 T-Lymphozyten.....	13
1.2 Interleukin-3.....	14
1.2.1 Struktur von Interleukin-3.....	14
1.2.2 Wirkung von Interleukin-3.....	15
1.2.2.1 Wirkung auf T- und B-Lymphozyten.....	15
1.2.2.2 Wirkung auf Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.....	16
1.2.2.3 Wirkung auf Basophile und Mastzellen.....	17
1.2.3 Produzenten von Interleukin-3.....	18
1.3 Interleukin-3 Rezeptor.....	18
1.3.1 Struktur des Interleukin-3 Rezeptor.....	18
1.3.2 Struktur der $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-3 Rezeptor.....	20
1.3.3 Struktur der humanen $\beta_c$ Untereinheit.....	22
1.3.4 Struktur der murinen IL-3 $\beta$ -Untereinheit.....	24
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Laborgeräte und Labormaterialien.....	27
2.1.1 Geräte.....	27
2.1.2 Glasware und Plastikware.....	28
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien.....	29
2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze.....	29
2.1.5 Kits.....	30
2.1.6 Zytokine, Stimulanzen, Antikörper und Enzyme.....	30
2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer.....	31
2.1.7.1 ELISA.....	31
2.1.7.2 Zellseparation.....	31
2.1.7.3 Zellkulturmedien.....	31

2.1.8	Antikörper und Färbungen für die Durchflusszytometrie.....	32
2.1.9	Analyse- und Bearbeitungsprogramme .....	32
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Gewinnung von PBMC aus Vollblut.....	32
2.2.2	Bestimmung der Zellzahlen.....	33
2.2.3	Magnetische Zellseparation .....	34
2.2.3.1	Aufreinigung von CD19 <sup>+</sup> B-Zellen.....	34
2.2.3.2	Aufreinigung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	35
2.2.4	MACS-Check .....	36
2.2.5	Kultivierung und Lagerung humaner Zellen.....	37
2.2.6	Zellkulturansätze.....	38
2.2.7	Gewinnung der Zellkulturüberstände.....	39
2.2.8	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	40
2.2.9	Durchflusszytometrie .....	41
2.2.9.1	CFSE-Färbung zur Proliferationsmessung .....	42
2.2.9.2	Extrazelluläre Färbung .....	42
3.	Ergebnisse .....	44
3.1	Die Wirkung von Interleukin-3 auf B-Zellen.....	44
3.1.1	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Proliferation von B-Zellen .....	44
3.1.1.1	Zeitkinetik der Proliferation von B-Zellen unter Stimulation mit Interleukin-3..	44
3.1.1.2	Stimulation der Proliferation von B-Zellen aus peripherem Blut mit verschiedenen Stimulanzien und Interleukin-3.....	47
3.1.1.3	Steigerung des Überlebens von B-Zellen aus peripherem Blut durch Interleukin- 3 .....	49
3.1.1.4	Kostimulation von B-Zellen mit CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	51
3.1.2	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung von B-Zellen .....	53
3.1.2.1	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Memory-B-Zellen und deren Proliferation .....	53
3.1.2.2	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen .....	56
3.1.3	Die Wirkung von Interleukin-3 auf das von B-Zellen exprimierte Zytokinprofil .....	56

3.1.3.1	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-6 durch humane B-Zellen .....	57
3.1.3.2	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-10 durch humane B-Zellen .....	58
3.1.3.3	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-13 durch humane B-Zellen .....	59
3.2	Regulation der Interleukin-3 Rezeptor Expression auf humanen B-Zellen .....	60
3.2.1	Interleukin-3 Bindung an B-Zellen .....	60
3.2.2	Expression von CD123 auf B-Zellen .....	61
3.2.2.1	Auswirkung der artifiziellen B-Zellstimulation auf die Expression von CD123	61
3.2.2.2	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die CD123-Expression von B-Zellen.....	64
3.2.2.3	CD123-Expression auf B-Zellen unter Kostimulation mit CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	67
3.2.2.4	CD123-Expression auf B-Zellen unter Stimulation mit verschiedenen Interleukinen.....	70
3.2.2.5	CD123-Expression auf B-Zellen unter Stimulation mit Interleukin-2 und Interleukin-4 und Co-Stimulation mit CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	72
4.	Diskussion .....	76
4.1	Wirkung von Interleukin-3 auf B-Zellen .....	76
4.1.1	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Proliferation von B-Zellen .....	76
4.1.1.1	Proliferation unter Stimulation mit bekannten B-Zellstimulanzen.....	76
4.1.1.2	Proliferation unter Stimulation mit Interleukin-3 .....	78
4.1.2	Die Wirkung von Interleukin-3 auf das Überleben reifer B-Zellen .....	80
4.1.3	Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung reifer B-Zellen zu Memory-B-Zellen bzw. deren Proliferation.....	81
4.2	Die Expression von CD123 auf reifen humanen B-Zellen .....	82
4.2.1	Die Expression von CD123 auf B-Zellen unter Stimulation.....	82
4.2.2	Die Auswirkung von Interleukin-3 auf die Expression seines Rezeptors.....	84
4.3	Einfluss der Kostimulation mit CD4 <sup>+</sup> T-Zellen auf die Wirkung von Interleukin-3.....	85
4.4	Die Wirkung von Interleukin-2 und Interleukin-4 auf die Expression des Interleukin-3 Rezeptors humaner B-Zellen.....	86
4.4.1	Interleukin-2.....	86
4.4.2	Interleukin-4.....	87
4.5	Die Wirkung von Interleukin-3 auf das von B-Zellen exprimierte Zytokinprofil .....	88

5. Zusammenfassung .....	91
6. Quellenverzeichnis .....	93
7. Abbildungsverzeichnis .....	106
8. Tabellenverzeichnis .....	107
9. Danksagung .....	108

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
a	Anti
Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
aCD	Anti-CD, Antikörper gegen CD-Molekül auf Zelloberfläche
Ak	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Anti-HA	Anti-Hämagglutinin
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Basophile	Basophile Granulozyten
$\beta$ c	gemeinsame Untereinheit des IL-3, IL-5 und GM-CSF Rezeptors („common beta chain“)
$\beta$ IL-3	IL-3 spezifische Rezeptoruntereinheit
BCP	B-Zell Vorläuferzellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

CPG	Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin (DNA-Abschnitt)
C-Region	konstante Region eines Antikörpers
CRP	C-reaktives Protein
CSA/CSB/CSC	Chondroitinsulfat A/B/C
CSF	colony stimulating factor
C-terminal	carboxy-terminal
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Eosinophile	eosinophile Granulozyten
F(ab) <sub>2</sub>	antigenbindendes Antikörperfragment
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
Fc	konstanter Antikörperteil
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
G0-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	Zellzyklusphase des Wachstum und Zellorganellbildung
Gew.-%	Gewichtsprozent
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie- stimulierender Faktor
h	human
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-3R	Interleukin-3 Rezeptor
IL-3R $\alpha$	Untereinheit des Interleukin-3 Rezeptors
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO-Maus	Knockout-Maus, Maus bei der durch genetische Manipulation ein Gen inaktiviert wurde
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
m	murin
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	mitogen activated protein kinase
Met	Methionin
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	millimolar
$\mu$ m	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NTD	N-terminale Domäne
N-terminal	aminoterminal
o.g.	oben genannt(e)

PE	Phycoerythrin
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pM	pikomolar
Pro	Prolin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PWM	Pokeweed Mitogen
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellmedium benannt nach Entwicklungsort
RT	Raumtemperatur
SAC	spindle assembly checkpoint
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSC	sideward scatter
STAT	signal transducers and activators of transcription
Staph.	Staphylococcus
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Thr	Threonin
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
V-Region	variable Antikörperregion
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Lymphozyten

Lymphozyten sind unter anderem zelluläre Bestandteile des Blutes. Es lassen sich funktional drei Haupttypen von reifen Lymphozyten unterscheiden.

B-Lymphozyten:

- Produzenten von Antikörpern
- Vermittler der humoralen Immunantwort

T-Lymphozyten:

- CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen: Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen, Stimulation der Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen
- CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen: Zerstörung infizierter oder tumorös veränderter Zellen

Natural-Killer-Zellen:

- Teil des angeborenen Immunsystems
- Vermittlung der Abtötung virusinfizierter oder beschädigter Körperzellen

Lymphozyten sind als Mediatoren des adaptiven Immunsystems in der Lage, Antigene zu erkennen und durch ein Zusammenspiel humoraler und zellvermittelter Mechanismen hochspezifisch auf eben diese Antigene zu reagieren. Jede Reihe an Lymphozytenklonen stammt dabei von einer Vorläuferzelle ab, deren Antigenrezeptor auf eine spezifische Antigenregion anspricht. Durch die Vielfalt von Millionen verschiedener Klone kann der menschliche Körper auf ebenfalls Millionen verschiedener Antigene spezifisch reagieren. B-Lymphozyten reifen beim erwachsenen Menschen im Knochenmark, während T-Lymphozyten ihre immunologische Kompetenz im Thymus erwerben. [1]

### 1.1.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten haben einen Durchmesser von 6-10µm, ihr großer Zellkern ist von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Nach Aktivierung vergrößert sich in erster Linie der Zytoplasmaanteil. Bei Vögeln entwickeln sich die B-Lymphozyten in einem speziellen Organ, der sogenannten Bursa Fabricii. Von ihr leitet sich seit der Entdeckung der Zellen in den 60er Jahren der Name B-Zelle ab.

Beim Menschen machen B-Lymphozyten etwa 5-15% der gesamten Lymphozyten aus. Sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark und zirkulieren im reifen Zustand zwischen dem Blut und den lymphatischen Organen. Während ihrer Entwicklung gehen ca. 75% der B-Zellen in die Apoptose über, weil ihr B-Zell-Rezeptor körpereigene Strukturen erkennt oder fehlerhaft ist. In den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Milz findet die Antigenerkennung und Aktivierung der B-Lymphozyten statt, die sich daraufhin zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder antigenspezifischen Memory-B-Zellen entwickeln. [2,3]

Die spezifische Antigenbindung erfolgt über membranständige Immunglobuline (Ig) auf der Oberfläche der B-Zellen. Dieses Ig bildet zusammen mit den Untereinheiten CD79 $\alpha$  und CD79 $\beta$  den sogenannten B-Zell-Rezeptor (BCR). Jeder B-Lymphozyt produziert und präsentiert dabei Immunglobuline einer einzigen Spezifität. Antikörper sind Y-förmig und bestehen aus einer variablen, antigenbindenden Region, die für jeden Antikörperklon einzigartig ist (V-Region) und einer konstanten Region, die nicht für die Antigenerkennung zuständig ist. Die konstante Region kann in fünf Hauptformen unterteilt werden, die jeweils eine andere Effektorfunktion besitzen (C-Region). Der früheste nach Antigenkontakt produzierte Antikörper ist IgM. Im Verlauf der Immunreaktion kommt es häufig zu einem Klassenwechsel, wie z.B. zu IgG, die Antikörperspezifität bleibt dabei jedoch erhalten.

Im Falle des BCR ist die C-Region des Antikörpers in der Membran der Zelle eingebaut, die V-Region erkennt und bindet das passende Antigen direkt und vermittelt ein Signal zur Aktivierung, klonalen Vermehrung und Ausdifferenzierung des B-Lymphozyten zur antikörperproduzierenden Plasmazelle.

Durch Mechanismen wie genetische Neugruppierung während der B-Zell-Entwicklung und Immunglobulinklassenwechsel sowie somatische Hypermutation im Zuge der Ausdifferenzierung ist die Antikörpervielfalt beinahe unbegrenzt. Jeder Mensch kann etwa  $10^{11}$  verschiedene Antikörper bilden. Zu ihren Funktionen zählen neben der Abwehr von Viren und Bakterien auch die Neutralisierung von Toxinen, die Erleichterung der Phagozytose eines Erregers und die Aktivierung der Komplementkaskade durch Komplexbildung mit dem Antigen.

Die meisten B-Lymphozytenreaktionen sind T-Zell-abhängig, einige wenige T-Zell-unabhängige Antigene wie Lipopolysaccharide können ohne zusätzliche Interaktion

mit T-Lymphozyten unreife B-Lymphozyten stimulieren. Für die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion phagozytieren B-Lymphozyten gebundenes Antigen und präsentieren Bruchteile davon über MHC-II-Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Auch verschiedene Corezeptoren wie CD40 spielen bei dieser Form der B-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle. [2–5]

Neben der Produktion von Antikörpern und der Antigenpräsentation beeinflussen B-Lymphozyten das Immunsystem durch Ausschüttung von Zytokinen. Anhand ihres Zytokinmusters sowie verschiedener Oberflächenmarker (z.B. IgM, CD27, ...) können Subtypen der B-Lymphozyten ermittelt werden. So produzieren beispielsweise regulatorische B-Zellen das entzündungshemmende Interleukin-10 [6]. B-Gedächtniszellen persistieren nach Antigenkontakt und ermöglichen bei erneuter Exposition eine rapide Immunantwort durch rasche Vermehrung und Ausdifferenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. [4]

### 1.1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten dienen der zellvermittelten adaptiven Immunantwort. Sie werden dabei in zwei Hauptklassen unterschiedlicher Funktion eingeteilt, die sich durch Zelloberflächenproteine unterscheiden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die infizierte Zellen direkt erkennen und abtöten, CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden nach ihrer Aktivierung zu T-Effektorzellen, die vor allem der Aktivierung von naiven B-Zellen und Makrophagen dienen. [3]

T-Lymphozyten erkennen Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR). Die TCR ähneln in Aufbau, Entstehung und Funktion dem BCR. Ein wesentlicher Unterschied ist jedoch, dass der TCR keine ganzen Antigene direkt bindet, sondern von anderen Zellen präsentierte Antigenfragmente erkennt.

Diese Proteinfragmente sind an sogenannte MHC-Moleküle auf Zelloberflächen gebunden. Bei MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) handelt es sich um polymorphe Glykoproteine, die in der Lage sind, eine Vielzahl kleiner Peptide zu binden.

T-Lymphozyten erkennen mit ihrem TCR Teile des MHC-Moleküls und des präsentierten Peptidantigens, wobei jeder TCR spezifisch für die Kombination aus einem bestimmten Peptidantigen und einem bestimmten MHC-Molekül ist (MHC-

Restriktion).

MHC-Moleküle werden in zwei Klassen mit struktureller Ähnlichkeit, aber unterschiedlicher Expression in verschiedenen Geweben, eingeteilt. MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide, die im Zytosol der Zelle synthetisiert werden, MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide aus intrazellulären Vesikeln – in der Regel Fragmente phagozytierter Pathogene.

Neben dem TCR spielen die T-Zell-Oberflächenproteine CD4 und CD8 eine wichtige Rolle für die Initiierung der T-Lymphozytenantwort. Sie dienen als Corezeptoren. Die CD8-Moleküle zytotoxischer T-Zellen binden hauptsächlich an MHC-I-Moleküle und erkennen so z.B. in einer Körperzelle gebildete Virusproteine. Die CD4-Moleküle der T-Effektorzellen hingegen binden bevorzugt an MHC-II und erkennen so von Phagozyten präsentierte Antigenfragmente. Dies macht verständlich, dass MHC-I Moleküle von allen Körperzellen exprimiert werden, MHC-II jedoch nur von anderen Effektorzellen des Immunsystems wie dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen, die über diese Interaktion aktiviert werden. [7] [8] [3]

## 1.2 Interleukin-3

Die erste namentliche Erwähnung von Interleukin-3 findet sich in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1981. J.N. Ihle et al. konnten einen Faktor nachweisen, der in der Lage war, 20 alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, ein T-Zell-Marker, in Milzlymphozyten von Mäusen, denen der Thymus fehlte, zu induzieren. Da dieser Faktor keinem bislang bekannten Interleukin entsprach, in seiner Funktion aber eng in Verbindung zu T-Lymphozyten stand und einige Charakteristika anderer Interleukine zeigte, nannten sie den Faktor Interleukin-3. [9]

Interleukin-3 wurde in der Vergangenheit unter vielen Namen erforscht und beschrieben, wobei multi-CSF wohl das bekannteste Synonym für IL-3 ist. [10], [11]

### 1.2.1 Struktur von Interleukin-3

Das kodierende Gen für IL-3 konnte auf dem langen Arm des menschlichen Chromosom 5 gefunden werden (5q23-31) [12]. Bei der Maus findet sich das entsprechende Gen auf Chromosom 11 [11]. Humanes Interleukin-3 ist wie GM-CSF und IL-5 ein hämatopoetisches Zytokin aus der Familie der 4-alpha-Helix-Zytokine. Das reife Protein besteht aus 133 Aminosäuren [13,14]. Die Primärstruktur von

murinem und humanem IL-3 ist nur zu 29% homolog [11]. So ist humanes IL-3 nicht in der Lage die Zielzellen von murinem IL-3 zu stimulieren und umgekehrt [15].

IL-3 ähnelt in seiner Struktur IL-5 und GM-CSF. Der strukturelle Kern des IL-3 wird von vier  $\alpha$ -Helices (A-D) gebildet, die im 30-40° Winkel zueinander stehen. Helix A und B sind gegenläufig zu Helix C und D angeordnet. Zwei lange Schleifen verbinden Helix A mit Helix B und Helix C mit Helix D. Komplettiert wird die Sekundärstruktur durch eine Typ II Schleife, die Helix B mit Helix C verbindet. Die Verbindungsschleife zwischen Helix A und Helix B enthält eine weitere kleine Helix A'. Dieses Strukturelement unterscheidet IL-3 von IL-5 und GM-CSF. [16,17]

### 1.2.2 Wirkung von Interleukin-3

Die Effekte von IL-3 können vereinfacht in zwei große Gruppen unterteilt werden. Zum einen wirkt IL-3 proliferationsfördernd auf verschiedene Zellen, zum anderen spielt es eine wichtige Rolle bei der Inflammation.

Wie sein Synonym Multi-CSF bereits vermuten lässt, stimuliert IL-3 die Proliferation und Differenzierung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen [18–20]. Darüber hinaus verfügt IL-3 über die Fähigkeit, Wachstum und Differenzierung reifer Blutzellen, wie beispielsweise Lymphozyten, Makrophagen und eosinophiler oder neutrophiler Granulozyten, zu beeinflussen. [21]

Die verwandten Zytokine GM-CSF und IL-5 scheinen ihre Wirkung auf die Hämatopoese besonders in Stresssituationen, wie beispielsweise Infektionen, zu entfalten. Im Ruhezustand dagegen spielen sie vermutlich nur eine untergeordnete Rolle [22].

#### 1.2.2.1 *Wirkung auf T- und B-Lymphozyten*

Lymphozyten sind die Hauptmediatoren der adaptiven Immunantwort.

Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin-3 auf aktivierte B-Lymphozyten als Wachstumsfaktor wirkt. Hierfür wurden B-Zellen aus humanen Tonsillen mit *Staphylococcus aureus* aktiviert und anschließend in einer Kultur mit Interleukin-3 versetzt. Die Zugabe von IL-3 steigerte die Proliferation der aktivierten B-Lymphozyten merklich. Auf inaktive B-Zellen hingegen konnte keine stimulierende Wirkung beobachtet werden. Die optimale Dosis von Interleukin-3 betrug dabei 50-100 U/ml. Die Kinetik der IL-3-abhängigen B-Zell-Stimulation gab Hinweise darauf, dass

Interleukin-3 am zweiten oder dritten Tag nach Aktivierung die stärkste B-Zell-Antwort hervorrief [23]. In Anwesenheit von IL-2 steigert IL-3 die IgG-Sekretion aktivierter B-Zellen [24].

Bei bestrahlten Mäusen konnte eine Therapie mit IL-3 nach Ende der Radiatio die Vermehrung und Ausdifferenzierung von Thymozyten und damit eine beschleunigte Erholung der T- und B-Zellfunktion bewirken. [25]

Durch Inkubation von Leukozyten aus peripherem Blut (PBLs) mit IL-3 konnte in vitro eine temperaturabhängige Stimulation der Lymphozytenmigration erzielt werden [26]. Auf Endothelzellen induziert IL-3 die dauerhafte Expression von P-Selektin an ihrer Oberfläche. P-Selektin vermittelt das Rollen und die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und ist damit essentiell für die Migration der Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe. [27]

Auf humane und murine CD4<sup>+</sup> Lymphom Klone kann IL-3 als Wachstumsfaktor wirken [28–30].

#### *1.2.2.2 Wirkung auf Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen*

Monozyten und Makrophagen gehören als Teil des mononukleären Phagozytosesystems zu den phylogenetisch ältesten Vermittlern des angeborenen Immunsystems und kommen in fast allen Geweben vor. Makrophagen entsprechen gereiften Monozyten, die aus dem Blut ins Gewebe eingewandert sind und sich dort differenziert haben. Durch die Ausschüttung von Signalproteinen, beispielsweise Zytokine, aktivieren sie andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und unterhalten die entzündliche Aktivität vor Ort. [3]

Makrophagen erkennen Erreger anhand bestimmter Oberflächenstrukturen, phagozytieren sie und präsentieren anschließend Fragmente der Erreger auf ihrer Zelloberfläche. Da Makrophagen damit zur T-Zell-Aktivierung beitragen, nehmen sie neben dem angeborenen Immunsystem somit auch Einfluss auf das erworbene Immunsystem. Nach ihrer Aktivierung können sie verschiedene morphologische Formen annehmen und werden, je nach Gewebe in dem sie sich niederlassen, verschieden bezeichnet. So sind die Makrophagen des ZNS besser als Mikroglia, die der Leber als Kupferzellen bekannt. [1]

Dendritische Zellen sind potente antigenpräsentierende Zellen. Als Teil des angeborenen Immunsystems stimulieren sie über die Ausschüttung von Botenstoffen und direkte Zell-Zell-Kontakte naive T-Zellen und stellen so eine wichtige Brücke zwischen beiden Systemen dar. [3,31]

Eine Stimulation von Monozyten mit IL-3 in Kombination mit IL-4 oder IFN $\beta$  fördert die Ausdifferenzierung zu Dendritischen Zellen. Die so generierten DCs sind trotz verminderter IL-12-Sekretion durch Stimulation von CD8<sup>+</sup> TH2-Zellen in der Lage, eine antigenspezifische T-Zell-Antwort zu induzieren. [31–33]

Interleukin-3 wirkt aktivierend auf Makrophagen durch Induktion wichtiger Funktionen für die Antigenpräsentation [34]. Ferner wirkt IL-3 synergistisch auf die durch LPS stimulierte IL-1-Ausschüttung der Makrophagen. [35]

#### *1.2.2.3 Wirkung auf Basophile und Mastzellen*

Basophile Granulozyten und Makrophagen haben sowohl funktionell als auch strukturell viele Gemeinsamkeiten. Beide besitzen Rezeptoren für IgE und in ihren zytoplasmatischen Granula findet sich eine ähnliche Kombination an Entzündungsmediatoren. Im Gegensatz zu den zirkulierenden Basophilen finden sich Mastzellen nur in peripherem Gewebe.

Mastzellen sind Hauptvermittler allergischer Reaktionen, ihre Aktivierung führt zur Ausschüttung von Histamin. Neben Mastzellen spielen auch basophile Granulozyten eine wichtige Rolle bei Hypersensitivitätsreaktionen. Die physiologische Aufgabe der Basophilen besteht in erster Linie in der Abwehr von Parasiten. [1]

Murine und humane Basophile werden bei Stimulation mit IL-3 zur Ausschüttung von IL-4 und IL-13 angeregt und ihre stimulusabhängige Histaminfreisetzung verstärkt [36–40]. In Anwesenheit von IL-3 präsentieren Basophile phagozytierte Antigenfragmente über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche [41]. Darüber hinaus trägt Interleukin-3 zur Vermehrung und Differenzierung von Basophilen und Mastzellen bei parasitären Infektionen bei.

Werden IL-3-Knockoutmäuse mit dem Nematoden *Strongyloides venezuelensis* infiziert, sind sie nicht in der Lage, ihre Basophilenzahl zu steigern. Die basale Hämatopoese und somit Basophilenzahl zeigt sich jedoch nicht beeinträchtigt [42–44].

Darüber hinaus hemmt IL-3 in vitro die Apoptose von Basophilen [45], in vivo konnte dieser Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden [46].

In vivo zeigte sich nach täglichen Injektionen von IL-3-Komplex (IL-3 + anti-IL-3) über drei Tage eine spezifische Steigerung der Ausdifferenzierung muriner myeloider Vorläuferzellen zu Basophilenvorläufern. Infolge dessen konnte in Knochenmark, Milz und Blut eine deutliche Steigerung der Basophilenzahl nachgewiesen werden. [47]

### 1.2.3 Produzenten von Interleukin-3

Die Hauptproduzenten von Interleukin-3 stellen aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dar [10,46,48,49].

Aber auch murine Mastzellen, die über den Fcε-Rezeptor aktiviert werden, können IL-3 sezernieren und weisen erhöhte Level von IL-3-mRNA nach [50,51]. Humane Mastzellen können in vitro, nach ihrer Aktivierung durch Quervernetzung des IgE-Rezeptors, ebenfalls IL-3 bilden. [52,53]

Humane Basophile, die mittels goat anti-human IgE aktiviert wurden, sind ebenfalls in der Lage, Interleukin-3 zu produzieren [54].

## 1.3 Interleukin-3 Rezeptor

Die humanen Rezeptoren für Interleukin-3, IL-5 und GM-CSF gehören zu einer gemeinsamen Rezeptorfamilie, die aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen.

### 1.3.1 Struktur des Interleukin-3 Rezeptor

Die α-Untereinheit des IL-3-Rezeptors (IL-3Rα) ist für die Zytokinerkennung zuständig, während die β-Untereinheit (β<sub>c</sub>) allen drei Rezeptoren gemeinsam ist und die Signaltransduktion vermittelt [55]. Die α-Untereinheit des IL-3Rα ist ein Glykoprotein mit 360 Aminosäuren, von denen sich 53 intrazellulär und 287 extrazellulär befinden. Interleukin-3 bindet mit geringer Affinität (120nM) an die α-Untereinheit des Rezeptors. Durch die Heterodimerisation mit β<sub>c</sub> wird die Affinität des Zytokins zum Rezeptor deutlich gesteigert (140pM) und Signalkaskaden initiiert. Bindet Interleukin-3 an seinen Rezeptor, wird neben anderen JAK-Kinasen insbesondere JAK2 aktiviert. Die Tyrosinkinase JAK2 phosphoryliert 6 Tyrosinreste der β-Rezeptoruntereinheit, die gemeinsam eine Bindungsstelle für Botenstoffe darstellen. Darüber hinaus führt die

Phosphorylierung zur Aktivierung einiger wichtiger Signalwege wie STAT, MAPK und PI3K, die Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle vermitteln. [56]

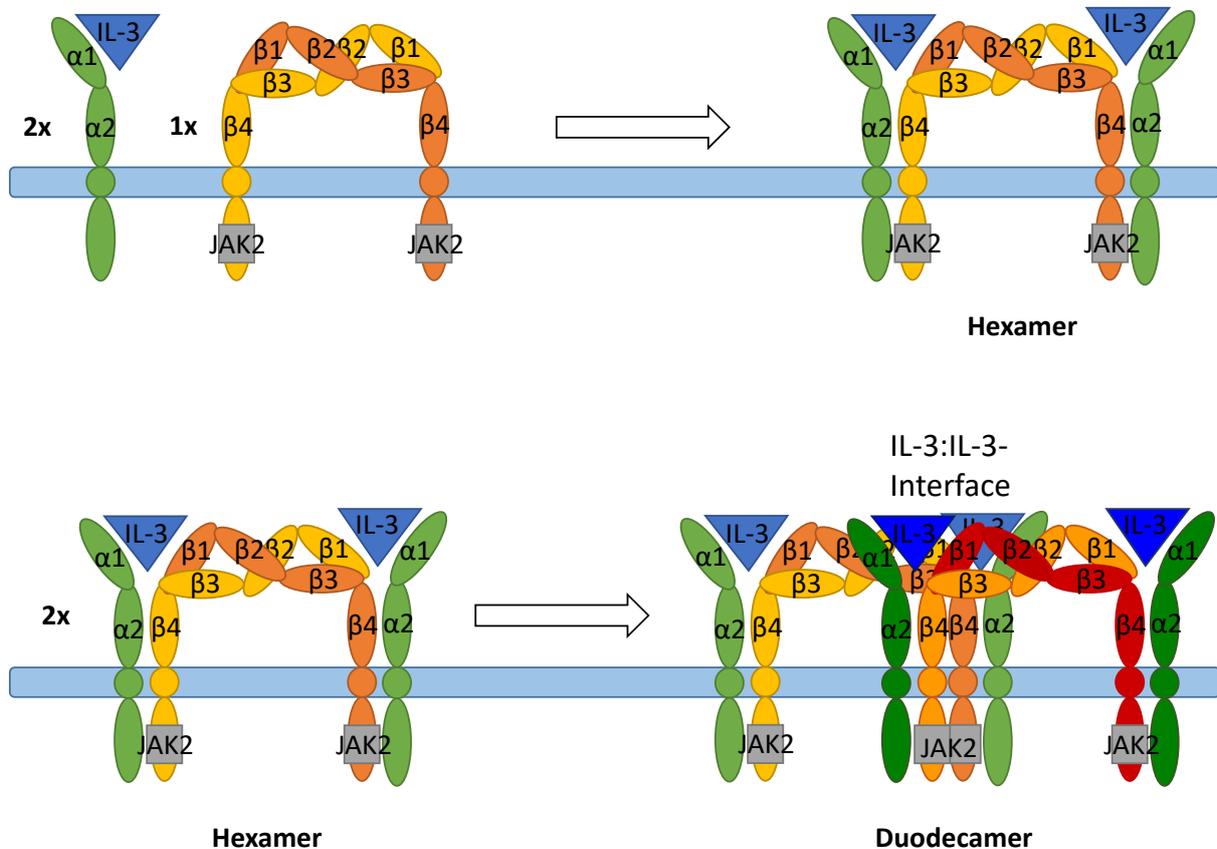
Bei Mäusen existieren neben der IL-3-spezifischen  $\alpha$ -Untereinheit zwei verwandte Gene, die die  $\beta$ -Einheit des IL-3-Rezeptors kodieren: AIC2A und AIC2B. AIC2B kodiert eine gemeinsame Untereinheit für die murinen GM-CSF, IL-3- und IL-5-Rezeptoren, homolog zum menschlichen  $\beta_c$ . AIC2A kodiert  $\beta_{IL-3}$ , eine Untereinheit, die für IL-3 spezifisch ist und IL-3 direkt mit niedriger Affinität bindet. Beide  $\beta$ -Isoformen benötigen mIL-3R $\alpha$  für ihre Aktivierung. In Gegenwart des murinen IL-3R $\alpha$  bildet  $\beta_{IL-3}$  mit dem murinen  $\beta_c$  einen Rezeptorkomplex mit hoher Affinität zu IL-3. [55,57–60]

Für die Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor spielen mehrere Aminosäurereste des hIL-3 eine wichtige Rolle, darunter Glu<sup>22</sup>. Mutationsexperimente zeigten, dass einige Aminosäurereste der A-Helix, der A-B-Schleife und der D-Helix mit IL-3R $\alpha$  interagieren. Die Aminosäurereste von Asp<sup>21</sup>, Gly<sup>42</sup>, Glu<sup>43</sup>, Gln<sup>45</sup>, Asp<sup>46</sup>, Met<sup>49</sup>, Arg<sup>94</sup>, Pro<sup>96</sup>, Phe<sup>113</sup> und Lys<sup>116</sup> bilden gemeinsam eine Bindungsstelle für IL-3R $\alpha$ . Darüber hinaus scheinen Ser<sup>17</sup>, Asn<sup>18</sup>, Thr<sup>25</sup>, Arg<sup>108</sup> und Glu<sup>119</sup> die Bindungsfähigkeit von IL-3 zu beeinflussen, ohne selbst direkt Teil der Bindungsstelle zu sein [17,61,62]. Glu<sup>22</sup> der A-Helix vermittelt die Bindung an die  $\beta_c$  Einheit des IL-3R. Ein Austausch der Aminosäure führte zu deutlich verringerter Bindung an die entsprechende Rezeptorkomponente. Dabei konnte, trotz ausführlicher Mutationsanalysen, außer Glu<sup>22</sup> kein Aminosäurerest bestimmt werden, der für die Interaktion mit  $\beta_c$  maßgeblich ist [17].

Die Bindungsstelle zwischen IL-3 und IL-3R $\alpha$  wird als Bindungsstelle I, die zwischen IL-3 und  $\beta_c$  als Bindungsstelle II und die zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit als Bindungsstelle III bezeichnet. [63]

Die bisherigen Erkenntnisse über die Struktur des IL-3R lassen vermuten, dass die Bildung eines binären Komplexes aus IL-3R $\alpha$  (Bindungsstelle I) zur anschließenden Formation eines tertiären Komplexes, durch Bindung von  $\beta_c$  über die Bindungsstellen II und III führt. Da jeweils zwei  $\beta_c$  miteinander verflochten ein stabiles Dimer bilden, entsteht statt des eben beschriebenen tertiären Komplexes ein Hexamer im Verhältnis 2IL-3:2IL-3R $\alpha$ :2 $\beta_c$ . Zwei so entstandene Hexamere können sich über Bindungsstellen IV und V zu einem Duodekamer vereinigen. Durch die Bildung dieses höheren

Komplexes wird die Signalwirkung von IL-3 optimiert und trotz der geringen Anzahl an Rezeptoren pro Zelle eine effektive Signalantwort gewährleistet [64–66].



**Abbildung 1 Aktivierung des IL-3-Rezeptor-Komplex**

In Anwesenheit von IL-3 verbinden sich die Rezeptoruntereinheiten mit IL-3 zu einem Duodekamer. Dieses wird durch die IL-3:IL-3-Interaktion weiter stabilisiert. Die Transphosphorylierung gebundener JAK2-Kinase führt zu einer starken Signalaktivierung. Modifiziert nach [63] [66]

### 1.3.2 Struktur der α-Untereinheit des Interleukin-3 Rezeptor

Die α-Untereinheit des IL-3-Rezeptors ist auch als CD123 bekannt [67]. Beim Menschen finden sich die Gene, die hIL-3Rα und hGM-CSFRα kodieren, an benachbarten pseudoautosomalen Regionen des X- und Y-Chromosoms, während das Gen für hIL5Rα auf Chromosom 3 zu finden ist. Im Gegensatz dazu sind die murinen Gene der Alpha-Untereinheiten der drei verwandten Rezeptoren auf verschiedenen Chromosomen zu finden. Das mIL-3Rα-Gen konnte auf Chromosom 14 lokalisiert werden. [68,69]

Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus existieren zwei natürlich vorkommende Varianten des IL-3Rα, SP1 und SP2. SP1 entspricht dem länger bekannten Wildtyp des Rezeptors [55]. SP2 fehlt die Ig-förmige N-terminale Rezeptordomäne 1, ist aber

ansonsten in seiner Sequenz identisch mit SP1. Beide Isoformen vermitteln in Gegenwart der  $\beta$ -Untereinheit ein Signal zum Wachstum der Zelle.

Die murinen Isoformen SP1 und SP2 bewirken über unterschiedliche Mechanismen eine Aktivierung des Komplexes mit  $m\beta_{IL-3}$ . Bei SP2 sind die Aminosäuren der IL-3-Bindungsstelle von  $\beta_{IL-3}$  essentiell für die Rezeptoraktivierung und Bindung von IL-3 mit hoher Affinität. Für die Rezeptoraktivierung über SP1 dagegen spielt diese Bindungsstelle keine Rolle. MIL-3R $\alpha$  SP2 scheint darüber hinaus nur mit  $m\beta_{IL-3}$ , nicht aber mit  $m\beta_c$  zu interagieren. [70]

Beim Menschen sind beide Isoformen des IL-3R $\alpha$  in der Lage, eine Interaktion mit  $h\beta_c$  einzugehen. Es gibt Hinweise darauf, dass SP1 und SP2 in ihrer Förderung des Zellwachstums gleichsinnig, auf andere Zellfunktionen jedoch unterschiedlich wirken [70].

Obwohl der IL-3-Rezeptor eng mit dem IL-5-Rezeptor verwandt ist, führt eine Deletion der entsprechenden Rezeptordomäne des IL5R $\alpha$  zu einem vollständigen Verlust der hochaffinen Bindungsfähigkeit. Interleukin-5 interagiert stark mit der NTD (N-terminale Domäne) der  $\alpha$ -Untereinheit seines Rezeptors. IL-3 dagegen zeigt nur sehr geringe Interaktionen mit der IL-3R $\alpha$  NTD. Dies erklärt, warum sich bei Deletion dieser Rezeptordomäne bei IL5R $\alpha$  ein vollständiger Funktionsverlust, bei IL-3R $\alpha$  lediglich eine geringfügige Reduktion der Rezeptoraktivität beobachten lässt. [56]

Die Bindung von Interleukin-3 an die  $\alpha$ -Domäne seines Rezeptors wurde mit verschiedenen Ansätzen untersucht. Dabei konnten durch Homologiemodelle, Mutagenesestudien und die Entwicklung von Rezeptorantikörpern ein grundlegendes Verständnis der Interleukin-Rezeptorinteraktion gewonnen werden. Ein bekanntes Homologiemodell des IL-3R stützt sich auf den verwandten CSF-Rezeptor und IL13R $\alpha$ . Anhand dessen konnten zwei verschiedene Formen der Interaktion zwischen IL-3 (Helix A A' und D) und IL-3R $\alpha$  (Domänen 1 und 2) identifiziert werden. Zwischen der A-Helix des IL-3 und der Domäne 2 am IL-3R $\alpha$  wird über elektrostatische Anziehungskräfte die Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor vermittelt. Zusätzlich wirken zwischen der Domäne I des IL-3R $\alpha$  und einigen Aminosäureresten an IL-3 hydrophobe van der Waals Kräfte. Diese Erkenntnisse bestätigen die Ergebnisse vorhergehender Mutageneseanalysen. So waren in beiden Modellen

Ser<sup>17</sup>, Asn<sup>18</sup>, Arg<sup>108</sup>, Phe<sup>113</sup>, Lys<sup>116</sup> und Glu<sup>119</sup> wichtig für die Zytokin-Rezeptor-Interaktion. [17,63]

Die Analyse der Kristallstruktur von IL-3R $\alpha$  und dem für die Leukämiebehandlung entwickelten blockierenden Antikörper ASL362 erbrachte weitere Erkenntnisse über den IL-3-Rezeptor. So kann die NTD des IL-3R $\alpha$  neben der „geschlossenen“ Konformation, die bereits von den verwandten GM-CSF und IL-5-Rezeptoren bekannt ist, eine bisher einzigartige „offene“ Konformation annehmen. Die geschlossene Konformation des IL-3R $\alpha$ :IL-3-Komplex weist große Ähnlichkeit mit dem IL5R $\alpha$ :IL-5-Komplex auf. Die  $\alpha$ -Untereinheit umschließt das jeweilige Zytokin und erinnert dabei in seiner Form an einen Schraubenschlüssel. Die Existenz einer zusätzlichen offenen Konformation spricht für eine hohe Flexibilität der NTD des IL-3R $\alpha$ . [66,71]

### 1.3.3 Struktur der humanen $\beta_c$ Untereinheit

Neben der jeweiligen ligandspezifischen  $\alpha$ -Untereinheit, die für die Rezeptoraktivierung zuständig ist, besitzen die Rezeptoren für IL-3, IL-5 und GM-CSF eine gemeinsame  $\beta_c$ -Untereinheit. Diese  $\beta_c$  Untereinheit weist eine im Vergleich zu den jeweiligen  $\alpha$ -Untereinheiten ausgeprägte intrazelluläre Komponente auf. [65]

Die extrazelluläre Komponente der gemeinsamen  $\beta$ -Untereinheit liegt als Dimer zwei fest miteinander verschlungener gegenläufiger Ketten A und B vor. Jede Kette besteht aus vier Fibronectin Typ III Domänen. Die Domänen A4 und B4 sind der Zellmembran am nächsten. Die Domänen 2 und 4 bestehen aus je zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit drei (A, B, E) bzw. vier (G, F, C, D) Einzelsträngen. Domänen 1 und 3 weisen dieselbe Grundstruktur auf, ihr Strang D ist jedoch verlängert und damit Bestandteil beider  $\beta$ -Faltblätter. Strang G der Domänen 1 und 3 ist ebenfalls verlängert und zudem gegenläufig zum entsprechenden Strang G der Domänen 2 und 4. Strang G der Domäne 1 eines  $\beta_c$  Monomers (A) zeigt von seiner Domäne weg und bildet Strang G der Domäne 3 des anderen  $\beta_c$  Monomers (B). Gleiches gilt für Strang G der Domäne 3 des einen (A) und Strang G der Domäne 1 des anderen (B) Partners. Während der Großteil von  $\beta_c$  Faltblattstruktur aufweist, finden sich einige kurze helikale Wendungen. Eine solche Wendung am C-terminalen Ende der erweiterten G-Stränge an Domänen 1 und 3 führt zum rechtwinkligen Abknicken der Peptidkette an dieser Stelle. Im Gegensatz zu Domänen 2 und 4, die über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert

sind, weist Domäne 1 6 Cysteinreste auf, die drei Disulfidbrücken bilden. Domäne 3 verfügt über vier Cysteinreste und damit zwei Disulfidbrücken. [72]

Die  $\beta_c$  Einheit ist alleine nicht in der Lage, mit IL-3 eine Bindung einzugehen. In Anwesenheit von IL-3R $\alpha$  jedoch entstehen Komplexe aus IL-3:IL-3R $\alpha$ : $\beta_c$  mit enger topographischer Beziehung zwischen Ligand und  $\beta_c$  Untereinheit. Die beiden  $\beta_c$  Domänen A1/B4 bzw. A4/B1, die am nächsten an der Zellmembran liegen, nehmen eine L-Form an. Analog zum Wachstumshormonrezeptor stellt die sogenannte Ellenbogenregion zwischen Domäne 1 (Verbindungsschleifen AB und EF) und Domäne 4 (Schleifen BC und FG) der Dimerpartner eine potentielle Bindungsstelle für den Liganden dar [72,73]. An dieser Bindungsstelle II tritt  $\beta_c$  mit Helix A und C des IL-3 in Kontakt. [63] Mutagenesestudien konnten die Bedeutung der Domänen 1 und 4 bestätigen. Ein Austausch der Aminosäuren Tyr<sup>15</sup> und Phe<sup>79</sup> der  $\beta_c$  Domäne 1 (AB Schleife bzw. EF Schleife) gegen Alanin führt zum Verlust der hochaffinen Bindungsfähigkeit [74]. Der gleiche Effekt kann durch Austausch der Aminosäure Tyr<sup>421</sup> der Domäne 4 (FG Schleife) gegen Alanin erzielt werden [75]. Die Positionierung der Bindungspartner zueinander lässt vermuten, dass Glu<sup>22</sup> des IL-3 eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr<sup>421</sup> der Domäne 4 des  $\beta_c$  eingeht. [63]

An Bindungsstelle III treten ILR3 $\alpha$  und  $\beta_c$  in Kontakt. Sie wird gebildet von Domäne 3 des ILR3 $\alpha$  und Domäne 4 der  $\beta_c$ -Untereinheit. [56] Die  $\beta_c$ -Untereinheit bildet mit IL-3R $\alpha$  und IL-3 ein Hexamer im Verhältnis 2:2:2. Zwei Hexamere bilden wiederum miteinander ein Duodekamer.

An Bindungsstelle IV treten zwei Domänen 4 der  $\beta_c$ -Untereinheiten zweier Hexamere in Kontakt, was zur Formation eines Duodekamers aus den beiden Hexameren führt. Die Bildung eines solchen Komplexes höherer Ordnung ist Voraussetzung für die Rezeptoraktivierung. Mutationsversuche und der Einsatz blockierender Antikörper an Bindungsstelle IV ließen die Bindungsaffinität des Liganden an seinen Rezeptor und damit die Bildung von Hexameren unbeeinflusst, verhinderten aber die Aktivierung des Rezeptors. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist der räumliche Abstand der  $\beta_c$ -Untereinheiten, die mit der Kinase JAK2 assoziiert sind. Im ungebundenen Zustand und in der Hexamerform ist der Abstand der JAK-2 mit etwa 120 Å zu groß. Durch die Bildung eines Duodekamers nähern sich die JAK-2 assoziierten  $\beta_c$ -

Untereinheiten auf etwa 10 Å an, was die Transphosphorylierung des Rezeptors und die Aktivierung der Signalkaskade ermöglicht [56,64].

Neben Bindungsstelle IV scheint eine Zytokin-Zytokin-Interaktion eine Rolle für die Ausbildung von Rezeptorduodekameren zu spielen. Die prolinreichen AA'-Schleifen zweier IL-3, die an gegenüberliegende Hexamere gebunden sind, bilden diese Bindungsstelle V. [63,65]

Da die Rezeptoren für GM-CSF, IL-5 und IL-3 eine gemeinsame  $\beta_c$  Untereinheit teilen, konkurrieren die binären Komplexe der drei Liganden und ihrer  $\alpha$ -Rezeptoreinheiten miteinander. Das Ausmaß der gegenseitigen Hemmung variiert abhängig vom Zelltyp und den auf der Zelle exprimierten Rezeptoren. [76–78]

#### 1.3.4 Struktur der murinen IL-3 $\beta$ -Untereinheit

Die Maus besitzt als einzige bisher bekannte Spezies zwei  $\beta$ -Untereinheiten des IL-3-Rezeptors. Beide werden durch Gene auf Chromosom 15 codiert (AIC2A und AIC2B) und sind auf genomischer Ebene zu 95% identisch. Ihre Aminosäuresequenz stimmt zu 91% überein. Dennoch ist nur  $\beta_{IL-3}$  in der Lage, selbst IL-3 zu binden und ist im Gegensatz zu  $\beta_c$  spezifisch für dieses Zytokin. Die großen Übereinstimmungen legen die Vermutung nahe, dass das  $\beta_{IL-3}$  kodierende Gen AIC2A durch Duplikation aus AIC2B entstanden ist. [79]

Die  $\beta_{IL-3}$ -Untereinheit ist in ihrer Struktur weitestgehend homolog zu  $\beta_c$ . Sie formt ebenfalls ein stabiles Dimer zweier miteinander verschlungener Ketten aus je vier Fibronectin Typ III Elementen.

Für die direkte Bindung von IL-3 an  $\beta_{IL-3}$  mit niedriger Affinität scheinen einige Aminosäurereste aus Domäne 1 und Domäne 4 des  $\beta_{IL-3}$  essentiell zu sein. Besonders die Aminosäurereste Tyr<sup>21</sup>, Phe<sup>85</sup> und Asn<sup>87</sup> der Domäne 1, sowie Tyr<sup>348</sup> und Tyr<sup>410</sup> spielen dabei eine Schlüsselrolle. Mit Ausnahme von Asn<sup>87</sup> sind die gleichen Aminosäurereste der homologen  $\beta_c$ -Domänen von großer Bedeutung für die Bindung von IL-3 an  $\beta_c$  mit hoher Affinität.

Überraschenderweise war jedoch keine der an der Bindung von IL-3 an  $\beta_{IL-3}$  mit niedriger Affinität beteiligten Aminosäuren von Bedeutung für die Bindung von IL-3 an  $\beta_{IL-3}$  mit hoher Affinität (in Gegenwart von IL-3R $\alpha$ ). Dies legt nahe, dass der

Mechanismus der Hochaffinitätsbindung von IL-3 sich bei  $\beta_c$  und  $\beta_{IL-3}$  deutlich unterscheidet. [74]

Vergleicht man die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domänen von  $\beta_c$  und  $\beta_{IL-3}$ , finden sich vier Bereiche, in denen sich beide deutlich unterscheiden. Schleife EF der Domäne 1 und Schleife BC der Domäne 4 der  $\beta_{IL-3}$ -Untereinheit, beide in der Ellenbogenregion der  $\beta$ -Untereinheit gelegen, weichen von der ursprünglichen  $\beta_c$ -Untereinheit ab. Vermutlich sind diese Mutationen für einen Großteil der IL-3-Spezifität und direkten Bindungsfähigkeit der  $\beta_{IL-3}$ -Untereinheit verantwortlich. Auch Schleife DE der Domäne 4, die sich unterhalb der BC-Schleife befindet, aber nicht unmittelbar an der IL-3-Bindung beteiligt ist, unterscheidet sich in ihrer Sequenz bei den beiden  $\beta$ -Isoformen. Die vierte abweichende Region findet sich in Domäne 2. Die Bedeutung der Mutation ist bisher unklar. Wird die Schleife BC der Domäne 4 von  $m\beta_{IL-3}$  durch die homologe Sequenz von  $m\beta_c$  ausgetauscht, ist die Fähigkeit von  $\beta_{IL-3}$  auch mit IL-5 einen hochaffinen Komplex zu bilden wiederhergestellt, was die Rolle dieser Sequenz für die IL-3-Restriktion von  $\beta_{IL-3}$  unterstreicht. [80]

#### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Während der letzten Jahrzehnte konnten fundierte Kenntnisse über die Bedeutung von IL-3 und seine Wirkung auf Monozyten, Makrophagen und Basophile Granulozyten gewonnen werden. Als von aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen produzierter Botenstoff stellt es eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar [10].

Aktivierte  $CD4^+$  TH-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Ausdifferenzierung naiver B-Lymphozyten. Die Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen erfolgt dabei nicht nur über direkte Zell-Zell-Interaktionen, sondern auch durch die Ausschüttung von Botenstoffen [2,4,81]. Die von T-Zellen produzierten Zytokine IL-2 [82,83], IL-4 [84], IL-10 [85], IL-21 [86–88] und IFN- $\gamma$  [82] spielen Schlüsselrollen in verschiedenen Bereichen der B-Zell Aktivierung und Differenzierung. Während die Effekte dieser Zytokine gut erforscht sind, ist bisher wenig über die Auswirkung von IL-3 auf B-Lymphozyten und die Regulation des IL-3R auf B-Zellen bekannt.

Diese Arbeit untersucht die Auswirkung von IL-3 auf Wachstum, Proliferation und Zytokinexpression naiver B-Lymphozyten, ihre Überlebensdauer in Kultur sowie die

Expression von Aktivierungsmarkern auf den B-Lymphozyten, ebenfalls unter Einfluss verschiedener Stimulanzen. Zudem wird die Regulation des IL-3R (CD123) über Aktivierung verschiedener B-Zell-Stimulationswege untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Laborgeräte und Labormaterialien

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Brutschränke BBD 6220</b>	Thermo Scientific, Heidelberg
<b>Durchflusszytometer FACSCanto II</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Durchlichtmikroskop Axiovert 25</b>	Zeiss, Jena
<b>Eppendorf-Cup-Rüttler Thermomixer</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Infinite M200 PRO multimode microplate reader</b>	Tecan, Mannedorf (Schweiz)
<b>Kryobox</b>	Nalgene, Rochester (USA)
<b>Magnet QuadroMACS Separator Multistand</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>Pipetten (P10, P20, P100, P200, P1000)</b>	Gilson, Bad Camberg
<b>Pipetten (Mehrkanalpipette P25, P100, P200, P300)</b>	Brand, Wertheim
<b>Pipetten (Multipipette plus)</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Pipettierhilfe Pipetboy acu</b>	ISB Integra Biosciences, Chur (Schweiz)
<b>Pipettierhilfe Pipetus Akku</b>	Hirschmann, Eberstadt
<b>Schüttelgerät Heidolph REAX 2000</b>	Heidolph, Schwabach
<b>Schüttelgerät Vortex-Genie 2</b>	Scientific Industries, San Diego (USA)
<b>Sterilbank Jouan MSC 12</b>	Thermo Scientific, Hanau
<b>Vortexzentrifuge Combi-Spin</b>	A. Hartenstein, Würzburg
<b>Wasseraufbereitungsanlage</b>	Millipore, Eschborn
<b>Wasserbad</b>	GFL, München
<b>Zentrifuge Centrifuge 5417 R</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Zentrifuge Megafuge 16 R</b>	Thermo Scientific, Hanau

Tabelle 1 Laborgeräte

### 2.1.2 Glasware und Plastikware

<b>Glasware und Plastikware</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Abdeckfolie für Mikrottestplatten</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Cryo 1°C Freezing Container</b>	Nalgene, Rochester (USA)
<b>ELISA-Platte F96 Maxisorp</b>	Thermo Scientific, Heidelberg
<b>Flüssigkeitsreservoir (55ml)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Kryoröhrchen (1ml)</b>	Nalgene, Rochester (USA)
<b>Neubauer Zell-Zählkammer zur Einmalnutzung</b>	Brand, Wertheim
<b>Neubauer Zell-Zählkammer, wiederverwendbar</b>	Brand, Wertheim
<b>Parafilm</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>Petrischalen (35 x 10mm, 60 x 15mm, 100 x 20mm)</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<b>Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)</b>	Sarstedt, Nürnberg
<b>Pipettenspitzen (300µl)</b>	Brand, Wertheim
<b>Pipettenspitzen mit Filter (100µl, 1000µl)</b>	Biozym, Oldendorf
<b>Pipettieraufsätze für Multipipette plus</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Plate Sealer für Microplates</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Polystyrene Microplates für ELISA</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer 5ml</b>	BD Falcon, Le Pont de Claix (Frankreich)
<b>Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml)</b>	Sarstedt, Nürnberg
<b>Separationssäulen (LS Säule)</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)</b>	Sarstedt, Nürnberg
<b>Zellkulturplatten mit Rundboden 96-well</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<b>Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)</b>	BD Falcon, Pont de Claix (Frankreich)

Tabelle 2 Glasware und Plastikware

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>AccuCheck Counting Beads für Durchflusszytometrie</b>	Invitrogen, Darmstadt
<b>Bovines Serumalbumin (BSA) (Fraktion V)</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>FACSLysing Solution, FACSClean, FACSFlow, FACSRinse</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Ficoll-Paque™ PLUS</b>	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
<b>Horse radish peroxidase gekoppeltes Streptavidin (HRP-Streptavidin)</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase)</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)</b>	BioLegend, Fell
<b>Tris-HCL</b>	Amersham Biosciences, München
<b>Tryptanblaulösung</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>Tween 20</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<b>Wasserstoff-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Merck, Darmstadt

Tabelle 3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien

### 2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

<b>Medium</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Fetales Kälberserum (FCS Gold, ½ h Hitzeinaktiviert, 56°C)</b>	PAA, Colbe
<b>RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
<b>Penicillin</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

<b>Streptomycin</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
<b>L-Glutamin</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

### 2.1.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>B Cell Isolation Kit II human</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>DuoSet ELISA (Human)</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Human IL-6 DuoSet ELISA</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Human IL-10 DuoSet ELISA</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Human IL-13 DuoSet ELISA</b>	R&D Systems, Abington (UK)

Tabelle 5 Kits

### 2.1.6 Zytokine, Stimulanzen, Antikörper und Enzyme

<b>Zytokin/Stimulans/Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Anti-Biotin MicroBeads</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>Anti-CD180 Klon MHR73-11</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti-CD40 Klon 5C3</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti-HA Peptid</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>Anti-human CD3 (Klon OKT3)</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>B-Cell Biotin-Antibody Cocktail, human</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>CD40 Ligand</b>	R&D Systems, Abington (UK)
<b>CD<sup>4</sup> MicroBeads, human</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>Chondroitinsulfat C (CSC)</b>	Sigma Aldrich, Steinheim
<b>ChromPure Mouse IgG für Fc-Block</b>	Jackson Immunoresearch, West Grove (USA)
<b>CPG</b>	TIB Molbiol, Berlin
<b>Goat anti-mouse Fcy</b>	Jackson Immunoresearch, West Grove (USA)
<b>Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM</b>	Jackson Immunoresearch, West Grove (USA)
<b>Interleukin-2</b>	PeproTech, New Jersey (USA)
<b>Interleukin-3</b>	eBioscience, San Diego (USA)

<b>Interleukin-4</b>	PeptoTech, New Jersey (USA)
<b>Interleukin-6</b>	PeptoTech, New Jersey (USA)
<b>Interleukin-10</b>	PeptoTech, New Jersey (USA)
<b>Interleukin-21</b>	PeptoTech, New Jersey (USA)
<b>Pokeweed Mitogen (PWM)</b>	Sigma Aldrich, Steinheim

Tabelle 6 Zytokine, Stimulanzen, Antikörper und Enzyme

## 2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer

### 2.1.7.1 ELISA

<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b>Block- und Verdünnungspuffer</b>	1% BSA in PBS
<b>Coating-Puffer</b>	1x PBS
<b>Entwicklungslösung</b>	TMB Substrate Set (BioLegend, Fell)
<b>Stopplösung</b>	12,5 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure)
<b>Waschpuffer</b>	0,05 Vol.-% Tween 20 in 1x PBS

Tabelle 7 ELISA

### 2.1.7.2 Zellseparation

<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b>10x PBS</b>	10,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 1,8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL in Aqua dest.
<b>MACS Puffer</b>	2 mM EDTA; 0,5 Gew.-% BSA in 1x PBS

Tabelle 8 Zellseparation

### 2.1.7.3 Zellkulturmedien

<b>Medium</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b>Kulturmedium für B- und T-Lymphozyten</b>	500ml RPMI 1640, 10% FCS (50ml)
<b>Einfriermedium für PBMCs</b>	50ml FCS, 20% DMSO (10ml)
<b>Standardmedium</b>	500ml RPMI 1640, 10% FCS (50ml), 5ml Penicillin/Streptomycin, 5ml L-Glutamin

Tabelle 9 Zellkulturmedien

### 2.1.8 Antikörper und Färbungen für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Bezugsquelle
<b>Anti human CD3 PE Klon SP34</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti human CD4 PerCp-Cy5.5 Klon RPA-T4</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti human CD11b APC Klon ICRF44</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti human CD19 eFluor450 Klon HIB19</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti human CD27 APC Klon LG.7F9</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Anti human CD45 AmCyan Klon 2D1</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Anti human CD123 PE-Cy5 Klon 9F5</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Anti human CD138 PE Klon DL-101</b>	eBioscience, San Diego (USA)
<b>Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE FITC A)</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>PE-Cy™5 Mouse IgG1κ Isotype Control Klon MOPC-21</b>	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 10 Antikörper und Färbungen für die Durchflusszytometrie

### 2.1.9 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

Programm	Bezugsquelle
<b>CellQuestPro 3.1</b>	BD Bioscience, Heidelberg
<b>Facs Diva v6.1.3</b>	BD Bioscience, Heidelberg
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft, Redmond (USA)
<b>SoftMax 2.31</b>	MDS Analytical Technologies, Sunnyvale (USA)

Tabelle 11 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

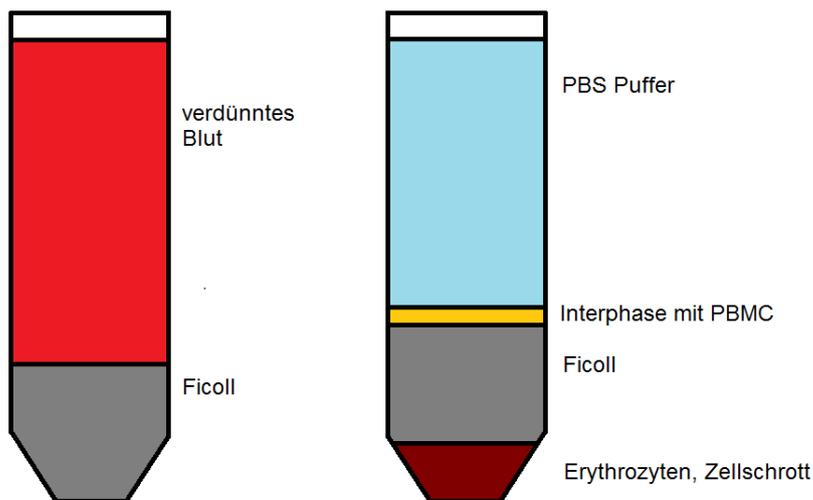
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von PBMC aus Vollblut

Unter mononukleären Zellen des peripheren Blutes werden Zellen mit einzelner, rundem Zellkern, wie beispielsweise Lymphozyten oder Monozyten verstanden. [1]

Das Blut, das für die PBMC-Gewinnung verwendet wird, wird zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend werden 15 ml Ficoll bei Raumtemperatur in einen 50ml Falcon gegeben und langsam mit 30ml verdünntem Blut überschichtet.

Die Falcons werden bei 1500 rpm für 20 Minuten bei 4°C ohne Abbremsen abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes kann die Interphase, bestehend aus mononukleären Zellen, abgenommen und in einen frischen Falcon überführt werden. Die so gewonnenen PBMCs werden anschließend zweimal unter Zugabe von MACS-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschvorgang die Zellen bei 1200rpm für 10 Minuten erneut abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend das Zellpellet in frischem MACS-Puffer resuspendiert werden.



**Abbildung 2 Aufreinigung von PBMC aus Vollblut**

Links Darstellung vor Zentrifugation, Rechts Darstellung nach Zentrifugation. Durch die unterschiedliche Dichte der Zelltypen sammeln sich bei der Zentrifugation abgestorbene Zellen, Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Falcons an, während die PBMCs eine kompakte Schicht zwischen Ficoll und PBS-Puffer bilden. Diese kann im Folgenden problemlos mit einer Pipette abgenommen werden.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahlen

Um die Anzahl lebender Zellen zu bestimmen, werden die Zellen in Suspension gebracht und entsprechend der erwarteten Zellzahl verdünnt. Anschließend werden 10µl dieser Suspension mit 10µl einer 0,1%igen Trypanblaulösung vermischt. Trypanblau färbt tote Zellen mit defekter Membran blau. Lebende Zellen mit intakter Membran werden nicht angefärbt, was eine leichte Differenzierung ermöglicht. Nach dem Färben wird die Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die lebenden Zellen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Zur Ermittlung der Zahl lebender Zellen pro ml der Ausgangssuspension wird die Anzahl der Zellen eines Großquadrats mit dem Kammerfaktor  $10^4$  und den Verdünnungsfaktoren aus Vorverdünnung und Trypanblaufärbung multipliziert.

### 2.2.3 Magnetische Zellseparation

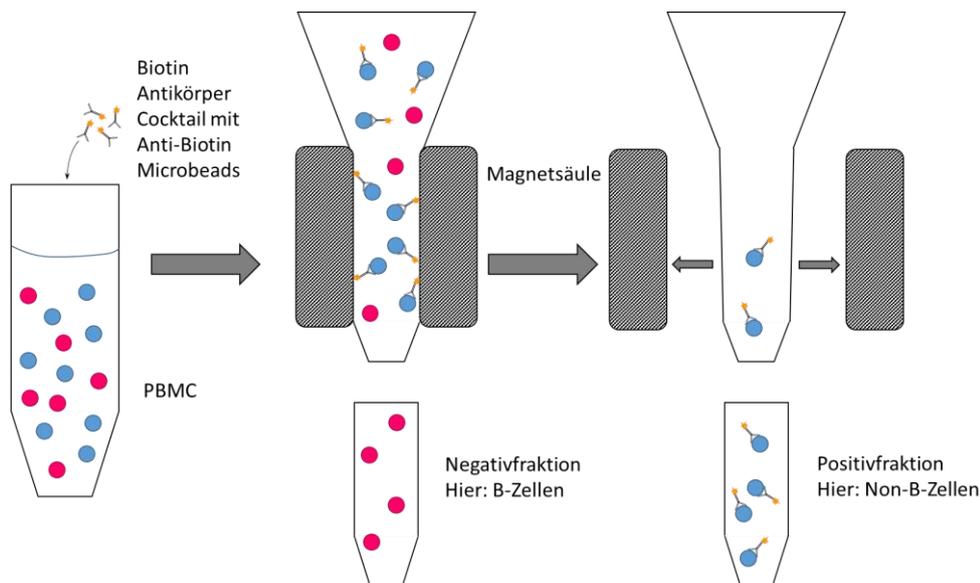
Mithilfe der magnetischen Zellseparation können einzelne Zellpopulationen aus einer gemischten Zellsuspension isoliert werden. Die Zellsuspension wird dafür mit speziellen Antikörpern inkubiert, die an magnetische Mikrobeads gebunden sind. Je nach gewünschter Zellpopulation werden Antikörper verwendet, die Oberflächenmarker dieser Population erkennen. Anschließend wird die Zellsuspension auf Trennsäulen, sogenannte MACS Säulen, pipettiert. Die Matrix dieser Säulen besteht aus magnetischen Kugeln. Werden diese Säulen zur Zellseparation in ein Permanent-Magnetsystem eingesetzt, wird im Inneren der Säule ein Gradient erzeugt. Die an die Antikörper gebundenen magnetischen Mikrobeads und mit ihnen die gewünschte Zellpopulation werden dadurch an die Säulenmatrix gebunden, während die restlichen Zellen die Säule passieren.

Diese Technik ermöglicht zwei Varianten der Zellseparation. Wählt man Antikörper, die Oberflächenmoleküle der gewünschten Zellpopulation erkennen, kann der Durchfluss der Säule verworfen werden. Die Säulen werden anschließend aus dem Magnetfeld entnommen und mehrfach gespült. Die Spülflüssigkeit wird aufgefangen, in ihr befinden sich die gewünschten Zellen. Alternativ können unerwünschte Zellen aus einer Suspension entfernt werden, indem Antikörper gegen diese Zellen gewählt werden. Die gewünschten Zellen bleiben somit ungebunden, passieren die Säule und können mit dem Durchfluss aufgefangen werden.

#### 2.2.3.1 *Aufreinigung von CD19<sup>+</sup> B-Zellen*

Mithilfe des B-Zell-Isolation Kit II von Miltenyi werden aufgereinigte B-Zellen gewonnen. Dazu werden im Vorfeld PBMCs in MACS-Puffer suspendiert. Pro  $10^7$  Zellen wird 40µl MACS-Puffer verwendet. Anschließend werden die Zellen mit Biotin-Antibody-Cocktail (10µl/ $10^7$  Zellen) bei 4°C inkubiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit werden die Zellen mit MACS-Puffer (30µl/ $10^7$  Zellen) und Anti-Biotin MicroBeads (20µl/ $10^7$  Zellen) versetzt und gut durchmischt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank werden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer (2ml/ $10^7$  Zellen) gewaschen. Dazu wird die Suspension bei 1600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Nach den Waschvorgängen werden bis zu  $10^8$  Zellen in je 500µl suspendiert.

Für die Zellseparation wird die LS-Säule ins Magnetfeld eingebracht und mit 3ml MACS-Puffer gewaschen. Die präparierte Zellsuspension wird auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wird danach weitere dreimal mit MACS-Puffer gespült, der Durchfluss ebenfalls aufgefangen. Im Durchfluss befinden sich die aufgereinigten B-Zellen, die abschließend gezählt werden. Ihre Reinheit wird durchflusszytometrisch im MACS-Check überprüft.



**Abbildung 3 schematische Darstellung der magnetischen B-Zellseparation**

Links: Die aus peripherem Blut gewonnenen PBMCs werden mit dem Biotin-Antikörpercocktail und Anti-Biotin Microbeads gemischt.

Mitte: Die Zellen werden auf eine im Magnetfeld befindliche LS-Säule pipettiert, die B-Zellen passieren die Säule ungestört, während die vom Antikörpercocktail gebundenen Zellen an die LS-Säule binden. Der Durchfluss enthält aufgereinigte B-Zellen.

Rechts: Die LS-Säule wird aus dem Magnetfeld entfernt und die zuvor gebundenen Zellen aus der Säule gespült. Der Durchfluss enthält die restlichen PBMCs.

### 2.2.3.2 Aufreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Mittels CD4<sup>+</sup> Beads können aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen gewonnen werden. Die dafür benötigten PBMCs werden analog zur B-Zell Aufreinigung aus Vollblut gewonnen, gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert (80µl/10<sup>7</sup> Zellen). Um die gewünschten T-Zellen magnetisch zu markieren, werden CD4<sup>+</sup> MicroBeads (20µl/10<sup>7</sup> Zellen) hinzugegeben und die Zellsuspension bei 4°C inkubiert. Nach 10 Minuten werden die Zellen durch Zugabe MACS-Puffer (2ml/10<sup>7</sup> Zellen) verdünnt und bei 1600rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgenommen und das Zellpellet in MACS-Puffer (500µl/10<sup>8</sup> Zellen) resuspendiert.

Für die Zellseparation wird die LS-Säule im Magnetfeld mit 3ml MACS-Puffer gewaschen, die vorbereiteten Zellen auf die Säule gegeben und der Durchfluss

verworfen. Anschließend wird die Säule dreimal mit MACS-Puffer gespült, der Durchfluss ebenfalls verworfen, da er keine CD4+ enthält.

Um die an die Säule gebundenen CD4+ Zellen zu gewinnen, werden die LS-Säulen aus dem Magnetfeld entfernt, 5ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit einem Stempel durch die Säule gepresst. Der so gewonnene Durchfluss enthält die aufgereinigten T-Zellen. Die CD4+ werden durchflusszytometrisch auf Reinheit geprüft und ihre Anzahl ermittelt.

#### 2.2.4 MACS-Check

Nach der magnetischen Separation werden die gewonnenen Zellen auf ihre Reinheit überprüft. Dazu werden je etwa 300.000 aufgereinigte Zellen und unaufgereinigte PBMCs für 20min bei 4°C im Dunkeln mit Antikörpern inkubiert.

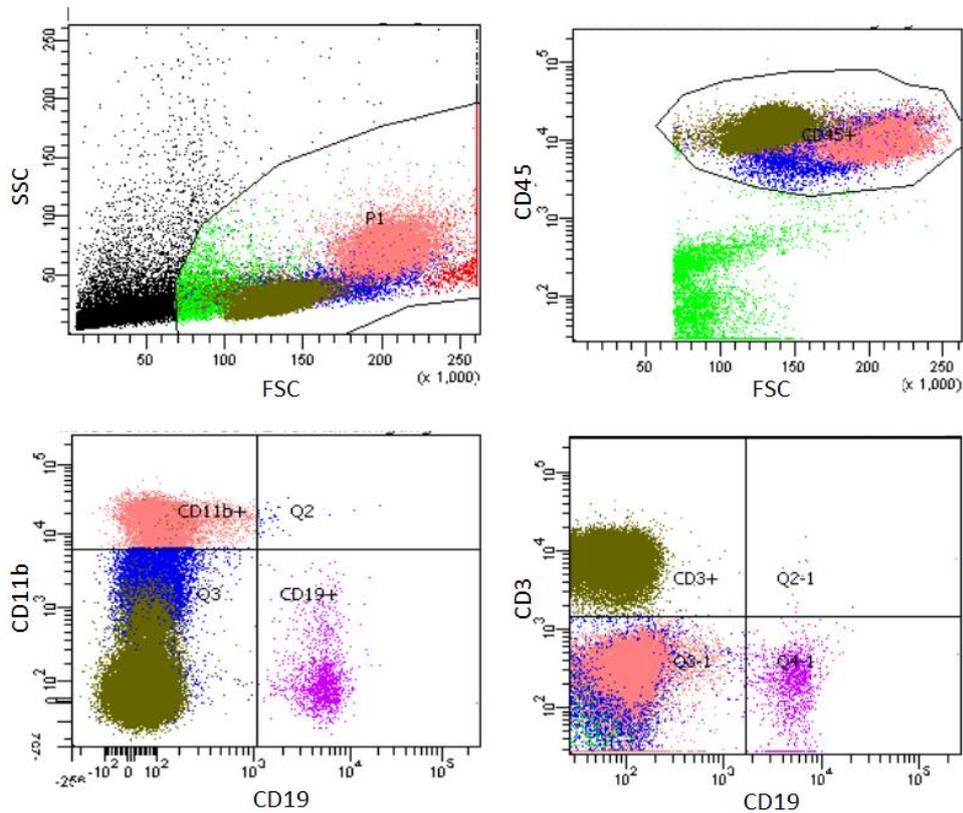
Um die Reinheit der B-Zellen zu prüfen, werden folgende Antikörper verwendet: Anti human CD3, Anti human CD11b, Anti human CD19, Anti human CD45.

Zur Prüfung der Reinheit der CD4+ T-Zellen wird neben oben genannten Antikörpern zusätzlich Anti human CD4 verwendet.

Die verwendeten Antikörper binden für verschiedene Zellarten charakteristische Oberflächenmoleküle. So ist CD19 ein B-Zellmarker, CD3 ein Marker für T-Zellen und CD11b für Makrophagen/Monozyten. Allen Lymphozyten gemeinsam ist das Oberflächenprotein CD45.

Nach der Färbung werden die Zellen mit MACS Puffer gewaschen, abzentrifugiert, resuspendiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet.

Die Grafik zeigt exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse der PBMC vor Aufreinigung (siehe Abbildung 4) und der aufgereinigten B-Zellen mit einer Reinheit von 98% (siehe Abbildung 5).



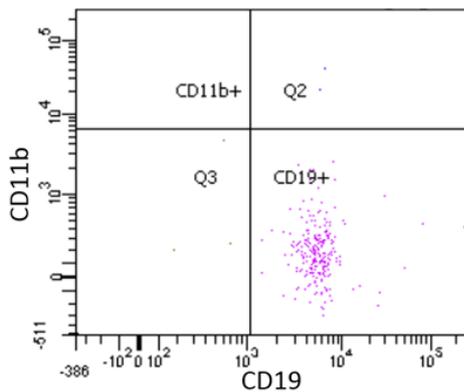
**Abbildung 4 PBMC vor Aufreinigung**

Die Abbildungen zeigen die Gesamt-PBMCs vor der Aufreinigung. Im folgenden Schritt sollen die hier violett dargestellten CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen isoliert werden.

Oben links: Zunächst werden grob die lebenden Einfachzellen ausgewählt

Oben rechts: Von den lebenden Einzelzellen werden die CD45 positiven Lymphozyten gewählt

Unten: Die Lymphozyten werden weiter aufgeteilt nach CD11b, CD3 und CD19. Die CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> Zellen entsprechen den B-Lymphozyten.



**Abbildung 5 Aufgereinigte humane B-Zellen**

Die Abbildung zeigt die aus PBMCs mittels B-Cell-Isolation-Kit aufgereinigten Zellen. Sie entsprechen mit 98%iger Reinheit CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> B-Lymphozyten.

### 2.2.5 Kultivierung und Lagerung humaner Zellen

Alle für die Zellkulturansätze verwendeten Zellen werden aus Vollblut gesunder Probanden gewonnen. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die

Kulturen werden auf 96-Loch-Rundbodenplatten angesetzt und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Inkubator gelagert. Alle Zellkulturarbeiten werden an einer Werkbank unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Einfrieren von Zellen:

Humane PBMCs werden mittels Ficoll aus Vollblut isoliert, unter Zugabe von MACS-Puffer zweimal gewaschen und nach jedem Waschvorgang bei 1200rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Kryovials überführt. Anschließend werden die Zellen bei -80°C im Cryo 1°C Freezing Container für zwei Tage durchgefroren, bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Auftauen von Zellen:

Zum Anlegen einer Zellkultur aus eingefrorenen PBMCs wird die gewünschte Anzahl an Kryovials langsam in der Hand aufgetaut, die Zellen in einen 50ml Falcon überführt und dieser mit MACS Puffer aufgefüllt. Anschließend wird bei 1600rpm für 7 Minuten bei 4° Celsius zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird zur Bestimmung der Zellzahl in 1ml MACS-Puffer resuspendiert.

Für die Versuche zur B-Zellproliferation werden auch eingefrorene Zellen verwendet, während für die Untersuchungen zur IL-3-Rezeptorexpression nur frisch aufgereinigte Zellen benutzt werden.

#### 2.2.6 Zellkulturansätze

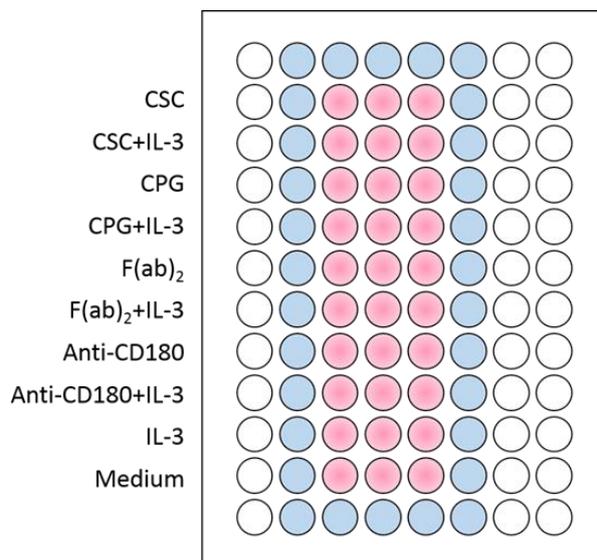
Die folgenden Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank. Aufgereinigte B-Zellen werden mit 300.000 Zellen pro well auf eine 96-Loch Rundbodenplatte, jeweils in 100µl Medium pro well ausplattiert. Als Nährmedium wird Standardmedium RPMI mit 10% FCS, P/S und Glutamin verwendet. Zum Schutz vor Austrocknung wird um die wells mit B-Zellen ein Rand aus PBS pipettiert.

Die ausplattierten B-Zellen werden mit verschiedenen in Medium verdünnten Stimulanzen versetzt. Dabei werden pro well 100µl aufgetragen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf ein Endvolumen von 200µl pro well.

Die Stimulation der Zellen erfolgt mit verschiedenen Zytokinen:

CSC 200µg/ml  
 CPG 1nM  
 Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM 10µg/ml  
 Goat anti-human IgM 10µg/ml  
 LPS 50µg/ml  
 CD40 Ligand 20ng/ml + anti-HA Peptid 1µg/ml  
 Anti-CD40 5µg/ml + goat-anti-mouse Fcy 10µg/ml  
 PWM 10µg/ml  
 Anti-CD180 10µg/ml  
 hIL-2 10ng/ml  
 hIL-4 10ng/ml  
 hIL-6 10ng/ml  
 hIL-10 10mg/ml

Es werden jeweils Triplets für die Zytokine alleine und Triplets für die zusätzliche Zugabe von IL-3 zu den oben aufgeführten Stimulanzen ermittelt.



**Abbildung 6 Beispiel für Pipettierschema**

Rosa: Die B-Zellen (300.000/well) werden mit den angegebenen Stimulanzen in ein Endvolumen von 200µl/well auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte aufgetragen.

Blau: Um dem Austrocknen der Zellansätze entgegenzuwirken, wird um die Zellen ein Rand aus PBS pipettiert.

Die Zellkulturen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

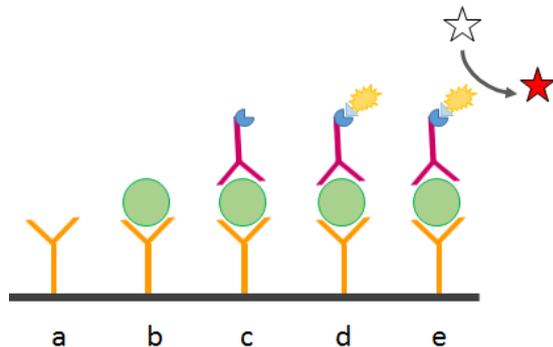
### 2.2.7 Gewinnung der Zellkulturüberstände

Zur Gewinnung der Zellkulturüberstände einer 96-Loch Platte werden unter sterilen Bedingungen an der Werkbank mit einer 200µl Pipette das Kulturmedium

abgenommen und auf die gleiche Vertiefung einer frischen 96-Loch Platte überführt. Diese Platte wird für die spätere Untersuchung mittels ELISA bei -20° Celsius eingefroren.

### 2.2.8 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine beliebte Untersuchungsmethode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen.



**Abbildung 7 Sandwich-ELISA**

Dargestellt sind die einzelnen Reaktionsschritte:

- a: Der Capture-Antikörper (orange) bindet an die Mikroplatte (dunkelgrau)
- b: Zugegebenes lösliches Substrat (grün) wird von dem Primärantikörper gebunden
- c: Der biotinylierte (dunkelblau) Detection Antibody (magenta) bindet allosterisch an das Substrat
- d: Mit HRP (gelb) konjugiertes Streptavidin (hellblau) bindet an den Detektionsantikörper
- e: Das Substrat wird von der HRP umgesetzt

Für die Quantifizierung von hIL-6, hIL-10 und hIL-13 aus den Zellkulturüberständen werden die jeweiligen ELISA Duo-Set Kits des Herstellers R&D Systems verwendet. Bei der verwendeten ELISA-Methode handelt es sich um einen direkten ELISA, auch bekannt als Sandwich-ELISA. Die Versuchsdurchführung erfolgt nach Protokoll des Herstellers.

Für einen Sandwich-ELISA sind zwei Antikörper nötig, die das zu quantifizierende Antigen (hier hIL-6, hIL-10 oder hIL-13) an unterschiedlichen Epitopen binden.

Am Vortag des Versuches wird der im Kit enthaltene Primärantikörper (Capture-Antikörper) in PBS auf eine Konzentration von 2µg/ml verdünnt. Eine 96-Loch ELISA Mikroplatte wird mit 100µl/well verdünntem Antikörper beschichtet.

Am Versuchstag werden zunächst freie Bindungsstellen am Boden der ELISA-Platte abgesättigt. Dazu wird die Platte für zwei Stunden mit 100µl einer Blocklösung (1% BSA in PBS) inkubiert.

Die beschriebenen Inkubationsschritte erfolgen jeweils nach dreimaligem Waschen der Platte, um ungebundene Stoffe vor dem nächsten Reaktionsschritt zu entfernen.

Die zu untersuchenden Zellüberstände und die Standardverdünnungsreihe werden mit 100µl/well auf die vorbereiteten ELISA-Platten pipettiert. Das gelöste Antigen wird über den Primärantikörper (Capture-Antibody) an die Mikroplatte gebunden. Im nächsten Schritt wird 100µl/well eines im Kit enthaltenen biotinylierten zweiten Antikörpers (Detection-Antibody) zugegeben und die Platten für eine Stunde inkubiert. Dieser Detektionsantikörper bindet allosterisch an IL-6, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht.

Anschließend wird den Wells Streptavidin-gebundene Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) zugegeben. Das Streptavidin bindet an die Biotinmoleküle des biotinylierten Detektionsantikörpers, während HRP das für den Farbumschlag verantwortliche Enzym ist.

Zuletzt werden 100µl/well der passenden Substratlösung, bestehend aus einer 1:1 Mischung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin, hinzugegeben. Dieses sogenannte Chromogen Tetramethylbenzidin wird von dem Enzym umgesetzt, was eine Farbreaktion hervorruft. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln wird die Farbreaktion durch Zugabe von 12,5%iger Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte der Proben bei 450nm Wellenlänge mit einem ELISA-Reader bestimmt.

### 2.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung von Streulicht. Wenn die Zellen einer Probe einen vom Gerät erzeugten Laserstrahl passieren, wird das Licht des Lasers gestreut und von Photodetektoren registriert. Dieses Streusignal und durch vorherige Anfärbung der Zellen erzeugte Fluoreszenzsignale werden in elektrische Impulse umgewandelt und ausgewertet. Die Analyse wird mithilfe der Programme CellQuestPro oder FacsDiva durchgeführt.

Der durch Streuung entstandene Forward Scatter (FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße, der Side Scatter (SSC) liefert Informationen über die Granularität der Zelle. Werden die Zellen vor der durchflusszytometrischen Messung mithilfe von fluorchromgekoppelten Antikörpern angefärbt, regt der Laserstrahl die gebundenen Fluorochrome zur Emission von Licht charakteristischer Wellenlängen an. Durch

Verwendung von Antikörpern, die sich gegen verschiedene Oberflächenmoleküle richten und jeweils an unterschiedliche Fluorochrome gebunden sind, kann so zusätzlich eine Aussage über die in der Probe vorhandenen Zelltypen getroffen werden.

#### *2.2.9.1 CFSE-Färbung zur Proliferationsmessung*

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellproliferation werden aufgereinigte B-Zellen vor Ansetzen der Kultur mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der die Zellmembran durchdringen kann und an intrazelluläre Moleküle bindet. Da sich mit jeder Zellteilung die Menge an CFSE in den Tochterzellen ungefähr halbiert, kann mittels quantitativer CFSE-Messung in der Durchflusszytometrie die Zellproliferationsrate bestimmt werden.

Eingefrorenes 2-molares CFSE wird wegen seiner Lichtempfindlichkeit im Dunkeln langsam aufgetaut und 2µl davon in einem 15ml Falcon mit 4,5ml PBS und 500µl 1%BSA gemischt (Falcon 1). In einem zweiten 15ml Falcon werden 4,5ml PBS 500µl 1%BSA ohne Zugabe von CFSE vermischt (Falcon 2).

Die aufgereinigten B-Zellen werden bei 1400rpm für 7 Minuten bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1ml 0,1%BSA in PBS aus Falcon 2 resuspendiert. Die Zellsuspension wird anschließend mit 1ml des CFSE-haltigen Puffers aus Falcon 1 gut vermischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10ml MACS-Puffer abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in der gewünschten Menge an Medium resuspendiert.

#### *2.2.9.2 Extrazelluläre Färbung*

Zur Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Auswertung wird der Überstand der Zellkulturen (Zellmedium und Stimulanzien) abgenommen und die Zellen auf der 96-Lochplatte zweimal mit je 200µl PBS pro well gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen werden die Zellen mit 2400rpm bei 4°C für 7 Minuten zentrifugiert, der Waschpuffer wird nach der Zentrifugation ausgeschüttet.

Um unspezifische Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) zu blockieren, werden die Zellen vor der Färbung bei Raumtemperatur für 15 Minuten durch Zugabe von 10µl Mouse-

IgG (100µg/ml) blockiert. Ohne die Zellen danach erneut zu waschen, werden die zur Färbung verwendeten Antikörper im Anschluss zugegeben und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die benötigte Antikörpermenge wird für ein Endvolumen von 20µl pro Loch berechnet. Sowohl die Fc-Blockade als auch die Färbung finden auf der 96-Loch Rundbodenplatte statt.

Anschließend werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und bei 2400rpm bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Zur durchflusszytometrischen Messung werden die Zellpellets in 200µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Kurz vor der Messung werden 20µl Counting Beads bekannter Konzentration zugegeben.

Um die Zellen in der Durchflusszytometrie unterscheiden zu können, werden ihre Oberflächenmarker mit farbstoffgekoppelten Antikörpern markiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Wirkung von Interleukin-3 auf B-Zellen

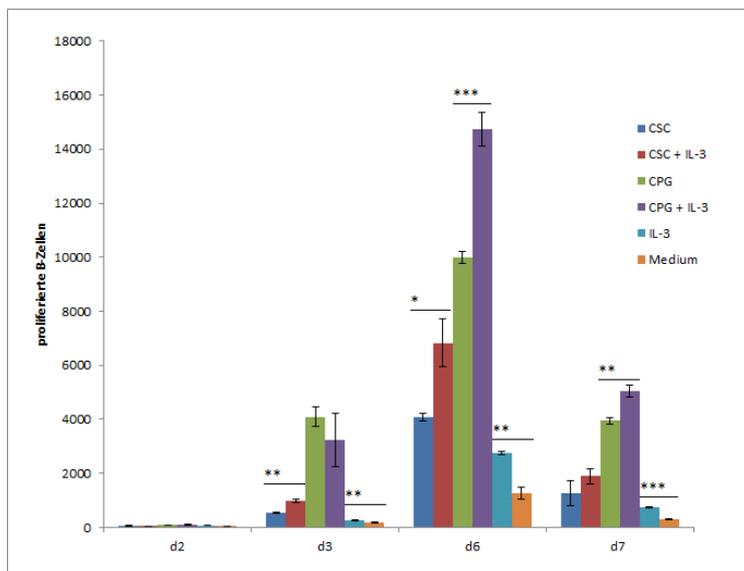
##### 3.1.1 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Proliferation von B-Zellen

###### 3.1.1.1 *Zeitkinetik der Proliferation von B-Zellen unter Stimulation mit Interleukin-3*

Um die Wirkung von IL-3 auf B-Zellen des peripheren Blutes zu erforschen, wurden aufgereinigte B-Zellen gesunder Spender unter Zugabe verschiedener Stimulanzen (wie in 2.2.6 beschrieben) kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt und die Zahl proliferierter Zellen pro 300.000 Zellen berechnet. Dies entspricht der Anzahl an B-Zellen, die pro well eingesetzt wurden.

Hier wurde zum einen der direkte Einfluss von IL-3 auf die B-Zellen untersucht, indem die Proliferationsrate von Zellen, die in Medium mit IL-3 kultiviert wurden, mit der Proliferationsrate der Zellen in reinem Medium verglichen wurde. Zum anderen wurde untersucht, ob IL-3 in Kombination mit bekannten B-Zell-Stimulanzen, wie CSC und CPG, einen synergistischen Effekt hat.

Die Auswertung der Proliferation erfolgte an Tag 2, 3, 6 und 7, um den Zeitpunkt der optimalen IL-3-Wirkung zu ermitteln.



**Abbildung 8 Zeitkinetik der B-Zellproliferation**

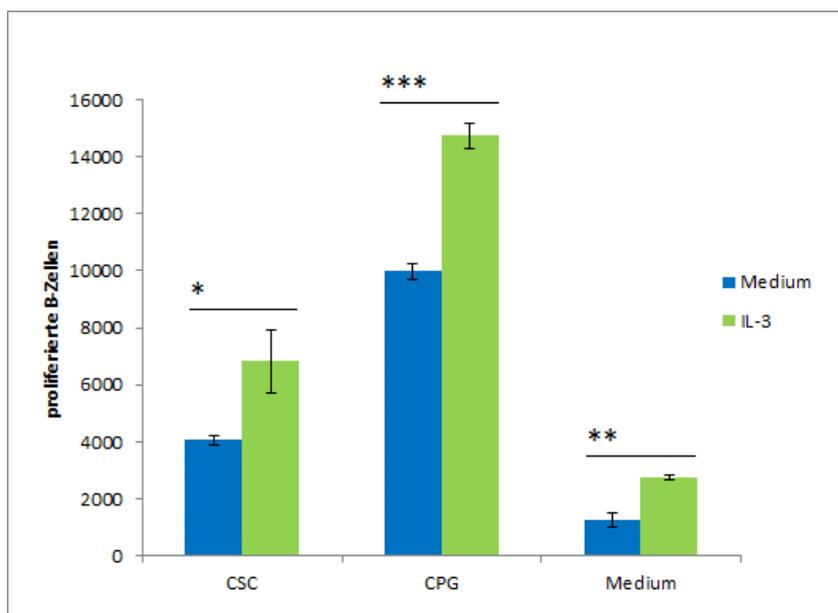
Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 2, 3, 6 oder 7 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM) und IL-3 (20ng/ml). Vor Kultivierung wurden die Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Daten repräsentieren den Mean ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Nach zwei Tagen war sowohl die basale Proliferationsrate der B-Zellen als auch die Proliferation unter Stimulation zu gering, um Aussagen über eine mögliche Wirkung der Stimulanzen zu treffen.

Ein erster Trend der B-Zell-Proliferation unter Stimulation mit CSC, CPG und IL-3 konnte nach drei Tagen beobachtet werden.

Nach sechs Tagen Inkubation wurde die höchste Proliferationsrate in der Zellkultur gemessen. Hier zeigten sich auch die Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Stimulanzen am deutlichsten.

Nach sieben Tagen Inkubation ohne Mediumwechsel war das Zellmedium bereits sichtbar aufgebraucht und die Rate an toten Zellen deutlich gestiegen. In den folgenden Experimenten wurde deshalb besonderes Augenmerk auf Tag 6 gelegt.



**Abbildung 9 Proliferation nach 6 Tagen**

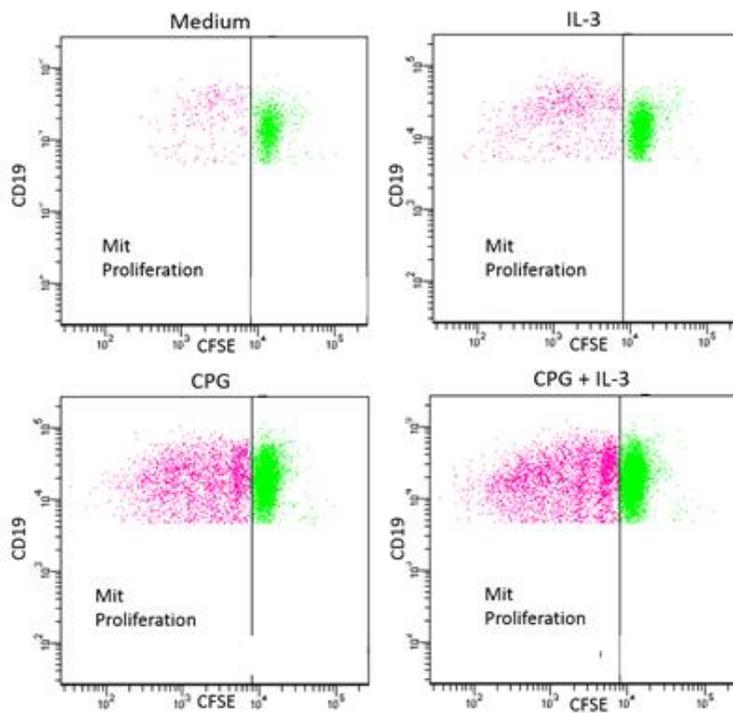
Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM) und IL-3 (20ng/ml). Vor Kultivierung wurden die Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Unter Stimulation mit IL-3 fand sich eine hochsignifikant erhöhte B-Zellproliferation im Vergleich zu den in reinem Medium kultivierten Zellen.

Sogar unter deutlicher Aktivierung der Proliferation durch Kultivierung der peripheren B-Zellen mit CSC oder CPG konnte eine signifikante Zunahme der Proliferation durch

die zusätzliche Stimulation mit IL-3 beobachtet werden. Somit verstärkt IL-3 die B-Zellproliferation unter CSC oder CPG synergistisch.

Der synergistische Effekt von IL-3 konnte ab Tag drei der Zellkultur beobachtet werden und hielt über die Dauer der durchgeführten Zeitkinetik an. Gleiches gilt für die Wirkung von IL-3 allein. (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9)



**Abbildung 10** Dotplot der Durchflusszytometrischen Auswertung der Proliferation nach 6 Tagen

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM) und IL-3 (20ng/ml). Vor Kultivierung wurden die Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Zudem wurden die B-Zellen vor der Auswertung mit CD19 eFluor450 gefärbt, um sicherzustellen, dass nur reine B-Zellen in die Auswertung der Proliferation einbezogen werden.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der B-Zell-Proliferation. Die Zellen wurden zu Beginn des Zellkulturansatzes mit CFSE markiert. Mit jeder Zellteilung verringert sich der CFSE-Gehalt der Tochterzellen. Demnach sind die B-Zellen umso stärker proliferiert, je mehr Zellen mit geringem CFSE-Gehalt in der Durchflusszytometrie gemessen werden.

Wie bereits oben beschrieben, führte die Stimulation der B-Zellen mit CPG zu einer verstärkten Zellproliferation. Die zusätzliche Addition von Interleukin-3 zu CPG steigerte die Proliferation erneut.

Wurden die B-Zellen mit IL-3 allein inkubiert, proliferierten sie ebenfalls stärker als die Vergleichszellen in reinem Medium. (siehe Abbildung 9, Abbildung 10)

### *3.1.1.2 Stimulation der Proliferation von B-Zellen aus peripherem Blut mit verschiedenen Stimulanzen und Interleukin-3*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beobachteten synergistischen Effekte von IL-3 auf die Proliferation der B-Lymphozyten auch bei anderen Stimulanzen beobachtet werden können. Dazu wurden Stimulanzen gewählt, die über verschiedene Mechanismen eine B-Zellaktivierung vermitteln. Da die Zeitkinetik Tag 6 als optimalen Zeitpunkt der B-Zellproliferation unter Stimulation ergab, wurde die Auswertung nach 6 Tagen Kultivierung durchgeführt.

Es wurden erneut humane B-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender aufgereinigt und in Triplets mit verschiedenen Stimulationskombinationen (siehe Abbildung 6) für 6 Tage kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt und die Zahl proliferierter Zellen pro 300.000 Zellen, sowie der prozentuale Anteil proliferierter CD19<sup>+</sup> Zellen an den gesamten B-Zellen berechnet.

Zur Stimulation der B-Zell-Proliferation wurden CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und Anti-CD180, jeweils allein und unter zusätzlicher Zugabe von IL-3 20ng/ml verwendet. Als Vergleich dienten auch hier in Medium kultivierte Zellen.

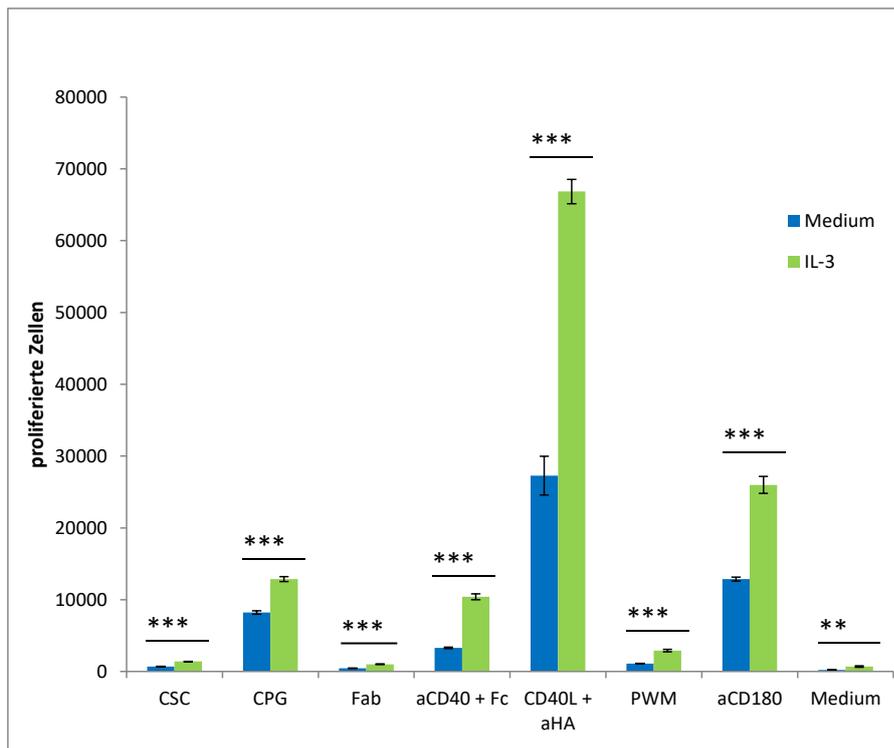


Abbildung 11a

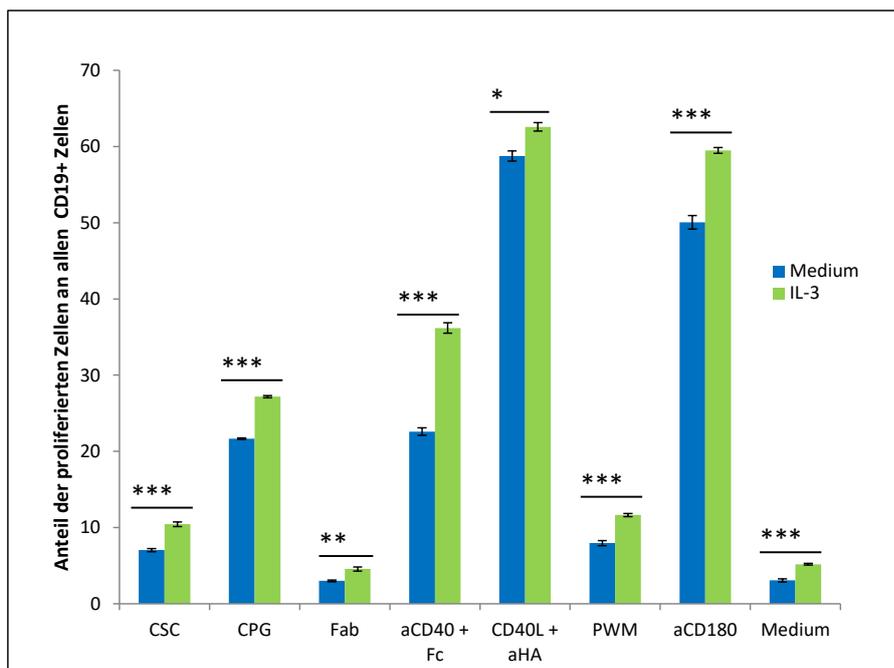


Abbildung 11b

### Abbildung 11 Stimulation der B-Zell-Proliferation

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Vor Kultivierung wurden die Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Die alleinige Zugabe aller oben genannter Stimulanzen zu den B-Zellen bewirkte nach 6 Tagen eine Steigerung der Proliferation. Besonders CD40 Ligand, aCD180 und CPG erhöhten die Anzahl proliferierter B-Zellen im Vergleich zu Medium hochsignifikant.

Neben diesen drei Stimulanzen konnte auch anti-CD40 + Fc den Anteil proliferierter B-Zellen gegenüber Medium stark steigern. (siehe Abbildung 11a und Abbildung 11b)

Die B-Zellen, die mit IL-3 allein versetzt wurden, proliferierten erneut stärker als die zum Vergleich in reinem Medium kultivierten Zellen. (siehe Abbildung 11a und Abbildung 11b)

Wie bei dem zuvor beschriebenen Experiment, wurde durch die Zugabe von IL-3 zu CSC und CPG die Zahl proliferierter B-Zellen weiter erhöht. Derselbe synergistische Effekt von Interleukin-3 konnte bei allen verwendeten Stimulanzen beobachtet werden. (siehe Abbildung 11a)

Die Addition von Interleukin-3 zu allen von uns verwendeten B-Zellstimulanzen steigerte neben der Absolutzahl proliferierter B-Zellen auch den prozentualen Anteil proliferierter Zellen an den gesamten CD19<sup>+</sup> Zellen. Dabei fiel der additive Effekt von Interleukin-3 in Kombination mit dem starken B-Zell-Stimulanz CD40L + aHA vergleichsweise gering aus. (siehe Abbildung 11b)

### *3.1.1.3 Steigerung des Überlebens von B-Zellen aus peripherem Blut durch Interleukin-3*

Neben einer Auswirkung von IL-3 auf die Proliferation von B-Zellen wurde eine mögliche Wirkung des Interleukins auf das Überleben von CD19<sup>+</sup> Zellen untersucht.

Zu diesem Zweck wurden humane B-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender in Triplets mit den bereits zuvor verwendeten Stimulationskombinationen für 6 Tage kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt und der Anteil lebender CD19<sup>+</sup> Zellen an den proliferierten bzw. nicht proliferierten CD19<sup>+</sup> Zellen berechnet.

Zur Stimulation der B-Zell-Proliferation wurden CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und Anti-CD180, jeweils allein und unter zusätzlicher Zugabe von IL-3 20ng/ml eingesetzt. Als Vergleich dienten in Medium kultivierte Zellen.

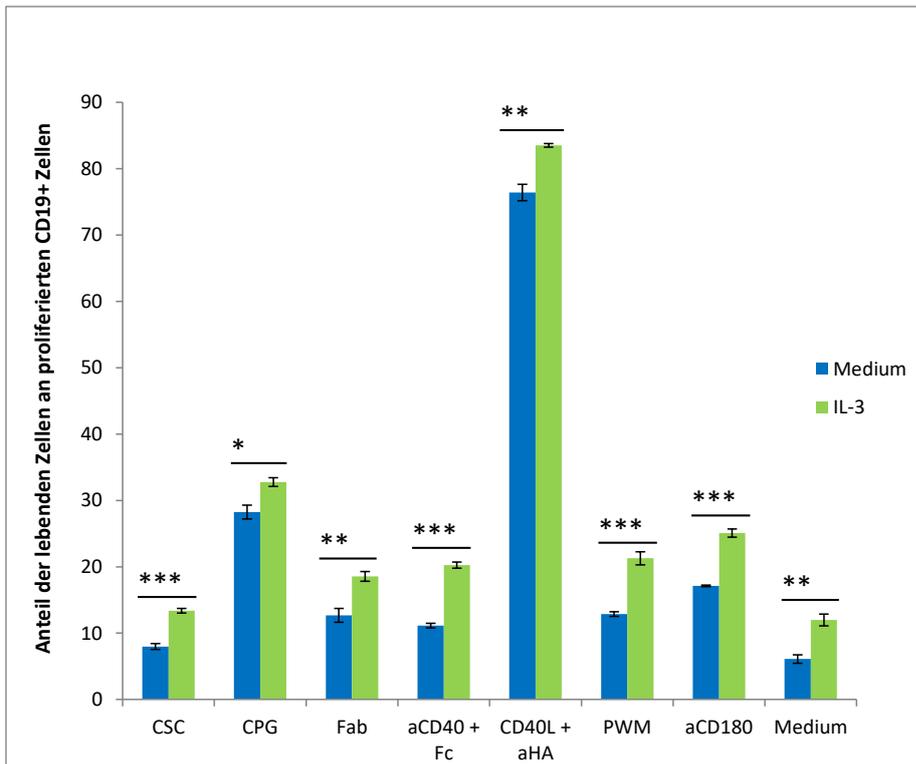


Abbildung 12a

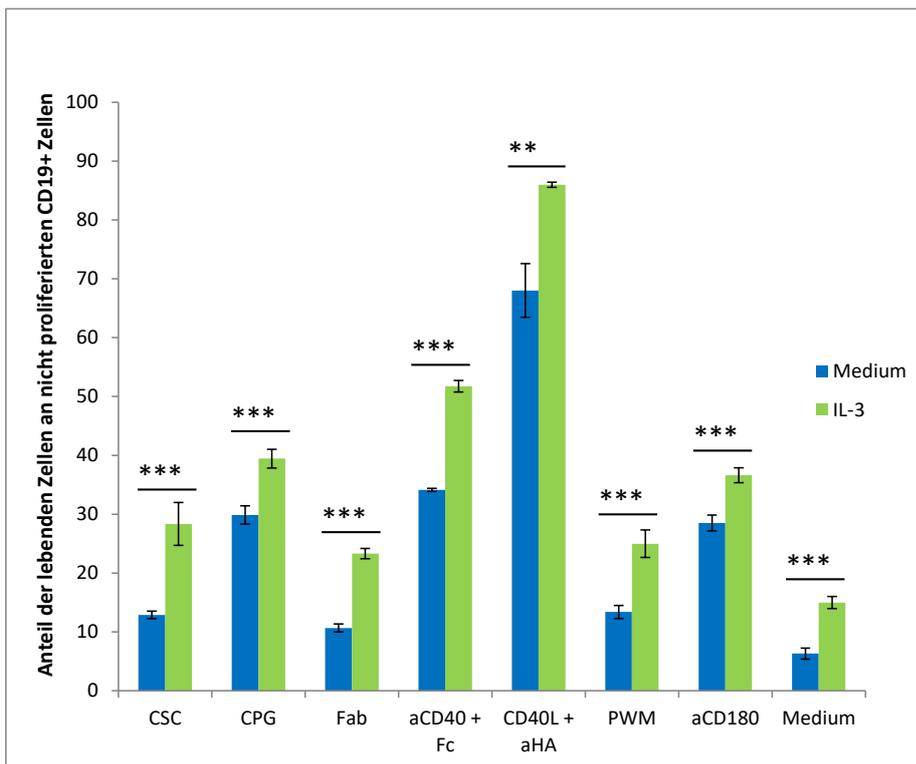


Abbildung 12b

### Abbildung 12 Überleben der B-Zellen unter Stimulation mit IL-3

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzien kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Vor Kultivierung wurden die Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Zellen an den proliferierten (Abbildung 12a) bzw an den nicht proliferierten (Abbildung 12b) B-Zellen. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Alle von uns verwendeten B-Zell-Stimulanzen steigerten nach 6 Tagen Inkubation den Anteil lebender B-Zellen, sowohl unter den proliferierten, als auch unter den nicht proliferierten B-Zellen. Auch Interleukin-3 alleine erzielte eine gegenüber Medium höhere Rate überlebender proliferierter und nicht proliferierter Zellen. (siehe Abbildung 12a und Abbildung 12b)

Durch die Zugabe von Interleukin-3 zu allen verwendeten B-Zellstimulanzen konnte eine weitere Steigerung des Anteils lebender Zellen unter den CD19<sup>+</sup> Zellen erzielt werden. Dieser Effekt konnte sowohl bei den proliferierten, als auch bei den nicht proliferierten B-Zellen beobachtet werden. (siehe Abbildung 12a und Abbildung 12b)

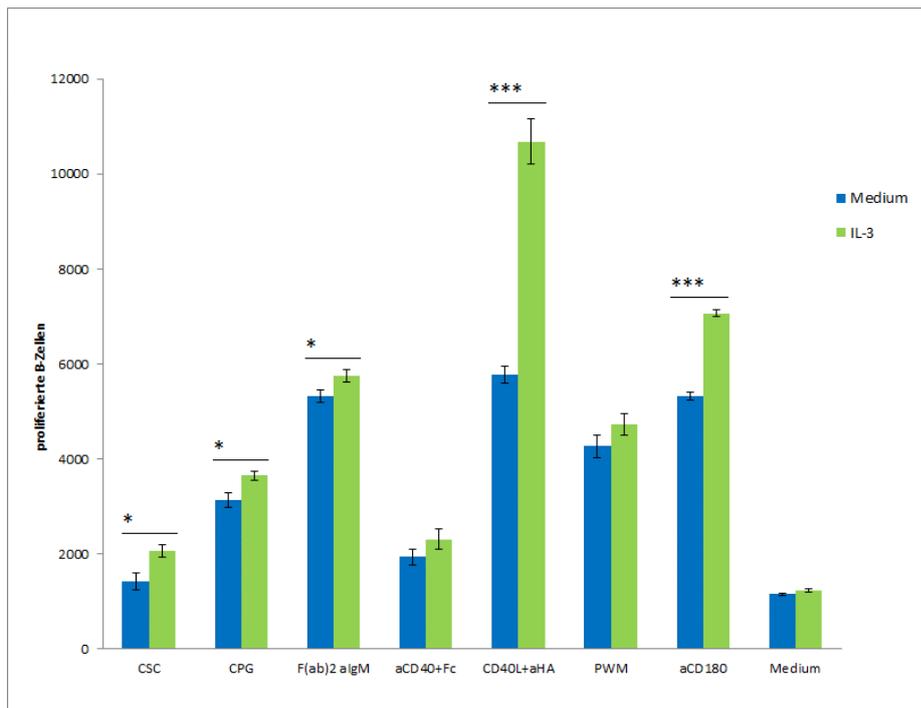
#### *3.1.1.4 Kostimulation von B-Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen*

Unter Stimulation mit CD40 Ligand + anti-HA-Peptid, ein Stimulans, das die T-Zellabhängige B-Zellaktivierung imitiert, wurde eine starke Proliferation der B-Lymphozyten beobachtet. Da diese artifizielle Form der T-Zell-B-Zell-Interaktion starke Auswirkungen auf die B-Zellproliferation hat, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern die gemeinsame Inkubation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Proliferation der B-Zellen und den Effekt von IL-3 beeinflusst.

Dazu wurden aufgereinigte B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CFSE gefärbt und anschließend in Medium auf eine 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Pro Well wurden 100.000 B-Zellen und 50.000 T-Zellen verwendet.

Anschließend wurden die B-Zellen zusätzlich mit verschiedenen Substanzen stimuliert: CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcγ, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und Anti-CD180. Die T-Zellen wurden durch die Zugabe von löslichem anti-CD3 ebenfalls aktiviert. Zum Vergleich wurden Zellen in reinem Medium bzw. Medium mit IL-3 inkubiert.

Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>, da Vorversuche gezeigt hatten, dass aufgrund der hohen T-Zell-Proliferationsrate bereits nach drei Tagen ein hoher Anteil proliferierter Zellen vorlag und das Medium weitestgehend aufgebraucht war.



**Abbildung 13 Kostimulation CD4<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>**

Aus dem peripheren Blut gesunder Spender aufgereinigte humane B-Lymphozyten (100.000/ well) und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (50.000/well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte mit löslichem anti-CD3 (5µg/ml) für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur B-Zellstimulation wurden folgende Substanzen mit und ohne IL-3 (20ng/ml) verwendet: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Vor Kultivierung wurden die B-Zellen CFSE-gefärbt und bei Versuchsende durchflusszytometrisch deren Proliferation bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Wie bereits in den vorhergegangenen Versuchen konnte auch unter Kostimulation mit T-Zellen bei Kultivierung mit CD40 Ligand, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, und anti-CD180 eine starke Steigerung der B-Zell-Proliferation erreicht werden.

Die Proliferationsrate unter Kostimulation von CD19<sup>+</sup> B- Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigt große Parallelen zu den Stimulationsversuchen der reinen B-Zellen. Hier hatte sich ebenfalls bei Inkubation der B-Zellen mit CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, aCD40 + Fc, CD40L + aHA und aCD180 bei zusätzlicher Stimulation mit IL-3 ein starker synergistischer Effekt auf die Steigerung der Zahl proliferierter humaner B-Lymphozyten gezeigt. (siehe Abbildung 11 und Abbildung 13)

In Anwesenheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte durch Zugabe von IL-3 zu mit aCD40 und PWM stimulierten B-Zellen kein synergistischer Effekt mehr erzielt werden. Auch die alleinige Stimulation mit IL-3 führte zu keiner signifikanten Proliferationssteigerung.

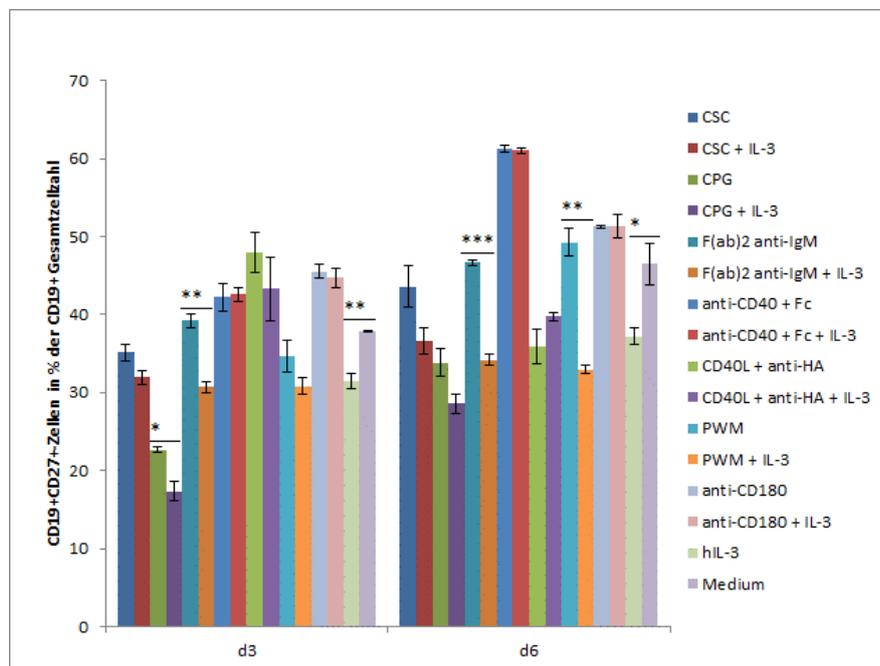
### 3.1.2 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung von B-Zellen

#### 3.1.2.1 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Memory-B-Zellen und deren Proliferation

Neben der Auswirkung von IL-3 auf die Proliferation der B-Zellen wurde auch eine mögliche Wirkung auf die Zelldifferenzierung untersucht.

Dazu erfolgte der Zellkulturansatz mit 300.000 aufgereinigten B-Zellen in Medium mit verschiedenen Stimulanzen, wie bereits mehrfach beschrieben. Es wurden folgende Stimulanzen verwendet: CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und Anti-CD180. Auch hier wurden die Stimulanzen allein sowie die Kombination der Stimulanzen mit IL-3 20ng/ml auf jeweils 3 Wells untersucht. Als Vergleichswert dienten Zellen in Medium bzw. Medium mit IL-3.

Nach 3 bzw. 6 Tagen Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD27, einem Oberflächenmarker von Memory-B-Zellen, untersucht.



**Abbildung 14 Proliferation/Differenzierung der B-Zellen zu Memory-B-Zellen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Bei Versuchsende wurden durchflusszytometrisch die Anzahl der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen bestimmt. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> an den CD19<sup>+</sup> dargestellt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Die Stimulation humaner B-Zellen mit IL-3 allein führte sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 zu einem geringeren Prozentsatz an CD27+ Memory-Zellen als bei den Vergleichszellen in Medium.

Durch Stimulation der B-Zellen mit CPG allein konnte ebenfalls an beiden Tagen ein geringerer Prozentsatz an Memory-B-Zellen erzielt werden.

Die Zugabe von IL-3 zu F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM oder PWM führte nach sechstägiger Inkubation zu einem deutlich niedrigeren Anteil CD27 positiver Zellen an den Gesamtzellen als ohne Zugabe des Interleukins. Die Tendenz zu einem geringeren Memory-B-Zellanteil an den Gesamtzellen durch IL-3-Zugabe konnte nach 6 Tagen auch bei CSC und CPG beobachtet werden.

Die Inkubation mit aCD40 + Fc hingegen hatte besonders an Tag 6 einen gegenüber Medium deutlich gesteigerten Anteil an Memory-B-Zellen zur Folge. Die zusätzliche Kostimulation mit IL-3 beeinflusste diesen Effekt nicht. Anti-CD180 zeigte ebenfalls die Tendenz zur Stimulation der B-Zell-Differenzierung zu CD27+ Zellen bzw. Steigerung deren Proliferation. Auch hier erzielte eine Kombination mit IL-3 keine zusätzliche Wirkung. (siehe Abbildung 14)

Neben dem prozentualen Anteil an CD27+ Zellen unter den B-Zellen bestimmten wir auch die absolute Zahl CD19+CD27+ Zellen nach 6 Tagen Inkubation.

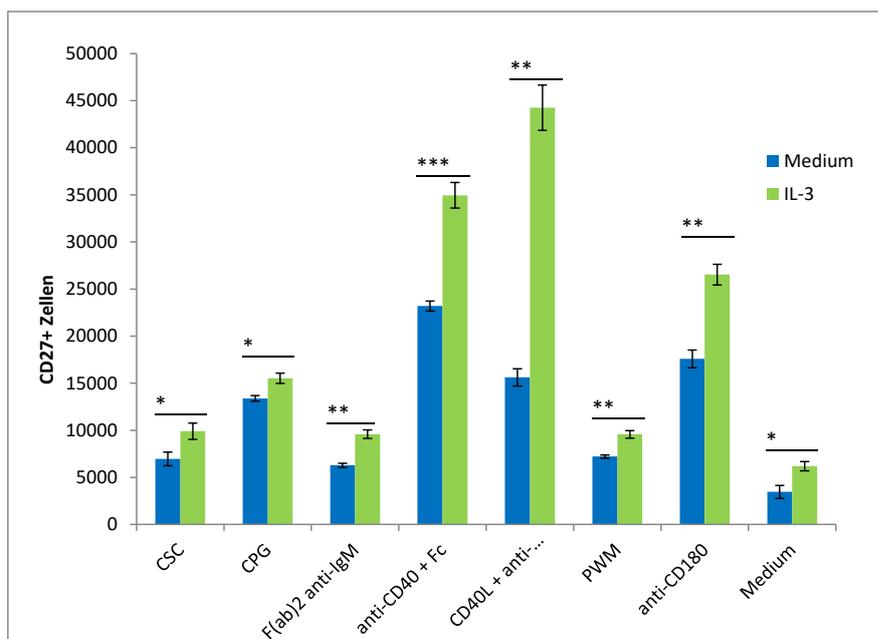


Abbildung 15a

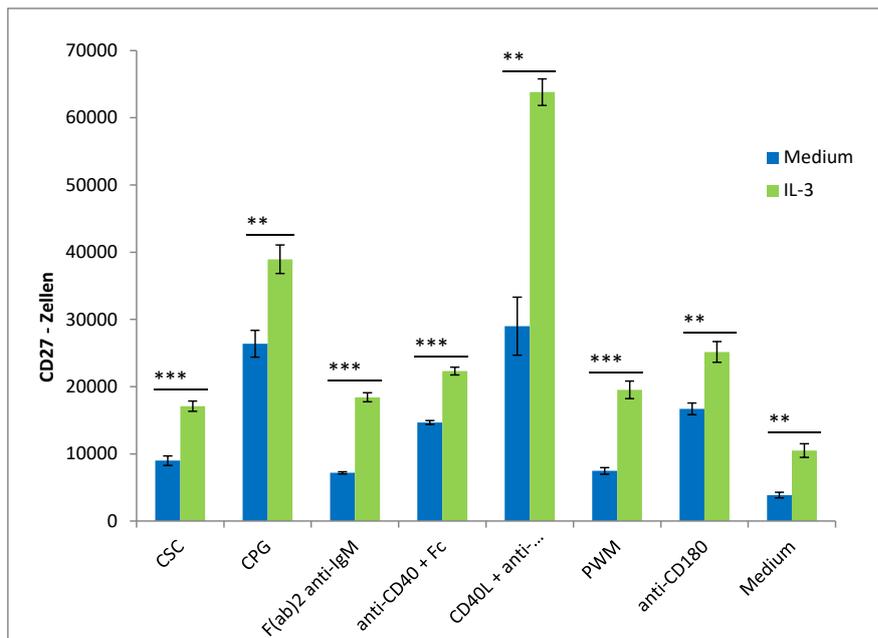


Abbildung 15b

### Abbildung 15 Proliferation/Differenzierung der B-Zellen zu Memory-B-Zellen nach 6 Tagen Inkubation

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Bei Versuchsende wurden durchflusszytometrisch die Anzahl der CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (Abbildung 15a) bzw CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (Abbildung 15b) Zellen bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Die Anzahl CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> stieg nach 6 Tagen Inkubation mit CPG, CD40L, anti-CD40+Fc und anti-CD180 deutlich an. Wurde den verwendeten Stimulanzen IL-3 hinzugefügt, stieg die Zahl der CD27<sup>+</sup> Zellen nach 6 Tagen bei allen Stimulanzen signifikant an. (siehe Abbildung 15a)

Die absolute Zahl der Memory-B-Zellen stieg in unseren Versuchen unter Kostimulation mit Interleukin-3 an, ihr Anteil an der Gesamtzellzahl der B-Zellen sank jedoch ab. (siehe Abbildung 14)

Die absolute Zahl der CD27<sup>-</sup> Zellen stieg unter Stimulation mit Interleukin-3 ebenfalls an. (siehe Abbildung 15b)

Bei anti-CD40+Fc wurde wie bereits beschrieben nicht nur eine absolut gesteigerte Zahl an CD27<sup>+</sup> Zellen, sondern auch ein gesteigerter Anteil der CD27<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> an den CD19<sup>+</sup> gesamt beobachtet.

### *3.1.2.2 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen*

Nach 3 bzw. 6 Tagen Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> wurden die B-Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD138 untersucht. Dabei handelt es sich um einen Marker, der auf der Zelloberfläche von Plasmazellen zu finden ist.

Unter den gegebenen Stimulationsarten konnte mit und ohne Co-Stimulation mit IL-3 keine Ausdifferenzierung zu Plasmazellen beobachtet werden.

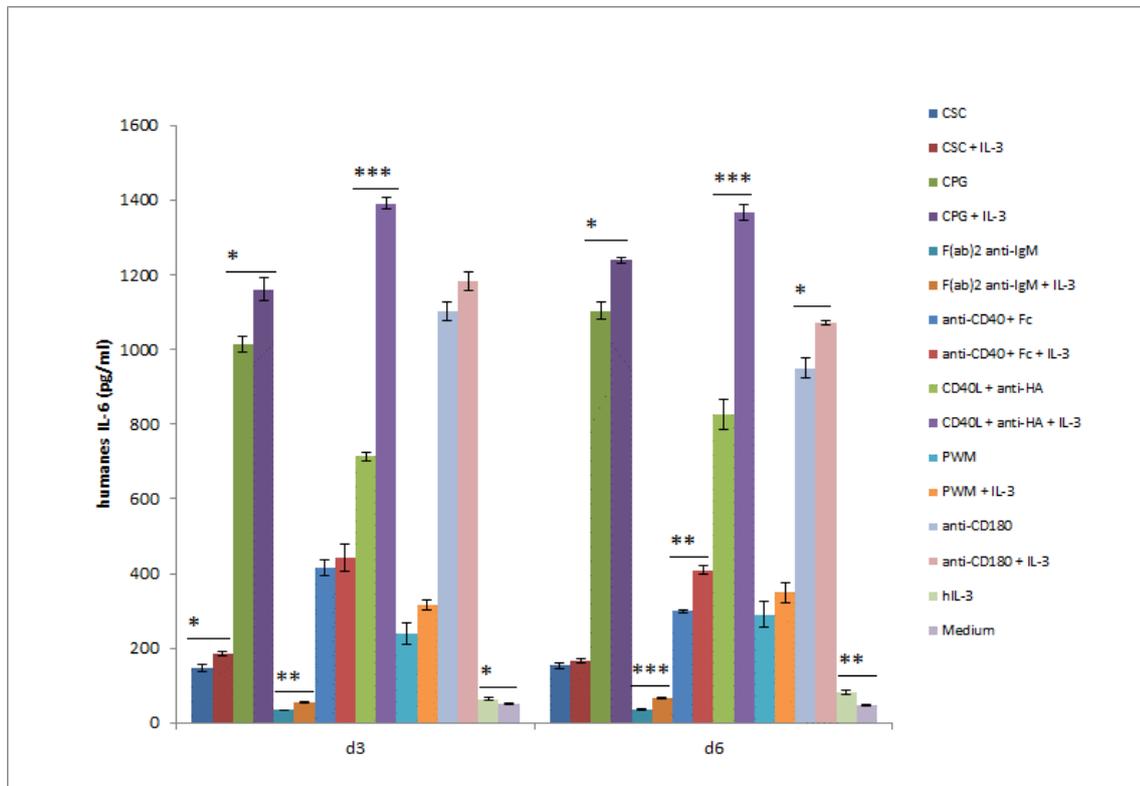
### 3.1.3 Die Wirkung von Interleukin-3 auf das von B-Zellen exprimierte Zytokinprofil

Um zu ermitteln, inwiefern eine Stimulation mit Interleukin-3 die von B-Zellen gebildeten Botenstoffe beeinflusst, wurden die Überstände von Zellkulturen mittels ELISA untersucht.

Zur Gewinnung der Zellüberstände wurden B-Zellen gesunder Spender in 96-Lochplatten mit einer Auswahl folgender Stimulanzen versetzt bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert: CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub>-anti-human IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und anti-CD180, jeweils allein und unter zusätzlicher Zugabe von IL-3 20ng/ml. Als Vergleich dienten B-Zellen, die in reinem Medium kultiviert wurden.

Nach 3 bzw. 6 Tagen wurde der Zellüberstand abgenommen, in eine neue 96-Loch-Rundbodenplatte überführt und bei -20°C eingefroren. Die Überstände wurden zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA auf Interleukin-6, 10 und 13 untersucht.

### 3.1.3.1 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-6 durch humane B-Zellen



**Abbildung 16 Sekretion von IL-6**

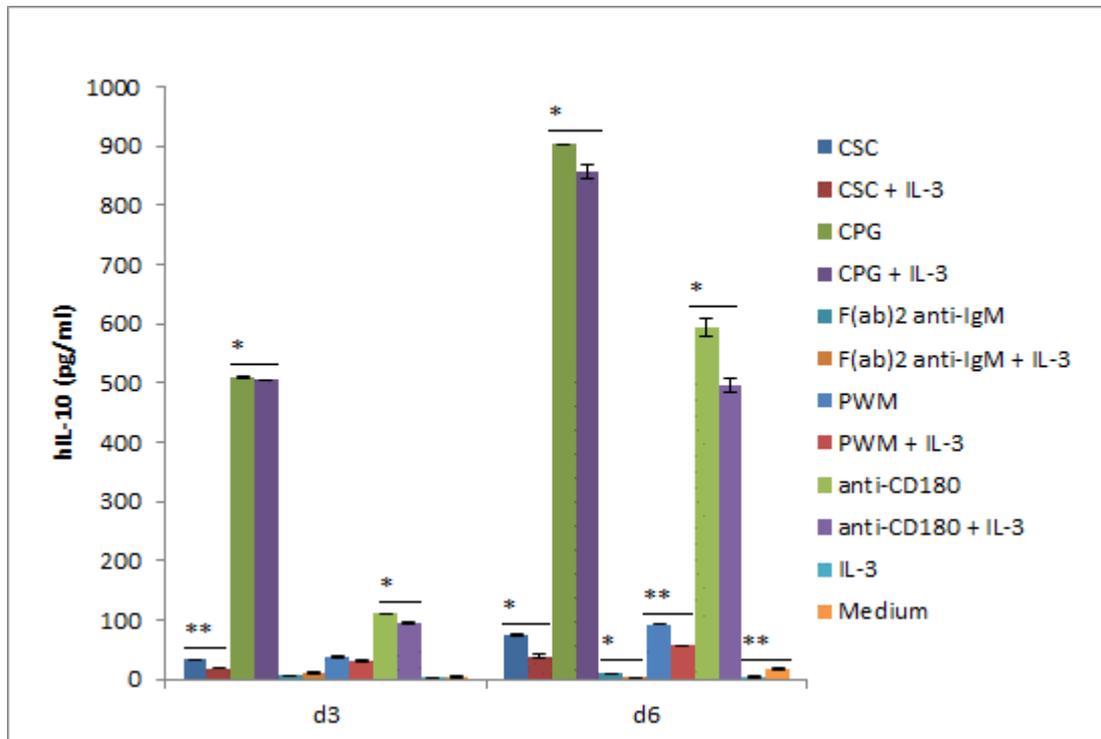
Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Der Titer von IL-6 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Sowohl nach drei als auch nach sechs Tagen Kultivierung erwiesen sich CPG, CD40L + aHA und aCD180 als potente Stimulatoren der IL-6 Freisetzung von B-Zellen. Interleukin-3 alleine bewirkte ebenfalls an beiden Tagen höhere Level an Interleukin-6 in den Zellkulturüberständen.

Die Kostimulation der B-Zellen mit IL-3 und CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, aCD40 + Fc, CD40L + aHA oder aCD180 steigerte die Freisetzung von Interleukin-6 aus den B-Lymphozyten nach 6 Tagen Stimulation gegenüber den Vergleichszellen ohne IL-3 signifikant. An beiden Tagen konnte auch bei den übrigen Stimulanzen durch Zugabe des proinflammatorischen Zytokin IL-3 ein Trend zur Steigerung der Ausschüttung des ebenfalls proinflammatorisch wirksamen Interleukin-6 beobachtet werden. Zudem zeigt sich deutlich, dass die stark erhöhten IL-6-Titer bereits an Tag drei vorlagen,

obwohl, wie vorherige Experimente zeigten, die B-Zellen zu diesem Zeitpunkt noch kaum proliferiert waren. (siehe Abbildung 16)

### 3.1.3.2 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-10 durch humane B-Zellen



**Abbildung 17 Sekretion von IL-10**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Der Titer von IL-10 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Bereits nach drei Tagen Stimulation der B-Lymphozyten mit CPG zeigten die Zellen eine gegenüber den in Medium gewachsenen Zellen hochsignifikant stärkere IL-10-Freisetzung. Nach sechs Tagen wurde im Kulturüberstand der mit anti-CD180 inkubierten Zellen ebenfalls ein hoher IL-10 Spiegel gemessen. Die Stimulanzen CPG und anti-CD180 sind demzufolge potente Stimulatoren der IL-10-Freisetzung aus B-Zellen.

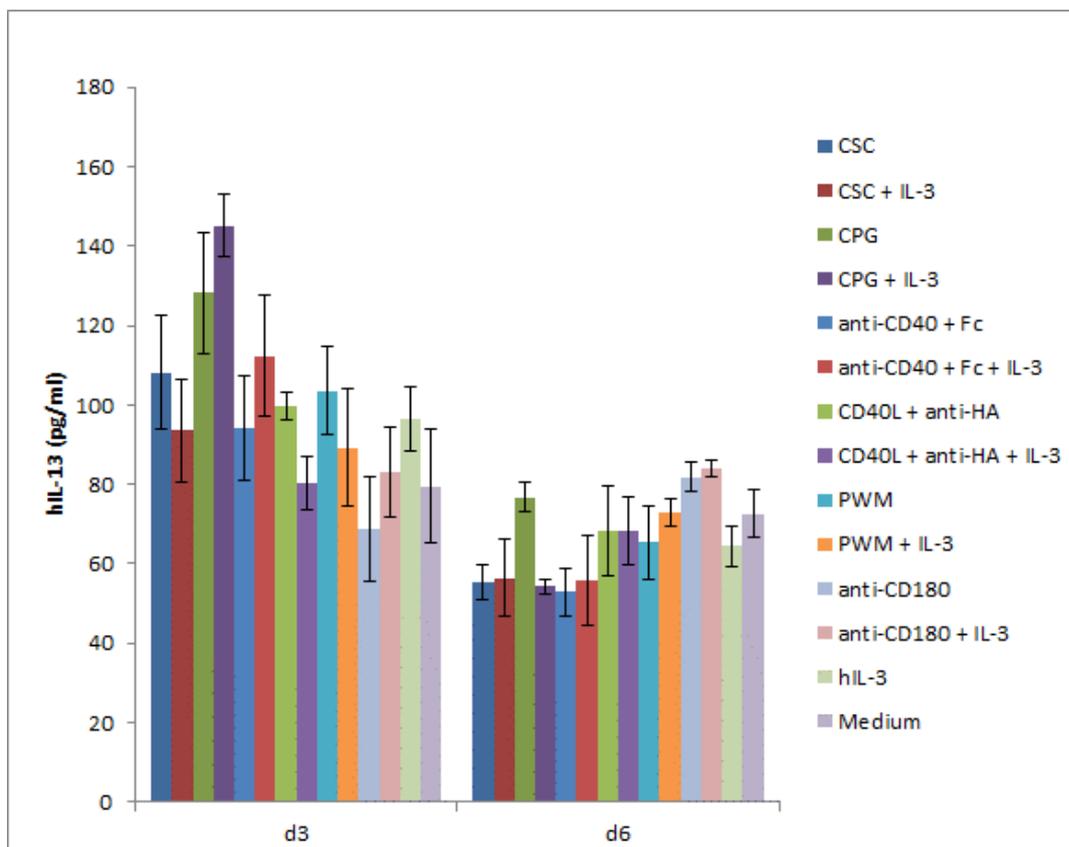
Die Effekte von IL-3 auf die IL-10-Freisetzung waren nach drei Tagen noch schwach, bei CSC, CPG und aCD180 konnte jedoch eine Tendenz zur Hemmung der IL-10-Freisetzung beobachtet werden, wenn zu den Stimulanzen zusätzlich IL-3 gegeben wurde.

Nach 6-tägiger Inkubation der Zellen wurden unter Kostimulation von CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, PWM und aCD180 mit IL-3 signifikant niedrigere IL-10-Konzentrationen in den Überständen gemessen als bei den ohne IL-3 inkubierten Vergleichszellen.

Auch die alleinige Stimulation der B-Zellen mit IL-3 hatte reduzierte IL-10-Spiegel gegenüber Zellen, die lediglich mit Medium kultiviert wurden, zur Folge.

Die Kostimulation von B-Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-3 führte folglich nach 6 Tagen Zellkultur zu einer Hemmung der Freisetzung des antiinflammatorischen IL-10 in den Überständen der Zellkultur (siehe Abbildung 17).

### 3.1.3.3 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Sekretion von Interleukin-13 durch humane B-Zellen



**Abbildung 18 Sekretion von IL-13**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Der Titer von IL-13 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM.

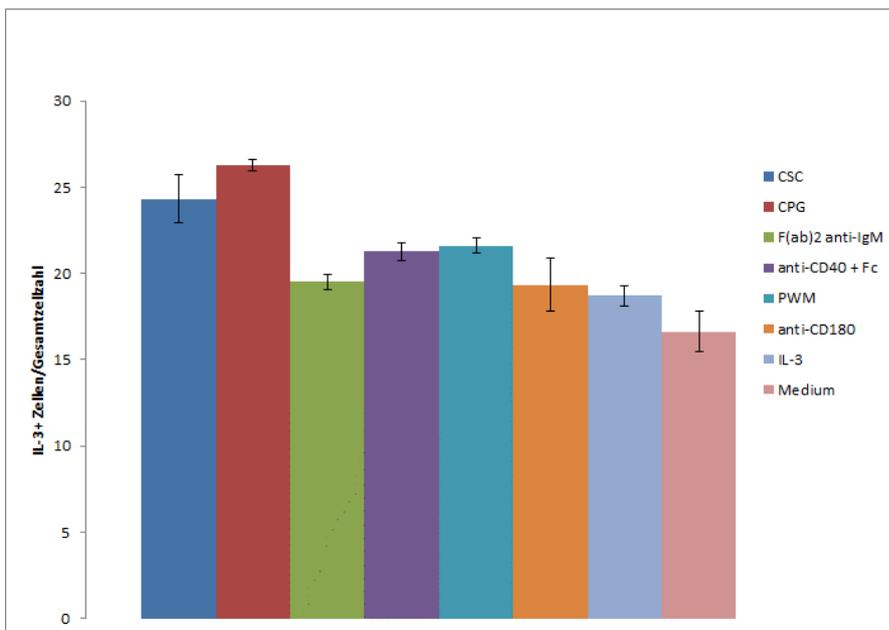
Durch Inkubation von B-Zellen mit Interleukin-3 konnten keine signifikanten Effekte auf die IL-13-Freisetzung gegenüber den Vergleichszellen ohne IL-3 beobachtet werden. (siehe Abbildung 18)

### 3.2 Regulation der Interleukin-3 Rezeptor Expression auf humanen B-Zellen

#### 3.2.1 Interleukin-3 Bindung an B-Zellen

Um die Bindung von Interleukin-3 an seinen Rezeptor auf B-Zellen zu erforschen wurden zunächst aufgereinigte B-Zellen mit 300.000 Zellen pro well auf 96-Loch Rundbodenplatten mit folgenden Stimulanzen bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> für 6 Tage inkubiert: CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub>-anti-human-IgM, anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, PWM, anti-CD180 und IL-3. Als Vergleich diente Medium.

Die Färbung erfolgte durch 60-minütige Inkubation mit biotinyliertem IL-3 bzw. Negativkontrolle und anschließender Zugabe von Avidin-FITC.



**Abbildung 19 IL-3-Bindung auf B-Zellen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Die Zellen wurden mit biotinyliertem IL-3 gefärbt und durchflusszytometrisch das Verhältnis der IL-3<sup>+</sup> Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM.

Nach 6 Tagen Inkubation zeigte sich bei allen Stimulanzen ein vergleichbarer Anteil IL-3 positiver Zellen (siehe Abbildung 19). Dieser Effekt ist vermutlich auf unspezifische Bindungen des biotinylierten IL-3 an die B-Zellen zurückzuführen.

Auch durch Inkubation der Zellen mit mouse IgG zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen vor der eigentlichen Färbung mit biotinyliertem IL-3 konnte die Spezifität der IL-3-Bindung nicht ausreichend gesteigert werden, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

### 3.2.2 Expression von CD123 auf B-Zellen

Da es nicht möglich war, mittels IL-3-Bindung eine eindeutige Aussage über die Expression des IL-3 Rezeptors auf B-Lymphozyten zu treffen, wurden die Zellen stattdessen auf CD123, die  $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors, untersucht.

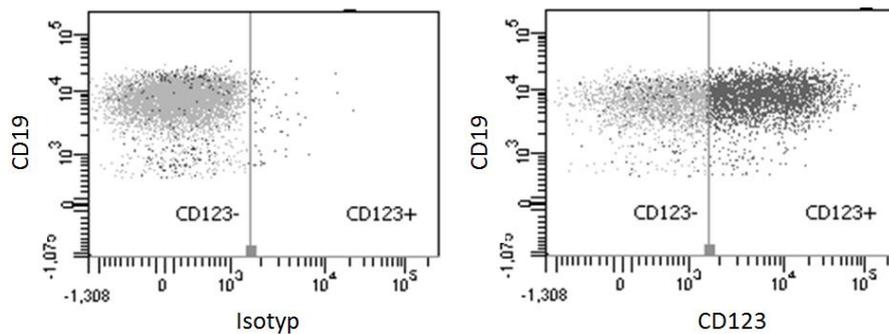
#### 3.2.2.1 *Auswirkung der artifiziellen B-Zellstimulation auf die Expression von CD123*

In vorherigen Versuchen wurden bereits einige Stimulanzen identifiziert, die Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Zellen beeinflussen. Im Folgenden wurde die Auswirkung dieser Stimulanzen auf den Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen und die Expression der IL-3-Rezeptor  $\alpha$ -Kette bestimmt.

Aufgereinigte B-Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender wurden mit verschiedenen Stimulanzen versetzt und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub>-anti-human IgM, anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, PWM und anti-CD180 verwendet. Als Vergleichswert dienten Zellen, die in reinem Medium kultiviert wurden.

Nach drei Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD123 untersucht.

Um einen Grenzwert für die Bezeichnung der Zellen als CD123<sup>+</sup>-Zellen festzulegen wurde die Hälfte der Wells mit anti-CD123 und die andere Hälfte mit dem entsprechenden Isotyp gefärbt. Um sicherzustellen, dass es sich nach der Aufreinigung und Kultivierung um reine B-Zellen handelt, wurden die Zellen zudem mit anti-CD19 gefärbt.

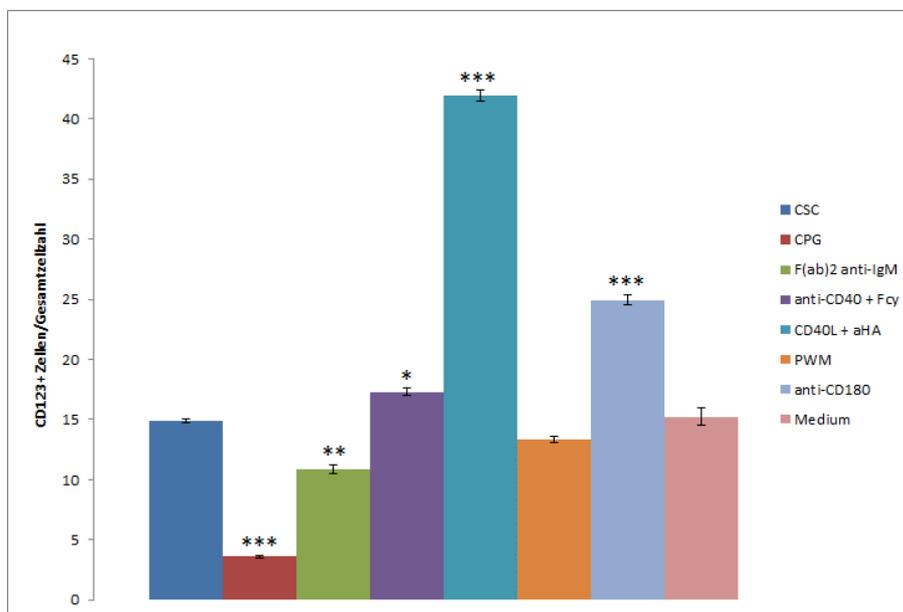


**Abbildung 20 Dotplot Durchflusszytometrie**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Zellen wurden mit 300.000/well für 6 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Hälfte der Wells mit anti-CD123 Pe-Cy5.5 (rechts) und die andere Hälfte als Negativkontrolle mit dem entsprechenden Isotyp Pe-Cy5.5 (links) gefärbt. Alle Zellen wurden zudem mit anti-CD19 eFlour450 (Pacific Blue-A) gefärbt.

Wurden die Zellen mit CD40 Ligand + anti-HA Peptid für drei Tage stimuliert und anschließend mit dem Isotypen inkubiert, fand keine Bindung des farbstoffgekoppelten Antikörpers statt.

Wurde hingegen anstelle des Isotypen anti-CD123 verwendet, konnte eine deutliche Bindung des farbstoffgekoppelten Antikörpers beobachtet werden. Die Zellen, deren PerCp-Cy5.5 Signalstärke den mithilfe der Isotyp-gefärbten Referenzzellen ermittelten Grenzwert überschritt, wurden als CD123+ bezeichnet. (siehe Abbildung 20)



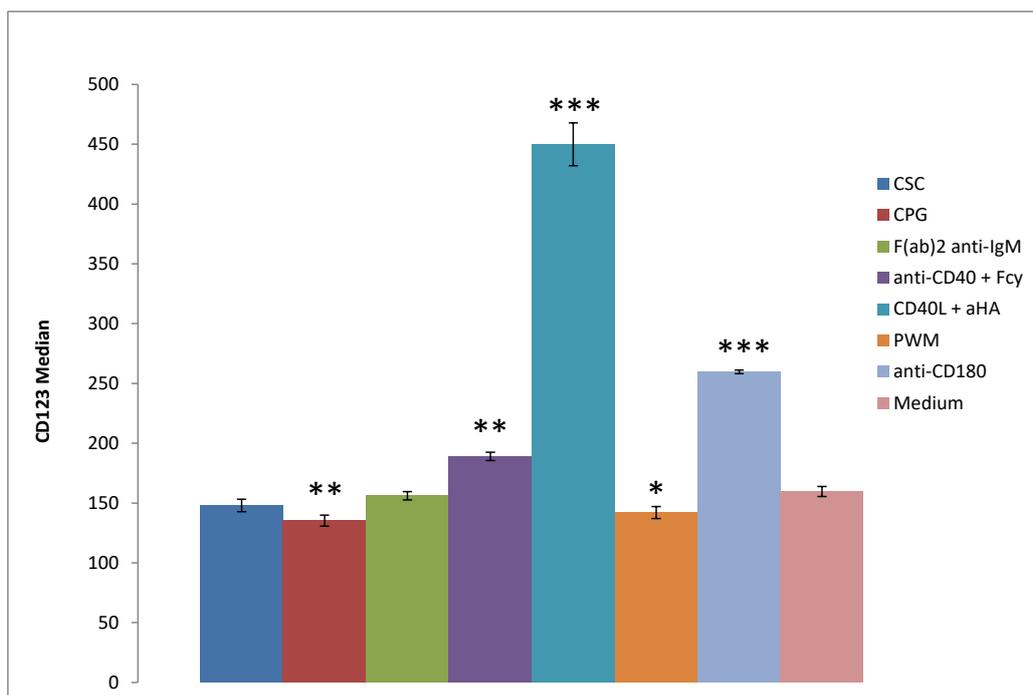
**Abbildung 21 Expression von CD123 auf B-Zellen unter verschiedenen Stimulanzen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123+ Zellen an der Gesamtzellzahl. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001, Referenzwert Medium

Nach drei Tagen Inkubation war der Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen unter Stimulation mit aCD40 + Fc, CD40L + aHA und aCD180 signifikant höher als bei den Vergleichszellen in Medium. Ein besonders starker Zuwachs CD123<sup>+</sup> Zellen war unter Stimulation der B-Zellen mit CD40L + aHA zu beobachten.

Wurden die B-Zellen hingegen mit CPG oder F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM versetzt, war der prozentuale Anteil an CD123<sup>+</sup> Zellen deutlich geringer als bei Verwendung von reinem Medium. Besonders deutlich war dieser Effekt bei CPG zu beobachten. Unter Stimulation mit PWM zeigte sich ebenfalls ein leichter Trend zu einem geringeren CD123<sup>+</sup> Prozentsatz. (siehe Abbildung 21)

Um eine genauere Vorstellung der Rezeptorexpression auf B-Zellen unter Stimulation zu bekommen, wurde neben dem prozentualen Anteil rezeptorpositiver Zellen auch die Rezeptordichte pro Zelle bestimmt. Dazu wurde auf den als CD123<sup>+</sup> definierten Zellen der Median-Wert der Expressionsstärke bestimmt.



**Abbildung 22 CD123 Median der CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter verschiedenen Stimulanzen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der CD123 Mean Wert der B-Zellen. Daten repräsentieren den Median ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001, Referenzwert Medium

Nach dreitägiger Inkubation der B-Zellen mit CD40 Ligand + aHA oder aCD180 war der CD123 Median Wert gegenüber den Vergleichszellen in reinem Medium deutlich erhöht. Auch die Inkubation mit aCD40 + Fcy erzielte eine Steigerung des CD123 Median. Die Stimulation mit PWM oder CPG hingegen hat einen im Vergleich zu Medium reduzierten CD123 Median-Wert zur Folge.

Die Kultivierung der Zellen mit CSC oder F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM erzielte keine signifikante Veränderung der CD123 Expressionsdichte.

Unter Inkubation mit den verwendeten Stimulanzen verhalten sich der Prozentsatz CD123 positiver Zellen und der CD123-Median Wert weitestgehend gleichsinnig. Die Inkubation mit CPG für drei Tage senkt nicht nur wie oben beschrieben den prozentualen Anteil CD123 positiver B-Zellen, sondern senkt bei diesen zudem die IL-3-Rezeptordichte der Zellen.

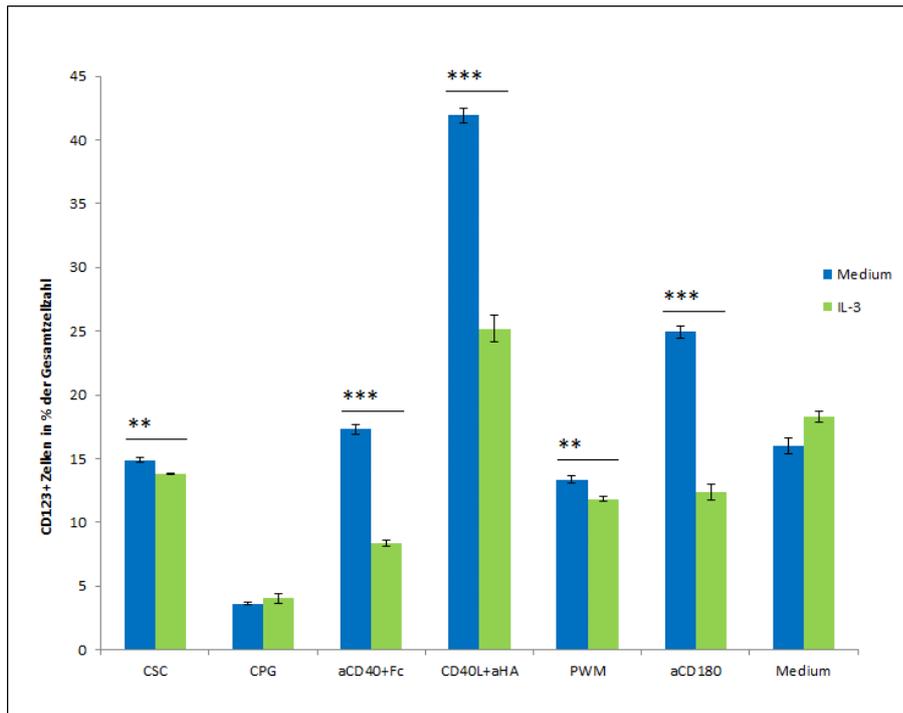
Bei Stimulation mit CD40 Ligand oder anti-CD180 stiegen sowohl der prozentuale Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen als auch der CD123-Median hochsignifikant an. In abgeschwächter Form trifft diese Beobachtung ebenfalls für anti-CD40 zu. (siehe Abbildung 21, Abbildung 22)

### *3.2.2.2 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die CD123-Expression von B-Zellen*

Um genauere Erkenntnisse über die Regulation des IL-3 Rezeptors auf B-Lymphozyten zu gewinnen, wurde untersucht, ob die Zugabe von IL-3 zu isolierten B-Zellen eine Auswirkung auf die Expression der IL-3R $\alpha$ -Kette hat.

Zu diesem Zweck wurden B-Zellen mit CSC, CPG, Goat F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, PWM, anti-CD180 mit und ohne IL-3 kultiviert. Als Vergleichswert für die alleinig mit IL-3 stimulierten B-Zellen dienten Zellen in reinem Medium, für die mit IL-3 und anderen Stimulanzen kultivierten Zellen die Zellen mit dem entsprechenden Stimulanz ohne IL-3.

Nach drei Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD123 untersucht.



**Abbildung 23 Expression von CD123 auf B-Zellen unter Inkubation mit verschiedenen Stimulanzen**

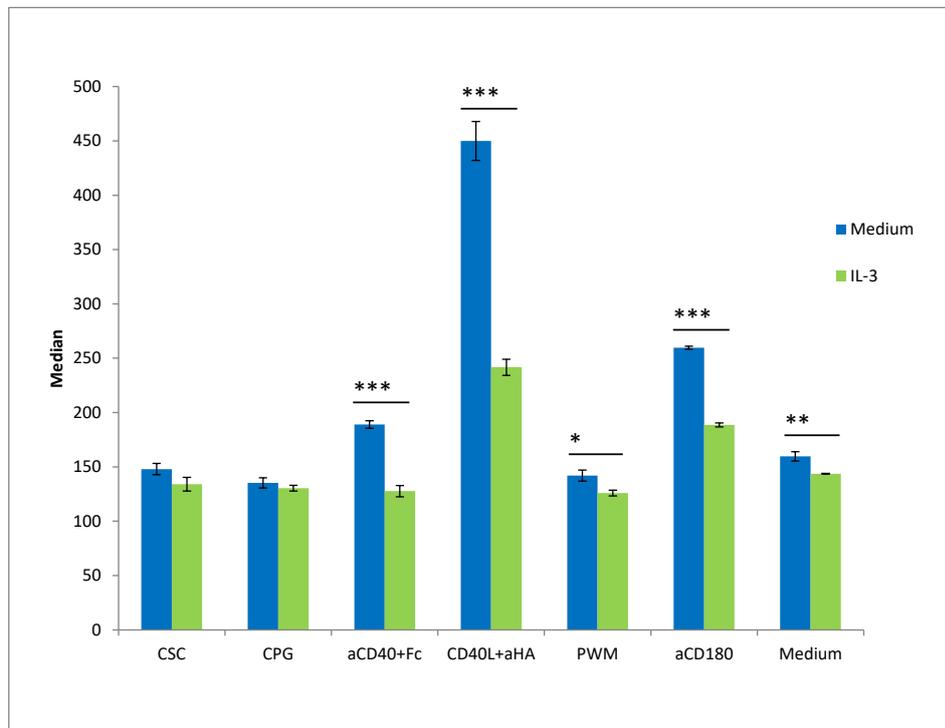
Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123+ Zellen an der Gesamtzellzahl. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Die Inkubation von B-Zellen mit anti-CD40 + Fc, CD40L + aHA oder aCD180 allein steigerte nach drei Tagen den Anteil IL-3-Rezeptor-positiver Zellen im Vergleich zu Medium, während CPG ihn senkte.

Die zusätzliche Zugabe von IL-3 zu CSC, anti-CD40 + Fc, CD40L + aHA, PWM oder aCD180 führte nach dreitägiger Inkubation zu einem niedrigeren Prozentsatz CD123+ Zellen als ohne die Beimischung des Interleukins.

IL-3 senkte bei Zugabe zu allen verwendeten Stimulanzen außer CPG den prozentualen Anteil CD123+ Zellen unter den B-Zellen. Interleukin-3 hat folglich eine hemmende Tendenz auf die Ausprägung seines Rezeptors auf B-Lymphozyten. Die Stimulation der B-Lymphozyten mit CPG hat eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung CD123+ B-Zellen. Der Anteil CD123+ Zellen unter den B-Zellen war demzufolge bei Stimulation mit CPG so gering, dass es nicht möglich war, eine eindeutige Aussage über die Auswirkung einer Addition von IL-3 zu CPG zu treffen. (siehe Abbildung 23)

Es wurde erneut der CD123-Medianwert der lebenden CD123<sup>+</sup> B-Zellen nach dreitägiger Kultivierung gemessen.



**Abbildung 24 CD123 Median der CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter verschiedenen Stimulanzen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml), Anti-CD180 (10µg/ml) und IL-3 (20ng/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der CD123 Median Wert der B-Zellen. Daten repräsentieren den Median ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001, Referenzwert Medium.

Wurde IL-3 zu den mit anti-CD40 + Fc, CD40L + aHA, PWM oder aCD180 stimulierten Zellen addiert, sank der CD123 Median der B-Zellen gegenüber den ohne Interleukin inkubierten Vergleichszellen signifikant ab. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei anti-CD40+Fc, CD40L + aHA und anti-CD180. Die Zugabe von IL-3 zu mit CSC und CPG stimulierten B-Zellen resultierte ebenfalls in einem tendenziell niedrigeren CD123 Median der CD19<sup>+</sup> Zellen.

Auch bei alleiniger Stimulation der B-Zellen mit IL-3 über drei Tage wurde eine geringere CD123 Expressionsdichte gemessen als bei den in Medium inkubierten Vergleichszellen. (siehe Abbildung 24)

Die B-Zellstimulanzen CD40L + aHA und anti-CD180 waren unter den von uns verwendeten Substanzen die stärksten Stimulatoren der CD123-Ausbildung auf B-Zellen.

Die Stimulation von humanen B-Zellen mit Interleukin-3 hingegen führt zu einem deutlich geringeren Anteil CD123+ Zellen und einer geringeren Expressionsdichte des IL-3-Rezeptors auf den B-Zellen. Die Stärke der Ausprägung des hemmenden Effektes von Interleukin-3 ist abhängig von den verwendeten Kostimulanzen. Besonders deutlich ist dieser Effekt von IL-3 bei Addition zu CD40L + aHA und anti-CD180 zu beobachten. (siehe Abbildung 23, Abbildung 24)

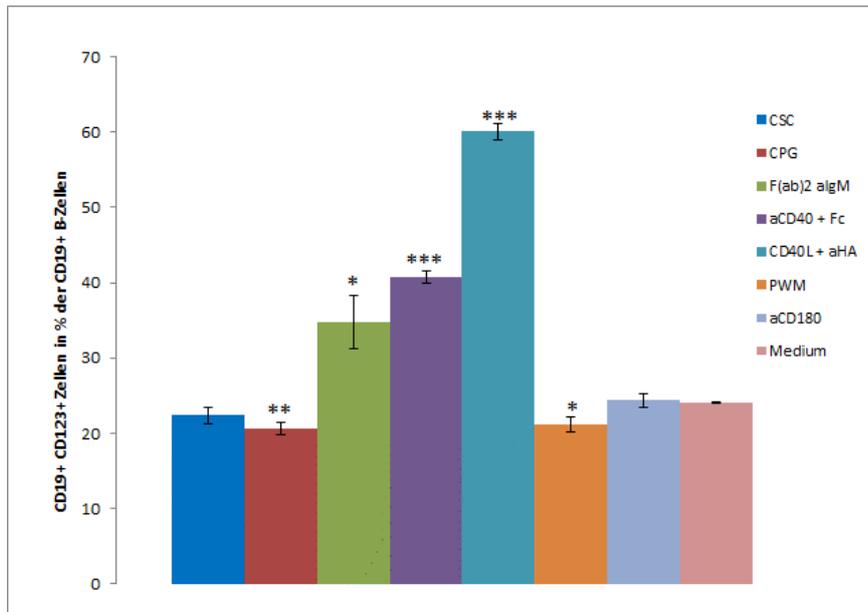
### *3.2.2.3 CD123-Expression auf B-Zellen unter Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen*

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der proliferationsstimulierende Effekt von IL-3 auf B-Zellen auch noch additiv in Anwesenheit der IL-3 Produktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen besteht (siehe 3.1.1.4). Bisher war jedoch unklar, ob eine Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen Einfluss auf die Expression des IL-3-Rezeptors auf B-Zellen nimmt.

Um Einblicke in die Auswirkung einer solchen Kostimulation auf den IL-3-Rezeptor der B-Lymphozyten zu gewinnen, wurden aufgereinigte B-Zellen (100.000/well) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (50.000/well) gemeinsam auf eine 96-Loch Rundbodenplatte aufgetragen. Zur Aktivierung der T-Zellen wurde lösliches anti-CD3 hinzugefügt.

Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Stimulanzen versetzt: CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und Anti-CD180. Zum Vergleich dienten Zellen, die in reinem Medium inkubiert wurden.

Die Auswertung erfolgte nach drei Tagen Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 25 Expression von CD123 auf B-Zellen unter Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Aus dem peripheren Blut gesunder Spender aufgereinigte humane B-Lymphozyten (100.000/ well) und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (50.000/well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte mit löslichem anti-CD3 (5µg/ml) für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur B-Zellstimulation wurden folgende Substanzen verwendet: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcy (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123<sup>+</sup> B-Zellen an der Gesamtzellzahl der CD19<sup>+</sup> Zellen. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001, Referenzwert Medium

Unter Stimulation mit aCD40 + Fc und CD40 Ligand + aHA konnte eine hochsignifikante Steigerung des Anteils CD123<sup>+</sup> B-Lymphozyten beobachtet werden.

Wurden die Zellen mit PWM oder CPG kultiviert, sank der prozentuale Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu den Zellen in Medium ab.

Bei CSC und aCD180 zeigte sich bei Kostimulation der B-Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen kein eindeutiger Effekt auf die Expression von CD123 (siehe Abbildung 25).

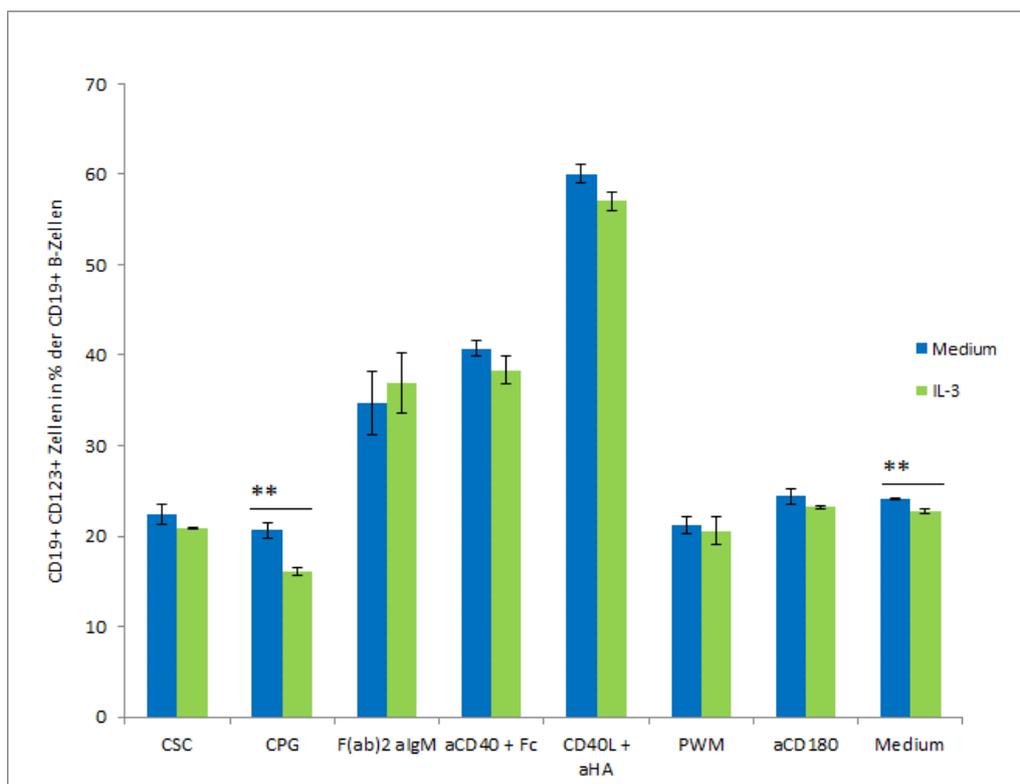
Frühere Versuche hatten gezeigt, dass die Inkubation reiner B-Zellen mit CPG und F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM für drei Tage zu einer Verringerung der Prozentzahl lebender CD123<sup>+</sup> Zellen führt, während eine Inkubation mit aCD40 + Fc, CD40 Ligand + aHA und aCD180 diesen Prozentsatz erhöht. Eine Kostimulation von B-Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei ansonsten gleichem Versuchsaufbau ergab ebenfalls einen verringerten Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen bei Stimulation mit CPG und einen erhöhten Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen bei Stimulation mit anti-CD40 und CD40 Ligand.

Die bei Kostimulation von B-Zellen mit T-Zellen beobachtete signifikante Hemmung der IL-3-Rezeptorexpression auf den B-Zellen unter Stimulation mit PWM konnte in

Abwesenheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur als leichter Trend beobachtet werden. (siehe Abbildung 21 und Abbildung 25)

Während einige kleinere Unterschiede in der Auswirkung der Stimulanzen auf den Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verzeichnen sind, bleiben die Hauptbeobachtungen bei beiden Versuchsansätzen gleich: Eine starke Steigerung der Zahl IL-3-rezeptorexprimierender Zellen kann durch Stimulation mit aCD40 + Fc oder CD40 Ligand + aHA erreicht werden, während CPG die Rezeptorexpression effektiv hemmt. (siehe Abbildung 23, Abbildung 25)

Analog zum oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde auch untersucht, ob die gemeinsame Inkubation von CD19<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> mit verschiedenen Stimulanzen und IL-3 die Wirkung der Interleukinaddition auf die Expression von CD123 auf B-Zellen beeinflusst.



**Abbildung 26 Expression von CD123 auf B-Zellen unter Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Aus dem peripheren Blut gesunder Spender aufgereinigte humane B-Lymphozyten (100.000/ well) und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (50.000/well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte mit löslichem anti-CD3 (5µg/ml) für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur B-Zellstimulation wurden folgende Substanzen mit und ohne IL-3 (20ng/ml) verwendet: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123<sup>+</sup> B-Zellen an der Gesamtzellzahl der CD19<sup>+</sup> Zellen. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

B-Zellen, die gemeinsam mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Zugabe von IL-3 für drei Tage inkubiert wurden, wiesen einen gegenüber den Vergleichszellen in Medium ohne IL-3 reduzierten Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen auf.

Durch die zusätzliche Addition von IL-3 zu mit CPG inkubierten B- und T-Zellen sank der Prozentsatz an CD123<sup>+</sup> B-Zellen signifikant ab. Ein gleichsinniger Trend konnte auch bei der Zugabe von IL-3 zu CSC, aCD40 + Fc, CD40L + aHA oder aCD180 beobachtet werden. (siehe Abbildung 26)

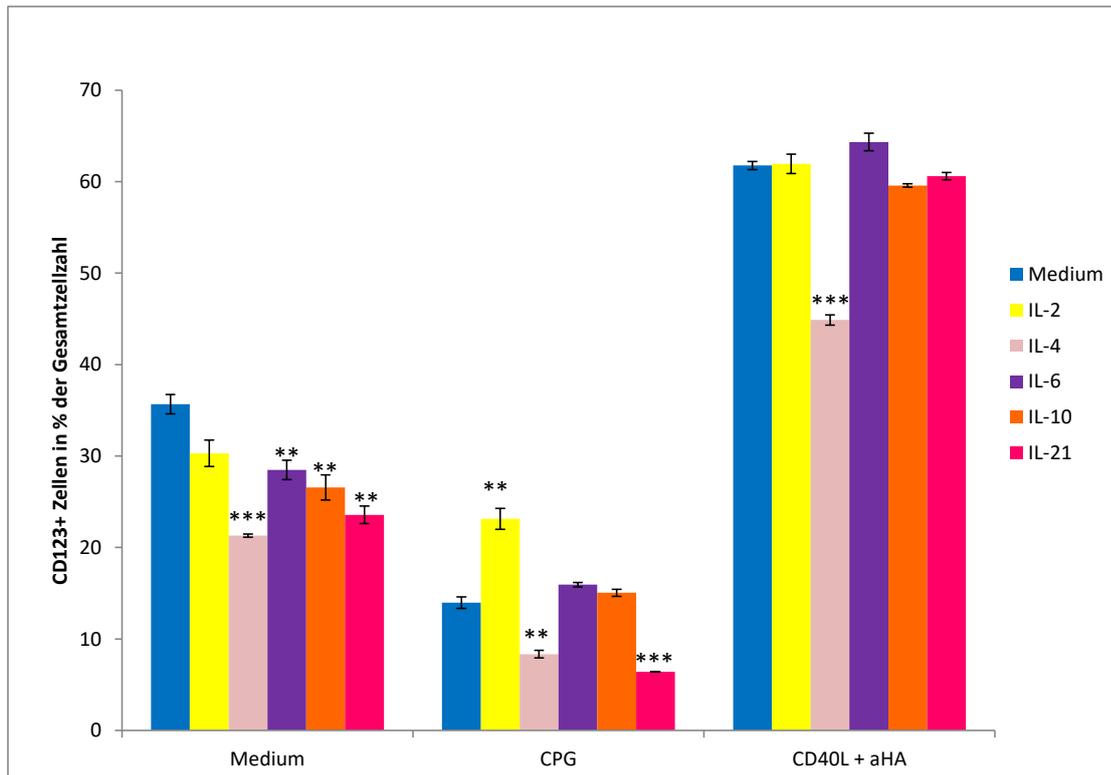
#### *3.2.2.4 CD123-Expression auf B-Zellen unter Stimulation mit verschiedenen Interleukinen*

Neben den oben beschriebenen artifiziellen B-Zell-Stimulationswegen wurde auch die Wirkung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-21 auf den Interleukin-3-Rezeptor der B-Lymphozyten untersucht.

Die Interleukine 2, 4 und 6 wurden als klassische Vertreter entzündungsfördernder Zytokine gewählt, während bei Interleukin-10 und 21 die antiinflammatorischen Wirkungen dominieren.

Um erste Eindrücke der Wirkung der Interleukine auf den IL-3-Rezeptor auf B-Zellen zu gewinnen, wurden aufgereinigte B-Zellen in reinem Medium bzw. Medium mit CPG oder CD40 Ligand + aHA auf 96-Loch Rundbodenplatten ausplattiert. Die Zellen wurden im Anschluss mit IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 oder IL-21 versetzt, als Vergleich dienten Zellen in Medium ohne Interleukine.

Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen auf die Expression von CD123 untersucht.



**Abbildung 27 Expression von CD123 auf B-Zellen unter Stimulation mit verschiedenen Interleukinen**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen kultiviert: CPG (1nM), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), IL-2 (10ng/ml), IL-4 (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml), IL-10 (10ng/ml) und IL-21 (10ng/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123<sup>+</sup> B-Zellen an der CD19<sup>+</sup> Gesamtzellzahl. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001 gegenüber CPG, CD40 Ligand + aHA oder Medium ohne Interleukine

Durch Stimulation von B-Zellen mit CPG allein sank der Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen, während er unter CD40L + aHA anstieg.

Die Addition von Interleukin-4 zu Medium, CPG und CD40L + aHA resultierte in einer reduzierten CD123<sup>+</sup> Prozentzahl. Besonders deutlich war dieser Effekt bei CD40L zu beobachten.

Interleukin-21 hemmte sowohl allein als auch in Kombination mit CPG die Ausprägung des IL-3-Rezeptors auf B-Zellen, während die Kombination mit CD40L + aHA keine Veränderung gegenüber CD40L + aHA allein zeigte.

In Verbindung mit CPG zeigte Interleukin-2 eine deutlich stimulierende Wirkung auf die CD123-Expression der B-Zellen. Wurde CPG durch CD40L + aHA ersetzt oder durch reines Medium ausgetauscht, konnte dieser Effekt von IL-2 nicht nachgewiesen werden.

Die Stimulation von B-Lymphozyten mit IL-6 oder IL-10 allein resultierte in einem niedrigeren Anteil an CD123<sup>+</sup> Zellen. Die Kombination mit CD40L oder CPG hingegen zeigte keine eindeutige Wirkung der Addition von IL-6 oder IL-10 auf den Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen an den B-Zellen. (siehe Abbildung 27)

Sowohl IL-4 als auch IL-21 wirken hemmend auf die Zahl der CD123<sup>+</sup> B-Lymphozyten. Dabei ist der Effekt von IL-4 deutlicher und konstant bei beiden Stimulanzen und Medium zu beobachten.

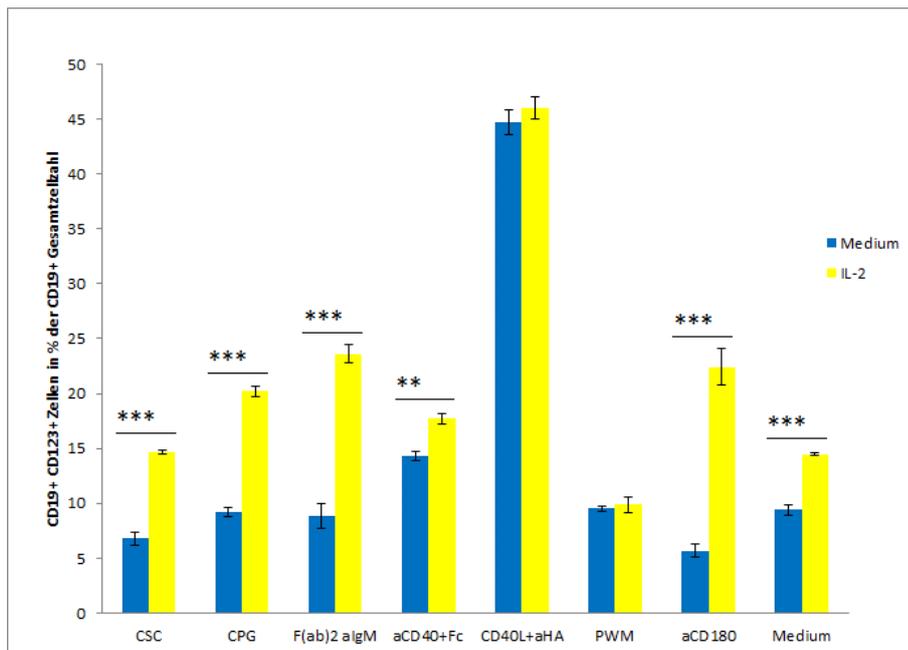
Interleukin-2 zeigte in Kombination mit CPG eine deutliche Stimulation der Expression von CD123. Bei CPG und Medium hingegen konnte keine signifikante Stimulation beobachtet werden.

#### *3.2.2.5 CD123-Expression auf B-Zellen unter Stimulation mit Interleukin-2 und Interleukin-4 und Co-Stimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen*

Der Übersichtsversuch hatte IL-2 und IL-4 als Zytokine mit potenzieller Auswirkung auf CD123 auf B-Zellen identifiziert. Um die Effekte genauer einzugrenzen wurde ein erneuter Versuch der B-Zellstimulation mit IL-2 oder IL-4 unter Verwendung verschiedener Stimulanzen durchgeführt.

Aufgereinigte B-Zellen wurden gemeinsam mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Medium mit verschiedenen Stimulanzen versetzt: CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, Anti-CD40 + goat anti-mouse Fcy, CD40 Ligand + anti-HA Peptid, PWM und anti-CD180. Die Hälfte der Wells wurde zudem mit IL-2 versetzt. Zur Stimulation der T-Zellen wurde allen Wells aCD3 und aCD28 zugegeben.

Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 28 Expression von CD123 auf B-Zellen bei Kostimulation mit T-Zellen und IL-2**

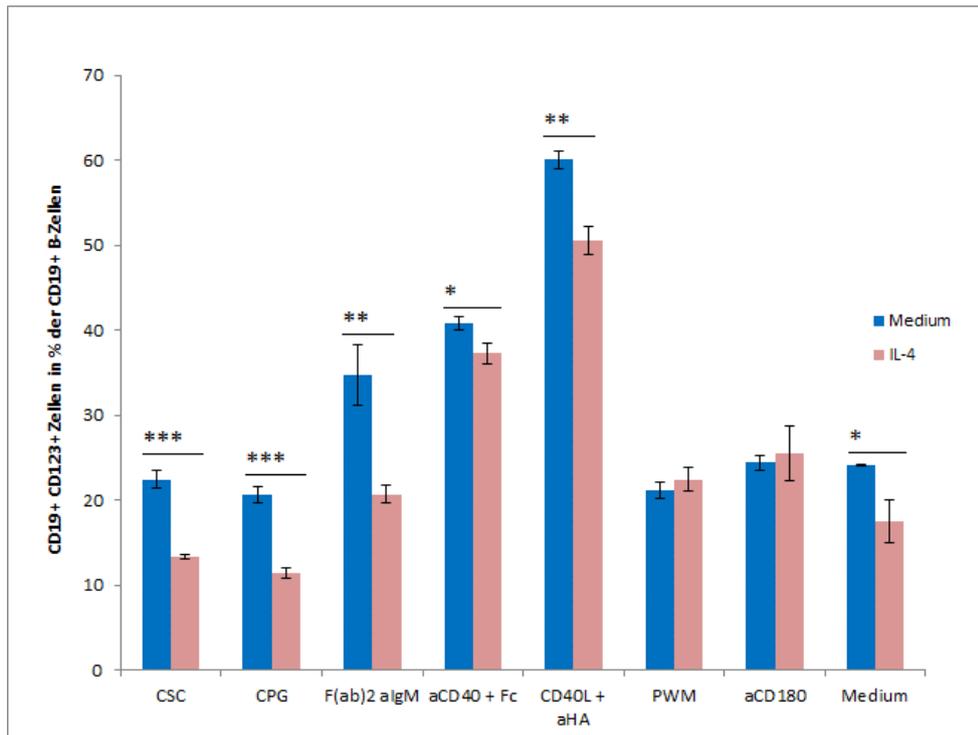
Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen mit und ohne IL-2 (20ng/ml) kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123<sup>+</sup> B-Zellen an der CD19<sup>+</sup> Gesamtzellzahl. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Im Vergleich zu reinem Medium zeigten die mit IL-2 allein stimulierten B-Zellen eine deutlich höhere Zahl IL-3-Rezeptor positiver Zellen.

Die Zugabe von IL-2 zu CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM oder aCD180 führte ebenfalls zu hochsignifikant höheren Anteilen an CD123<sup>+</sup> B-Zellen als ohne Kostimulation mit dem Interleukin. Auch bei aCD40 + Fc konnte eine solche Steigerung durch IL-2 beobachtet werden.

Unter Stimulation mit CD40 Ligand allein zeigte sich eine starke Erhöhung des Anteils CD123<sup>+</sup> Zellen an den B-Lymphozyten. Die zusätzliche Addition von IL-2 konnte keine weitere Stimulation erzielen. (siehe Abbildung 28)

Der gleiche Versuch wurde unter identischen Bedingungen auch mit Interleukin-4 anstelle von Interleukin-2 durchgeführt.



**Abbildung 29 Expression von CD123 auf B-Zellen bei Kostimulation mit T-Zellen und IL-4**

Aus dem peripheren Blut aufgereinigte humane B-Lymphozyten (300.000/ well) wurden in Triplets auf einer 96-Loch-Platte für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit folgenden Stimulanzen mit und ohne IL-4 (20ng/ml) kultiviert: CSC (200µg/ml), CPG (1nM), Goat F(ab)<sub>2</sub> Fragment anti-human IgM (10µg/ml), Anti-CD40 5µg/ml + goat anti-mouse Fcγ (10µg/ml), CD40 Ligand (20ng/ml) + anti-HA Peptid (1µg/ml), PWM (10µg/ml) und Anti-CD180 (10µg/ml). Bei Versuchsende wurden die Zellen mit anti-CD19 und anti-CD123 bzw. dessen Isotyp gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD123<sup>+</sup> B-Zellen an der CD19<sup>+</sup> Gesamtzellzahl. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM. Signifikanzniveau: \* = 0,05-0,01, \*\* = 0,01-0,001, \*\*\* < 0,001

Die alleinige Zugabe von CD40 Ligand + aHA und anti-CD40 + Fc zu den B-Zellen bewirkte nach drei Tagen eine deutliche Steigerung des Anteils CD123<sup>+</sup> Zellen. Unter Stimulation mit IL-4 allein hingegen sank der Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu in Medium inkubierten Zellen leicht ab.

Die Addition von Interleukin-4 zu CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, aCD40 + Fc, oder CD 40L + aHA hemmte analog zum vorher durchgeführten Übersichtsversuch (siehe Abbildung 27) die Ausbildung von CD123<sup>+</sup> B-Zellen nach drei Tagen Inkubation, gegenüber den Vergleichszellen mit o.g. Stimulanzen ohne IL-4. Besonders deutlich zeigte sich diese Wirkung von IL-4 in Kombination mit CSC und CPG. Die Addition von IL-4 zu PWM oder aCD180 hatte keine eindeutige Wirkung auf die Ausbildung des IL-3-Rezeptors. (siehe Abbildung 29)

Während Interleukin-2 alleine und in Kombination mit vielen B-Zell-Stimulanzen die Ausbildung des IL-3 Rezeptors der CD19<sup>+</sup> Zellen stark fördert, hat Interleukin-4 alleine und in Kombination mit vielen Stimulanzen eine deutlich hemmende Wirkung auf den

prozentualen Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen unter den B-Zellen. (siehe Abbildung 28, Abbildung 29)

## 4. Diskussion

### 4.1 Wirkung von Interleukin-3 auf B-Zellen

#### 4.1.1 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Proliferation von B-Zellen

##### 4.1.1.1 *Proliferation unter Stimulation mit bekannten B-Zellstimulanzen*

Um zunächst den optimalen Zeitpunkt zur Auswertung der B-Zell-Proliferation unter verschiedenen Stimulanzen zu identifizieren, wurde die Proliferationsrate nach zwei, drei, sechs und sieben Tagen Inkubation mit den Stimulanzen CSC, CPG und IL-3 ermittelt. Während an Tag 2 kaum Proliferation gemessen werden konnte, ergaben Tag 3 und 7 vergleichbar niedrige Proliferationsraten der B-Zellen unter Stimulation. An Tag 6 konnte unter Stimulation die meiste Proliferation und die größten Effekte von IL-3 beobachtet werden. Damit wurde Tag 6 als optimaler Zeitpunkt zur Auswertung der IL-3-Wirkung auf die B-Zellproliferation identifiziert. (siehe 3.1.1.1)

Um die Proliferation humaner B-Zellen aus peripherem Blut zu steigern wurden als Stimulanzen CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, PWM, CD40 Ligand + aHA, anti-CD40 und anti-CD180 verwendet. Für die verwendeten Substanzen ist bereits eine B-Zell stimulierende Wirkung in der Literatur beschrieben:

CSC (Chondroitin-6-Sulfat) ist ein Glykosaminoglykan, das an das Kernprotein eines Proteoglykans gebunden in Entzündungsherden sezerniert wird. Von den beiden verwandten Glykosaminoglykanen CSA und CSB ist bereits seit längerem eine stimulierende Wirkung auf Monozyten (CSA) bzw. B-Zellen (CSB) bekannt [89]. Neuere Experimente konnten auch eine proliferationssteigernde Wirkung von CSC auf murine Milz-B-Lymphozyten nachweisen [90].

Wir konnten eine leichte Proliferationssteigerung reifer humaner B-Zellen unter Stimulation mit CSC für 6 Tage beobachten (siehe 3.1.1.2).

Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr exprimieren Toll-Like-Rezeptoren (TLR), die Pathogene anhand bestimmter molekularer Muster erkennen. Ein solches Muster stellen CPG-reiche bakterielle DNA-Sequenzen dar. Dabei bindet CPG (Cytosin-Phosphat-Guanin) an den TLR9, der unter anderem auf humanen und murinen B-Zellen exprimiert wird [91,92]. Die Stimulation aufgereinigter humaner B-Zellen aus peripherem Blut mit einer CPG-Dinukleotidreichen DNA steigert die B-Zell-

Proliferation und IL-6-Ausschüttung [93]. Darüber hinaus steigert CPG die Ausdifferenzierung von B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen [94].

Wir konnten die proliferationsstimulierende Wirkung von CPG auf B-Zellen des peripheren Blutes nach 6-tägiger Inkubation bestätigen (siehe 3.1.1.2).

Pokeweed Mitogen ist ein B- und T-Zellaktivator, der aus der Pflanze *Phytolacca americana* gewonnen wird. Neben einer Stimulation der Zellteilung der B-Zellen steigert PWM auch die Antikörperproduktion der B-Zellen [95–97].

Die Inkubation von reinen B-Zellen mit PWM führte in unseren Versuchen zu einer geringen Steigerung der B-Zellproliferation (siehe 3.1.1.2). In Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen hingegen fiel der proliferationssteigernde Effekt von PWM auf B-Zellen deutlich stärker aus (siehe 3.1.1.4).

Aktivierte T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche vorübergehend CD40 Ligand. Dieser Ligand interagiert mit dem Rezeptor CD40 auf der Oberfläche der B-Zelle und stellt ein wichtiges Signal für die T-zellabhängige Aktivierung der B-Zelle dar [98]. Die Inkubation von humanen B-Zellen aus Tonsillen mit CD40 Ligand exprimierenden Zellen stimuliert die Proliferation und in Gegenwart von IL-4 darüber hinaus die Freisetzung von IgE aus den B-Lymphozyten [99,100]. Quervernetzte monoklonale Antikörper gegen humanes CD40 (anti-CD40 + Fc) stimulieren in Anwesenheit von IL-4 ebenfalls die Proliferation [101] und die IgE Produktion von B-Lymphozyten [102,103].

Unsere Experimente zeigten eine starke Steigerung der Proliferation von humanen B-Zellen aus peripherem Blut bei Inkubation mit über anti-Hämagglutinin gebundenem CD40 Ligand (siehe 3.1.1.2). Die Wirkung von anti-CD40 auf die Zellproliferation fiel geringer aus, zeigte aber dennoch - auch in Abwesenheit von IL-4 - eine signifikante Stimulation der Proliferationsrate. Zur Quervernetzung der Antikörper wurde Fc<sub>γ</sub> hinzugefügt, da die Inkubation ruhender B-Zellen mit löslichem anti-CD40 ineffektiv ist [104]. (siehe 3.1.1.2)

CD180 ist ein Oberflächenmolekül auf antigenpräsentierenden Zellen, homolog zum TLR4. Die Injektion von anti-CD180-Molekülen in lebende Mäuse resultiert in einer starken Proliferation und Ausdifferenzierung naiver B-Zellen mit konsekutiv gesteigerter Produktion von Antikörpern [105]. In vitro kann eine

Proliferationsstimulation von humanen B-Zellen aus peripherem Blut durch Stimulation mit anti-CD180 erzielt werden [106].

Auch in unseren Experimenten zeigte sich sowohl nach 3- als auch nach 6-tägiger Inkubation der B-Zellen mit anti-CD180 eine stark gesteigerte Proliferation (siehe 3.1.1.2).

Die Inkubation ruhender B-Zellen mit Antikörpern gegen auf ihrer Zelloberfläche exprimierte IgM-Moleküle bewirkt einen Progress der Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus in die G<sub>1</sub>-Phase sowie in höheren Konzentrationen (10µg/ml) einen Eintritt in die S-Phase mit konsekutiver Zellteilung [107,108].

Wir inkubierten B-Zellen aus peripherem Blut mit F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM in einer Konzentration von 10µg/ml. Dabei konnten wir nach sechs Tagen eine leichte Steigerung der Proliferation der B-Zellen beobachten. (siehe 3.1.1.2)

In unseren Versuchen zeigten sich CPG, CD40L + aHA und anti-CD180 als besonders effektive Stimulanzen der Proliferation reifer humaner B-Zellen. Darüber hinaus konnte auch die Inkubation der B-Lymphozyten mit CSC, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, aCD40 + Fc, und PWM eine geringe Proliferationssteigerung erzielen. Bei anti-CD40+Fc handelt es sich um einen aktivierenden Antikörper, der über den gleichen Signalweg wie CD40 Ligand eine B-Zellaktivierung bewirkt. Dennoch fällt die stimulierende Wirkung von anti-CD40 schwächer aus, was an einer inkompletten Rezeptoraktivierung bei Antikörperbindung liegen kann, da die meisten aktivierenden Antikörper nur eine eingeschränkt stimulierende Wirkung auf ihren Rezeptor besitzen.

#### *4.1.1.2 Proliferation unter Stimulation mit Interleukin-3*

In den letzten Jahrzehnten konnten einige Erkenntnisse über die Funktion von Interleukin-3 gewonnen werden. Das auch als multi-CSF bekannte Zytokin stimuliert unter anderem die Proliferation und Ausdifferenzierung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen [18–20]. Wir erforschten die Wirkung von Interleukin-3 auf unstimulierte, reife humane B-Zellen, die aus peripherem Blut gesunder Spender aufgereinigt wurden.

Untersuchungen aus den 1990er Jahren hatten bereits eine proliferationssteigernde Wirkung von IL-3 auf mit Staph. aureus aktivierte B-Zellen gezeigt, konnten jedoch keinen Effekt auf inaktive B-Zellen nachweisen [23].

Auch eine differenzierungsfördernde Wirkung von IL-3 auf mit Staph. aureus und IL-2 aktivierte B-Zellen aus peripherem Blut ist bereits bekannt. Tadmori et al beobachteten eine Steigerung der IgG Sekretion der aktivierten B-Zellen durch Stimulation mit IL-3. Werden statt der peripheren B-Zellen eine Zelllinie humaner Tonsillen-B-Zellen mit IL-3 stimuliert, zeigt sich eine dosisabhängige Steigerung der IgG-Sekretion auch in Abwesenheit von IL-2. Eine Steigerung der Zellproliferation konnte bisher hingegen nicht nachgewiesen werden [24].

Wir inkubierten aufgereinigte reife B-Zellen aus peripherem Blut ohne vorherige Aktivierung der Lymphozyten mit Interleukin-3 (20ng/ml) und ermittelten die Proliferation der B-Lymphozyten nach 3-10 Tagen. Dabei zeigte sich besonders an Tag 6 eine im Vergleich zu den in reinem Medium kultivierten B-Zellen deutlich gesteigerte Proliferationsrate (siehe 3.1.1.1). Damit konnte gezeigt werden, dass Interleukin-3 allein in der von uns verwendeten Konzentration die Proliferation von B-Zellen steigert.

Wir verwendeten in unseren Versuchen rekombinantes IL-3 der Firma BioLegend, das in Insektenzellen exprimiert wurde, während Xia et al. in E. coli exprimiertes rekombinantes IL-3 zur Stimulation der B-Zellproliferation verwendeten. Diese Unterschiede im verwendeten Interleukin-3 sind eine mögliche Erklärung, warum in der Literatur bisher keine Proliferation reifer unstimulierter B-Zellen unter Stimulation mit IL-3 beobachtet wurde [23].

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob die Kombination des Interleukins mit den oben beschriebenen B-Zell-Stimulanzen einen additiven Effekt von IL-3 auf die Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten erzielen kann.

Wurden die B-Zellen für 6 Tage mit der Kombination aus anti-CD40 + Fc und IL-3 stimuliert, konnte ebenfalls eine starke Steigerung des Anteils proliferierter B-Zellen beobachtet werden. Die Proliferationsrate der B-Zellen unter Stimulation mit anti-CD40 + Fc + IL-3 überstieg jedoch deutlich die Summe der Proliferationsraten unter IL-3 und anti-CD40 + Fc allein. Die zusätzliche Addition von IL-3 zu mit anti-CD40 + Fc stimulierten B-Zellen hat somit einen synergistischen Effekt auf die Zellproliferation. (siehe 3.1.1.2)

Neben anti-CD40 + Fc hatten wir CPG, CD40Ligand + aHA und anti-CD180 als effektive B-Zell-Proliferationsstimulanzen identifiziert. Wurden die beiden

Stimulanzen anti-CD180 und CPG jeweils in Kombination mit IL-3 zu den B-Zellen gegeben, zeigte sich ebenfalls ein synergistischer Effekt von IL-3 und CPG bzw. IL-3 und aCD180 auf den Anteil proliferierter B-Zellen. (siehe 3.1.1.2)

Während der synergistische Effekt auf den Anteil proliferierter CD19<sup>+</sup> B-Zellen von IL-3 bei aCD40 + Fc, CPG und anti-CD180 sehr stark ausgeprägt war, fiel er bei CD40Ligand + aHA vergleichsweise gering aus. Es ist denkbar, dass der Anteil proliferierter B-Zellen unter Inkubation mit CD40Ligand + aHA allein bereits so stark gesteigert wird, dass eine weitere Stimulation der Proliferation durch additives Interleukin-3 vergleichsweise gering ausfällt. (siehe 3.1.1.2)

Die von uns zuvor getesteten B-Zell-Stimulanzen CSC, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, und PWM hatten ebenfalls eine geringe bis mäßige Stimulation der B-Zellproliferation nach Inkubation für 6 Tage bewirkt. Die Zugabe von Interleukin-3 konnte auch bei diesen Stimulanzen eine weitere signifikante Proliferationssteigerung bewirken. (siehe 3.1.1.2)

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Interleukin-3 die Proliferation von unstimulierten, reifen humanen B-Zellen steigert und in Verbindung mit anderen bekannten B-Zellstimulanzen einen synergistischen Effekt auf die B-Zell-Proliferation hat. Die Stärke des synergistischen Effektes variiert jedoch zwischen den B-Zellstimulanzen.

#### 4.1.2 Die Wirkung von Interleukin-3 auf das Überleben reifer B-Zellen

In vitro wirkt Interleukin-3 bereits in geringen Konzentrationen antiapoptotisch auf aufgereinigte murine Milz-B-Lymphozyten. Darüber hinaus konnte bei MRL/lpr Mäusen, die über einen Zeitraum von 4 Wochen mit täglichen Injektionen von blockierenden anti-IL-3-Antikörpern behandelt wurden, eine gegenüber der mit einem Isotyp behandelten Kontrollgruppe reduzierte Zahl von B-Lymphozyten in der Milz nachgewiesen werden. [109]

Wir untersuchten deshalb, ob Interleukin-3 möglicherweise eine lebensverlängernde Wirkung auf aufgereinigte humane reife B-Lymphozyten hat. Dazu wurde der prozentuale Anteil lebender B-Lymphozyten nach 6 Tagen Kultur unter Inkubation mit verschiedenen B-Zellstimulanzen mit und ohne Addition von Interleukin-3 verglichen.

Vorhergehende Experimente haben bereits CPG, aCD40 + Fc, anti-CD180 und CD40Ligand + AHA als effektive Stimulanzen der B-Zellproliferation identifiziert (siehe

4.1.1.1 und 4.1.1.2). Bei eben diesen B-Zellstimulanzen konnte nach sechstägiger Inkubation eine deutlich höhere Rate lebender Zellen unter den nichtproliferierten B-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus steigerte besonders CD40Ligand + aHA den Anteil lebender Zellen auch bei den proliferierten CD19<sup>+</sup> B-Zellen nach 6 Tagen Kultur immens. (siehe 3.1.1.3)

Sowohl bei den nichtproliferierten als auch bei den proliferierten CD19<sup>+</sup> Zellen war der Anteil lebender Zellen unter Stimulation mit IL-3 allein gegenüber den Zellen in reinem Medium deutlich gesteigert. Die Addition von IL-3 zu allen von uns verwendeten B-Zellstimulanzen konnte einen höheren Anteil lebender Zellen unter proliferierten und nichtproliferierten B-Zellen bewirken. Dabei variierte die Stärke des Effekts von Interleukin zwischen den einzelnen B-Zellstimulanzen. (siehe 3.1.1.3)

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Interleukin-3 neben seiner proliferationsstimulierenden Wirkung auch eine antiapoptotische Wirkung auf reife humane B-Lymphozyten hat. Dabei wirkt IL-3 nicht nur auf die proliferierten CD19<sup>+</sup> Zellen, sondern auch auf die nicht proliferierten Zellen überlebensfördernd.

#### 4.1.3 Die Wirkung von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung reifer B-Zellen zu Memory-B-Zellen bzw. deren Proliferation

Neben seiner proliferationsfördernden Wirkung scheint Interleukin-3 auch die Ausdifferenzierung von B-Zellen zu beeinflussen. Tonsillen B-Zellen und B-Zellen aus peripherem Blut, die mit SAC aktiviert und anschließend mit IL-3 versetzt wurden, produzierten in Anwesenheit von IL-2 gesteigerte Level an IgG [23,24].

Wir untersuchten die Wirkung von IL-3 auf die Ausdifferenzierung peripherer B-Zellen anhand der Expression des Memory-B-Zellmarkers CD27 und des Plasmazellmarkers CD138.

Der Anteil CD138 positiver Zellen war in unseren Experimenten auch nach mehrtägiger Stimulation mit IL-3 zu gering, um eine Aussage über die Wirkung von IL-3 treffen zu können (siehe 3.1.2.2).

Memory-B-Zellen machen bei gesunden erwachsenen Menschen im Durchschnitt etwa 30% der peripheren B-Lymphozyten aus [110]. Dies entspricht in etwa dem von uns gemessenen prozentualen Anteil CD27<sup>+</sup> B-Zellen nach dreitägiger Stimulation. Nach 6 Tagen Inkubation mit den B-Zellstimulanzen und IL-3 lag der Anteil der

Memoryzellen bei ca. 40%, was in etwa der von Morbach et al. beobachteten 75% Perzentile ohne Stimulation entspricht.

Der prozentuale Anteil CD27<sup>+</sup> Zellen unter den B-Lymphozyten sank tendenziell durch die Zugabe von IL-3 ab. Die absolute Zahl der Memory-B-Zellen stieg jedoch durch die Addition von IL-3 zu den Stimulanzen an. (siehe 3.1.2.1).

Während Interleukin-3 die Ausdifferenzierung und Proliferation der CD27<sup>+</sup> Zellen zwar zu steigern scheint, steigt die Proliferation der CD27<sup>-</sup> Zellen durch Stimulation mit IL-3 deutlich stärker an. Dies führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der beiden Subtypen zugunsten der CD27<sup>-</sup> B-Zellen.

Die Stimulation der B-Zellen mit aCD40 + Fc und aCD180 steigerte sowohl die Absolutzahl CD27<sup>+</sup> Zellen, als auch deren Anteil an den CD19<sup>+</sup> Zellen (siehe 3.1.2.1). Anti-CD40+Fc und anti-CD180 steigern demnach die Ausdifferenzierung oder Proliferation von Memory-Zellen aus peripherem Blut.

## 4.2 Die Expression von CD123 auf reifen humanen B-Zellen

### 4.2.1 Die Expression von CD123 auf B-Zellen unter Stimulation

Der humane Rezeptor für Interleukin-3 gehört zur Familie des GM-CSF und IL-5-Rezeptors und teilt mit diesen eine gemeinsame  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta_c$ ). Durch seine  $\alpha$ -Untereinheit unterscheidet er sich von den anderen beiden Rezeptoren. Diese  $\alpha$ -Untereinheit, auch bezeichnet als CD123, ist für die Zytokinerkennung des Rezeptors zuständig und damit spezifisch für den IL-3-Rezeptor [55,56,67].

Über die Regulation des IL-3-Rezeptors und seiner Untereinheit CD123 auf B-Zellen ist wenig bekannt. Bisherige Studien zeigen nur einen geringen Anteil CD123<sup>+</sup>-Zellen unter peripheren B-Zellen. Unter den myeloiden Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) findet sich ein großer Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen, während normale lymphoide Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) kein CD123 exprimieren [111,112].

Fundiertere Erkenntnisse konnten jedoch bereits über die Expression von CD123 bei verschiedenen hämatologischen Malignomen gewonnen werden. Untersuchungen zur AML zeigen CD123<sup>+</sup> Zellen bei beinahe allen AML-Subtypen. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu normalen lymphatischen Vorläuferzellen bei allen untersuchten Proben von Patienten mit B-ALL eine hohe Expressionsrate von CD123 nachgewiesen werden, während T-ALL-Zellen durchwegs CD123 negativ waren.

Darüber hinaus wurde bei Patienten mit Haarzelleukämie und einigen aggressiven B-Zell-Lymphomen CD123 nachgewiesen [112,113].

Um die von uns beobachtete synergistische Wirkung von IL-3 mit anderen B-Zellstimulanzen besser zu ergründen, untersuchten wir die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-3-Rezeptors auf reife humane B-Zellen aus peripherem Blut. Dazu stimulierten wir die B-Zellen analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit verschiedenen Stimulanzen und analysierten die Expression von CD123 auf den B-Zellen nach drei Tagen im Vergleich zu den in Medium inkubierten Zellen. Der Zeitpunkt der Auswertung wurde gewählt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass die Hochregulation des Rezeptors bereits nach drei Tagen Inkubation ausgeprägt war.

Unsere Ergebnisse zeigten bei Stimulation mit anti-CD40 + Fc, CD40L + aHA und anti-CD180 nach dreitägiger Inkubation einen gegenüber den Vergleichszellen in Medium gesteigerten prozentualen Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen an den Gesamt-B-Zellen. Die Stimulation mit CSC und PWM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die CD123 Expression, während unter Stimulation mit CPG und F(ab)-anti-IgM der Anteil CD123<sup>+</sup>-B-Zellen zurückging.

Die deutlichste Steigerung des prozentuellen Anteils CD123<sup>+</sup> Zellen konnte unter Stimulation mit CD40 Ligand beobachtet werden. (siehe 3.2.2.1)

Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei B-Zell Vorläufern und hämatologischen Malignomen der B-Zell-Reihe gemacht. Bei BCP-ALL Zellen konnte eine Proliferationssteigerung durch Stimulation mit CD40L in Anwesenheit von IL-3 durch die Hochregulation des IL-3-Rezeptors unter CD40 Ligand gezeigt werden [114]. Bei normalen B-Zell-Vorläuferzellen steigerte die Anwesenheit von anti-CD40 die IL-3-Empfindlichkeit der Zellen deutlich, während IL-3 oder anti-CD40 allein keine BCP (B-Zell-Progenitor) Proliferation erzielen konnten [115,116].

Unsere Versuche konnten eine Hochregulation des IL-3 Rezeptors unter Stimulation mit CD40 Ligand + aHA auch bei reifen humanen B-Zellen nachweisen (siehe 3.2.2.1). Eine, wenn auch deutlich geringere, Stimulation der Rezeptorexpression konnte auch bei Inkubation der B-Zellen mit anti-CD40 + Fc erzielt werden. Da der aktivierende Antikörper anti-CD40 bei Bindung an CD40 auf B-Zellen nur eine begrenzte Rezeptoraktivierung bewirkte, war die Stimulation mit CD40L + aHA deutlich effektiver.

Neben CD40L erwies sich anti-CD180 als wirkungsvolles Stimulanz zur Steigerung der CD123-Expression auf peripheren B-Zellen. (siehe 3.2.2.1)

Eine Betrachtung des CD123-Medianwertes unter Stimulation zeigt bei CD40L + aHA und anti-CD180 eine höhere CD123-Expressionsdichte, während die IL-3-Rezeptordichte auf den mit CPG stimulierten Zellen sinkt (siehe 3.2.2.1)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Stimulation von peripheren B-Zellen mit CD40L + aHA oder anti-CD180 nicht nur den prozentualen Anteil CD123<sup>+</sup>-Zellen an den B-Zellen erhöht, sondern auch eine höhere Dichte an IL-3-Rezeptoren auf den Zellen zur Folge hat. Die Stimulation mit CPG oder F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM hingegen hat einen inversen Effekt mit geringerem Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen und bei Stimulation mit CPG geringerer Rezeptordichte.

#### 4.2.2 Die Auswirkung von Interleukin-3 auf die Expression seines Rezeptors

Wurde zusätzlich zu den Stimulanzen IL-3 zu den B-Zellen gegeben, lag der prozentuale Anteil CD123<sup>+</sup> Zellen an den B-Zellen bei CSC, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, aCD40 + Fc, CD40L + aHA, PWM und aCD180 unter den Vergleichszellen ohne IL-3. Lediglich die alleinige Stimulation mit IL-3 erzielte gegenüber reinem Medium keine Hemmung der CD123 Expression auf den B-Zellen. (siehe 3.2.2.2)

Die Hemmung der Ausprägung des IL-3-Rezeptors durch Interleukin-3 legt die Vermutung eines Feedbackmechanismus mit negativer Rückkopplung der Rezeptorexpression durch seinen Liganden IL-3 nahe. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei aCD40 + Fc, CD40L + aHA und aCD180 – also bei den Stimulanzen, die in unseren Experimenten alleine eine Steigerung der CD123 Expression der B-Zellen erzielt hatten (siehe 3.2.2.1). Der CD123-Medianwert der B-Zellen sank durch die Addition von IL-3 zu den B-Zellstimulanzen ab. Auch die Stimulation mit IL-3 allein hatte einen reduzierten CD123-Median gegenüber den in Medium kultivierten Vergleichszellen zur Folge (siehe 3.2.2.2).

Zusammenfassend führt die Addition von Interleukin-3 zu den von uns verwendeten B-Zell-Stimulanzen zu einer Verringerung des Anteils CD123<sup>+</sup> Zellen und einer geringeren IL-3-Rezeptordichte. Interleukin-3 beeinflusst die Expression der Untereinheit CD123 seines Rezeptors über eine negative Feedbackschleife.

#### 4.3 Einfluss der Kostimulation mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Wirkung von Interleukin-3

Da CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptproduzenten von IL-3 darstellen [10,46], untersuchten wir, inwiefern sich die Wirkung von externem IL-3 in Kombination mit anderen B-Zell-Stimulanzen in Gegenwart der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen verändert.

Die Addition von Interleukin-3 führte bei CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>-anti-IgM, CD40L + aHA und aCD180 zu einer Steigerung der Proliferation der B-Zellen. Bei aCD40 + Fc, PWM und Medium führte die Kombination mit IL-3 zu keiner signifikanten Proliferationssteigerung. (siehe 3.1.1.4 )

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse in ihrer Tendenz den Stimulationsversuchen mit reinen B-Zellen. Der synergistische Effekt von Interleukin-3 fiel dabei in Gegenwart der CD4<sup>+</sup>-Zellen schwächer aus als zuvor bei den reinen B-Zellen beobachtet, was sich möglicherweise durch die basale IL-3-Produktion der T-Zellen erklären lässt.

Die fehlende Proliferationssteigerung bei Stimulation der B-Zellen mit reinem Interleukin-3 könnte ebenfalls durch die basale IL-3 Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verursacht sein. Der von den T-Helfer-Zellen produzierte basale IL-3 Spiegel reicht möglicherweise bereits für eine Stimulation der B-Zellen aus, sodass zugefügtes IL-3 allein keine wesentliche Steigerung mehr erzielen kann.

Pokeweed Mitogen ist bekanntermaßen ein starker T-Zell-Aktivator [95,117]. Die Addition von IL-3 zu mit PWM stimulierten Zellen konnte im Gegensatz zu vorherigen Versuchen mit reinen B-Zellen in der gemischten Kultur von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen keine weitere Stimulation der B-Zellproliferation erzielen. (siehe 3.1.1.4 )

Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine starke T-Zellaktivierung durch PWM mit konsekutiv gesteigerter IL-3 Produktion der CD4<sup>+</sup> Zellen. Es ist denkbar, dass die unter Stimulation mit PWM erzielten IL-3-Spiegel bereits so hoch sind, dass die maximale stimulatorische Wirkung von IL-3 auf B-Zellen erreicht wird. Eine externe Addition von IL-3 könnte dann, wie von uns beobachtet, keine weitere Steigerung der B-Zellproliferation erzielen.

Betrachtet man die Ergebnisse der IL-3-Wirkung auf die CD123-Expression auf B-Zellen in Gegenwart CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, zeigt sich lediglich bei Medium und CPG eine signifikante Hemmung der CD123-Expression durch Zugabe von IL-3. Mit Ausnahme

von F(ab)-anti-IgM zeigt sich jedoch bei allen anderen Stimulanzen der gleiche Trend zur Verringerung des Anteils CD123<sup>+</sup> Zellen unter Kostimulation mit IL-3. (siehe 3.2.2.3)

Während sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der T-Zellen eine Hemmung der CD123-Expression auf den B-Zellen durch Interleukin-3 beobachtet werden konnte, waren die stimulierenden Effekte von IL-3 in Gegenwart von aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen etwas schwächer ausgeprägt. Eine denkbare Ursache für diese Beobachtung ist eine Maskierung der Wirkung des zugefügten IL-3 durch die basale IL-3-Produktion der T-Zellen. Darüber hinaus beeinflussen andere von CD4<sup>+</sup>-Zellen ausgeschüttete Interleukine möglicherweise die CD123-Expression der B-Zellen.

#### 4.4 Die Wirkung von Interleukin-2 und Interleukin-4 auf die Expression des Interleukin-3 Rezeptors humaner B-Zellen

##### 4.4.1 Interleukin-2

Das Zytokin Interleukin-2 wurde bereits in den 1970er Jahren durch seine in vitro effektiv T-Zell-stimulierenden Eigenschaften entdeckt [118–120].

Die Hauptproduzenten von IL-2 sind CD4<sup>+</sup> Zellen, wobei der Kontakt der T-Zelle mit einem Antigen den maßgeblichen Reiz zur Produktion und Ausschüttung des Interleukins darstellt [121]. Von IL-2 ist darüber hinaus eine proliferations- und differenzierungsfördernde Wirkung auf B-Zellen bekannt [122,123].

Wir inkubierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und reife B-Zellen gemeinsam in Medium mit verschiedenen B-Zellstimulanzen mit und ohne Zugabe von IL-2. Nach drei Tagen Inkubationszeit war der Anteil CD123 positiver B-Zellen bei den meisten B-Zellstimulanzen in der Zellkultur mit IL-2 deutlich höher als bei den Vergleichszellen ohne IL-2. Lediglich bei PWM und CD40L + aHA konnte durch die Addition von IL-2 keine zusätzliche Steigerung der IL-3-Rezeptorexpression erzielt werden. (siehe 3.2.2.5)

Wenngleich eine direkte Stimulation der IL-3-Rezeptorexpression der B-Zellen durch IL-2 denkbar ist, scheint eine indirekte Wirkung des Interleukins über Aktivierung der T-Zellen als wahrscheinlichste Ursache für die Steigerung der CD123-Expression der CD19<sup>+</sup> Zellen.

In vivo wird CD40 Ligand (CD154) auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert. Der Ligand interagiert mit dem CD40 Rezeptor auf B-Zellen und vermittelt so ein wichtiges Signal für die B-Zell-Aktivierung. In vitro wird diese T-Zell-abhängige B-Zellstimulation von quervernetztem CD40L imitiert. Die Tatsache, dass Interleukin-2 bei Addition zu CD40L + aHA keine weitere Steigerung der CD123-Expression der B-Zellen erzielen konnte spricht dafür, dass CD40L und IL-2 beide über einen ähnlichen Mechanismus die CD123-Expression auf B-Zellen steigern, nämlich über eine T-Zellabhängige B-Zellaktivierung. Anti-CD40+Fc wirkt über den gleichen Mechanismus stimulierend auf B-Zellen. Da der aktivierende Antikörper jedoch nur eine limitierte Stimulation der B-Zellen erzielt, konnte eine weitere Steigerung der CD123-Expression durch Kostimulation mit IL-2 erzielt werden.

Die Tatsache, dass die Zugabe von IL-2 zu mit PWM stimulierten Zellen keinen additiven Effekt auf die CD123-Expression der B-Zellen hatte, unterstützt die These einer CD4<sup>+</sup>-vermittelten IL-2 Wirkung, da PWM selbst ebenfalls ein starker T-Zellstimulator ist.

#### 4.4.2 Interleukin-4

Interleukin-4 kontrolliert die Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th2 Zellen [124]. Diese Untergruppe stellt auch die Hauptproduzenten von Interleukin-2 dar, was sie von den ebenfalls CD4 positiven Th1-Zellen unterscheidet [125]. Bei B-Lymphozyten steigert Interleukin-4 die Proliferation [126] und fördert den Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen hin zum IgG [127,128].

Analog zu dem Versuch zur Wirkung von IL-2 auf die CD123-Expression inkubierten wir CD4<sup>+</sup> T-Zellen und reife B-Zellen, die aus dem Blut gesunder Spender gewonnen wurden, gemeinsam in Medium mit verschiedenen B-Zellstimulanzen, mit und ohne Addition von IL-4. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen wurde der Anteil von CD123<sup>+</sup> B-Zellen an den gesamten B-Zellen gemessen.

Dabei zeigte sich bei den Zellen, die mit Interleukin-4 in Kombination mit CSC, CPG, F(ab)<sub>2</sub>anti-IgM, anti-CD40+Fc oder CD40 Ligand + aHA versetzt worden waren, ein geringerer Anteil CD123<sup>+</sup> B-Zellen als bei den Vergleichszellen, die mit dem jeweiligen Stimulans ohne IL-4 kultiviert worden waren. Auch die alleinige Stimulation mit IL-4 resultierte in einer Hemmung der CD123-Expression gegenüber den in Medium inkubierten Zellen. (siehe 3.2.2.5)

Diese Daten verdeutlichen, dass Interleukin-4 die Ausbildung des Interleukin-3-Rezeptors auf B-Lymphozyten hemmt.

#### 4.5 Die Wirkung von Interleukin-3 auf das von B-Zellen exprimierte Zytokinprofil

Interleukin-6 ist ein Zytokin, das pleiotrope Effekte auf die Hämatopoese und die Immunantwort des Menschen ausübt und von einer Vielzahl an Zellen produziert werden kann [129]. Zu seinen Wirkungen gehört die Stimulation der B-Zelldifferenzierung zu Antikörper produzierenden Zellen [130]. Interleukin-6 spielt unter anderem eine große Rolle für die systemische Inflammation. Es wird gemeinsam mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  in Entzündungsherden von Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten produziert und über die Zirkulation im Körper verteilt. In der Leber induziert dieses IL-6 die rasche Ausschüttung von Akute Phase Proteinen wie CRP und Fibrinogen und stellt damit ein „Warnsignal“ für den Körper dar [131,132].

Untersuchungen zur Sepsis an IL-3-KO-Mäusen hatten gezeigt, dass im Rahmen der Sepsis von B-Zellen produziertes IL-3 die Inflammation stark verstärkt. Zum einen induziert es die Hämatopoese, zum anderen potenziert es den Zytokinsturm von IL-6,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ . Auch bei Menschen waren hohe IL-3-Spiegel zu Beginn der Inflammation ein prognostisch ungünstiger Marker für das Überleben der Sepsis. [133]

Wir untersuchten, wie sich eine Stimulation reifer humaner B-Zellen mit IL-3 in Kombination mit anderen B-Zellstimulanzen auf die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 auswirkt.

In unseren vorhergehenden Versuchen hatten sich CPG, CD40L und aCD180 als wirkungsvolle Stimulanzen der B-Zellproliferation gezeigt. Die gleichen Stimulanzen steigerten auch die Sekretion von IL-6 durch B-Zellen am stärksten. Interleukin-3 konnte alleine bereits eine signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion der peripheren B-Zellen gegenüber den in Medium kultivierten Vergleichszellen erzielen. Ebenso stieg durch die Addition von IL-3 zu CPG,  $\text{F(ab)}_2$ -anti-IgM, anti-CD40+Fc, CD40L + aHA, und anti-CD180 die IL-6 Sekretion der B-Zellen gegenüber den Vergleichszellen mit den entsprechenden Stimulanzen ohne IL-3 deutlich an. Dieser Trend konnte auch bei IL-3 in Kombination mit CSC und PWM beobachtet werden. (siehe 3.1.3.1)

Bereits nach drei Tagen Stimulation mit IL-3 wurden stark erhöhte IL-6 Titer gemessen, während die B-Zellen zu diesem Zeitpunkt noch kaum proliferiert waren. Nach 6 Tagen Stimulation mit IL-3 waren die IL-6 Spiegel weitestgehend unverändert zu den nach drei Tagen gemessenen Werten. Dies spricht dafür, dass bereits zum ersten von uns gemessenen Zeitpunkt von drei Tagen maximale IL-6-Spiegel unter Stimulation mit IL-3 vorlagen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass IL-3 auch beim Menschen als ein early-proinflammatorisches Zytokin die Ausschüttung anderer proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6 induziert.

Interleukin-10 ist eines der wichtigsten Regulatoren der Immunantwort. Seine Hauptaufgabe besteht in der Eindämmung der Inflammation. Zu den Produzenten des Zytokins zählen eine Vielfalt an Zellen, unter anderem Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen. Ebenso breit ist das Wirkspektrum von Interleukin-10. Unter anderem hemmt IL-10 die Aktivierung und Funktion von APCs mit und mildert so die T-Zell-Immunantwort ab. Darüber hinaus hemmt es die Sekretion proinflammatorischer Zytokine [134,135]. Eine besondere Rolle spielt IL-10 in der Immunmodulation des Gastrointestinal Traktes. IL-10-KO Mäuse entwickelten wenige Wochen nach Geburt eine chronische Enterokolitis mit konsekutiver Entwicklungsretardierung und chronischer Anämie. [136]

Wir untersuchten, wie sich verschiedene B-Zellstimulanzen und IL-3 als proinflammatorisches Zytokin auf die IL-10-Sekretion reifer humaner B-Zellen auswirken.

Eine artifizielle Aktivierung des TLR9 auf B-Zellen über CPG-Oligodinucleotide stimuliert bekanntermaßen die IL-6 und IL-10-Sekretion von reifen humanen B-Zellen [137]. Auch in unseren Versuchen steigerte die Inkubation von B-Zellen mit CPG deren IL-10 Sekretion deutlich. (siehe 3.1.3.2)

Neben CPG stimulierte anti-CD180 effektiv die IL-10-Freisetzung der B-Zellen. Bisherige Untersuchungen konnten eine Steigerung der IL-10 Sekretion von B-Zellen nur durch Stimulation mit aCD180 in Kombination mit LPS oder CPG beobachten, während die alleinige Stimulation mit aCD180 die IL-10 Spiegel unbeeinflusst lies. [105]

Wurden die B-Zellen mit Interleukin-3 alleine stimuliert, waren die in den Zellüberständen gemessenen IL-10 Spiegel deutlich niedriger als bei den Vergleichszellen in Medium. Auch die Zugabe von IL-3 zu CSC, F(ab)-anti-IgM, PWM und anti-CD180 führte zu einer Hemmung der IL-10 Sekretion. (siehe 3.1.3.2)

Interleukin-3 stimuliert die Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-6 und hemmt zugleich die Freisetzung des antiinflammatorischen Interleukin-10 aus B-Lymphozyten. Damit spielt es eine potenziell wichtige Rolle in der Regulation der B-Zellantwort im Rahmen von Entzündungsreaktionen.

## 5. Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von Interleukin-3 auf humane B-Lymphozyten und die Regulation des Zytokinrezeptors auf den Zielzellen. Spezielles Augenmerk wurde dabei auf die Proliferation, Ausdifferenzierung und Interleukinproduktion der B-Zellen gelegt.

Wir bestimmten den optimalen Auswertungszeitpunkt der B-Zell-Proliferation nach sechstägiger Inkubation der B-Zellen mit verschiedenen Stimulanzen.

Als besonders effektive Stimulanzen der B-Zell-Proliferation konnten wir CPG, CD40L + aHA und anti-CD180 identifizieren. Die Kombination mit IL-3 konnte sowohl bei diesen Stimulanzen, als auch bei den verwendeten Substanzen CSC, F(ab) anti-IgM, anti-CD40 + Fc und PWM eine zusätzliche Steigerung der Proliferation erzielen. Besonders deutlich zeigte sich der synergistische Effekt von IL-3 in Kombination mit anti-CD40 + Fc, CPG und anti-CD180.

Wir konnten keinen eindeutigen Effekt von Interleukin-3 auf die Ausdifferenzierung von naiven B-Lymphozyten zu Memory-B-Zellen oder Plasmazellen nachweisen.

Untersuchungen der Expression von CD123 auf mit verschiedenen Substanzen inkubierten B-Zellen ergaben, dass die Stimulanzen CD40 Ligand + aHA und anti-CD180 neben einer Steigerung der B-Zell-Proliferation eine besonders effektive Stimulation der IL-3-Rezeptorexpression erzielen. Unter Stimulation mit CPG oder F(ab)-anti-IgM hingegen konnte ein reduzierter Anteil CD123 positiver Zellen beobachtet werden. Der kostimulatorische Effekt von IL-3 auf die B-Lymphozyten Proliferation fiel bei diesen Stimulanzen gering aus.

Auch Interleukin-2 steigert die Expression von CD123 auf B-Lymphozyten. Dabei wirkt IL-2 am ehesten indirekt über eine Aktivierung CD4+ T-Zellen. Interleukin-4 hingegen wirkt hemmend auf die Expression des IL-3-Rezeptors. Interleukin-3 selbst wirkt in Kombination mit den von uns untersuchten Stimulanzen hemmend auf die Expression seines eigenen Rezeptors im Sinne einer negativen Feedbackschleife.

Die beschriebenen Wirkungen von Interleukin-3 auf B-Lymphozyten zeigten sich in abgeschwächter Form auch in Anwesenheit von CD4+ Zellen. Da die T-Lymphozyten selbst einen basalen Interleukin-3-Spiegel produzieren ist es nicht verwunderlich, dass

die Wirkung des additiven IL-3 einen geringeren Effekt als bei Inkubation mit reinen B-Zellen erzielt.

Untersuchungen des von den B-Zellen exprimierten Zytokinprofils zeigten eine Steigerung der IL-6-Ausschüttung unter Stimulation mit IL-3, während die IL-10-Ausschüttung zurückging. Damit spielt Interleukin-3 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Regulation der B-Zellantwort bei Entzündungsreaktionen.

## 6. Quellenverzeichnis

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Oxford: Elsevier; 2014.
2. Ollila J, Vihinen M. B cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37:518–23.
3. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunology*. 7th ed.: Spektrum; 2009.
4. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112:1570–80.
5. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol*. 1992.
6. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*. 2012;30:221–41.
7. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334:395–402.
8. Attaf M, Legut M, Cole DK, Sewell AK. The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system. *Clinical and experimental immunology*. 2015;181:1–18.
9. Ihle JN, Pepersack L, Rebar L. Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1981;126:2184–89.
10. Schrader JW. The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annual review of immunology*. 1986;4:205–30.
11. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual review of biochemistry*. 1990;59:783–836.
12. Le Beau, M M, Epstein ND, O'Brien SJ, Nienhuis AW, Yang YC, Clark SC, et al. The interleukin 3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a deletion of 5q. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84:5913–17.

13. Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, et al. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*. 1986;47:3–10.
14. Bagley CJ, Phillips J, Cambareri B, Vadas MA, Lopez AF. A discontinuous eight-amino acid epitope in human interleukin-3 binds the alpha-chain of its receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:31922–28.
15. Kaushansky K, Shoemaker SG, Broudy VC, Lin NL, Matous JV, Alderman EM, et al. Structure-function relationships of interleukin-3. An analysis based on the function and binding characteristics of a series of interspecies chimera of gibbon and murine interleukin-3. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90:1879–88.
16. Feng Y, Klein BK, McWherter CA. Three-dimensional solution structure and backbone dynamics of a variant of human interleukin-3. *Journal of molecular biology*. 1996;259:524–41.
17. Klein BK, Feng Y, McWherter CA, Hood WF, Paik K, McKearn JP. The receptor binding site of human interleukin-3 defined by mutagenesis and molecular modeling. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:22630–41.
18. Pierce JH. Oncogenes, growth factors and hematopoietic cell transformation. *Biochimica et biophysica acta*. 1989;989:179–208.
19. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*. 1989;339:27–30.
20. Ihle JN. Interleukin-3 and hematopoiesis. *Chemical immunology*. 1992;51:65–106.
21. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 2000;19:2532–47.
22. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, et al. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*. 2009;114:1289–98.
23. Xia X, Li L, Choi YS. Human recombinant IL-3 is a growth factor for normal B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1992;148:491–97.
24. Tadmori W, Feingersh D, Clark SC, Choi YS. Human recombinant IL-3 stimulates B cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1989;142:1950–55.

25. Doria G, Leter G, Mancini C, Frasca D. Effect of recombinant IL-3 on lymphocyte populations in irradiated mice. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 1993;11 Suppl 2:93–97.
26. Bacon K, Gearing A, Camp R. Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6. *Cytokine*. 1990;2:100–05.
27. Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS, Newlands S, Korpelainen EI, Noack LM, et al. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood*. 1996;87:1432–38.
28. Onishi R, Ishikawa T, Kodaka T, Okuma M, Uchiyama T. Interleukin-3-induced downregulation of the expression of interleukin-2 receptor beta chain in human T cells. *Blood*. 1991;78:2908–17.
29. Mueller DL, Chen ZM, Schwartz RH, Gorman DM, Kennedy MK. Subset of CD4+ T cell clones expressing IL-3 receptor alpha-chains uses IL-3 as a cofactor in autocrine growth. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 1994;153:3014–27.
30. Cohen SB. IL-10 and IL-3 synergize to cause proliferation of human T cells. *Immunology*. 1995;85:351–56.
31. Breckpot K, Corthals J, Bonehill A, Michiels A, Tuybaerts S, Aerts C, et al. Dendritic cells differentiated in the presence of IFN- $\beta$  and IL-3 are potent inducers of an antigen-specific CD8+ T cell response. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78:898–908.
32. Ebner S, Hofer S, van Nguyen A, Furhapter C, Herold M, Fritsch P, et al. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2002;168:6199–207.
33. Buelens C, Bartholome EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, et al. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood*. 2002;99:993–98.
34. Frendl G, Beller DI. Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity. *J. Immunol*. 1990;144:3392–99.

35. Frenzl G, Fenton MJ, Beller DI. Regulation of macrophage activation by IL-3. II. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1990;144:3400–10.
36. Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, et al. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:13962–66.
37. Kurimoto Y, de Weck, A L, Dahinden CA. Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170:467–79.
38. Mayer P, Valent P, Schmidt G, Liehl E, Bettelheim P. The in vivo effects of recombinant human interleukin-3: demonstration of basophil differentiation factor, histamine-producing activity, and priming of GM-CSF-responsive progenitors in nonhuman primates. *Blood*. 1989;74:613–21.
39. Haak-Frendscho M, Arai N, Arai K, Baeza ML, Finn A, Kaplan AP. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 cause basophil histamine release. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82:17–20.
40. Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *International immunopharmacology*. 2005;5:735–47.
41. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nature immunology*. 2009;10:706–12.
42. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*. 1998;392:90–93.
43. Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E, et al. Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood*. 1989;73:1763–69.
44. Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, et al. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-

- stimulating factor activity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 1983;131:282–87.
45. Zheng X, Karsan A, Duronio V, Chu F, Walker DC, Bai TR, et al. Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. *Immunology*. 2002;107:306–15.
  46. Shen T, Kim S, Do J, Wang L, Lantz C, Urban JF, et al. T cell-derived IL-3 plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *International immunology*. 2008;20:1201–09.
  47. Ohmori K, Luo Y, Jia Y, Nishida J, Wang Z, Bunting KD, et al. IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2009;182:2835–41.
  48. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *The Journal of experimental medicine*. 1987;166:1229–44.
  49. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170:2081–95.
  50. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*. 1989;339:64–67.
  51. Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature*. 1989;339:150–52.
  52. Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2000;164:43–48.

53. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181:1373–80.
54. Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2009;182:2432–38.
55. Hara T, Miyajima A. Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *The EMBO journal*. 1992;11:1875–84.
56. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological reviews*. 2012;250:277–302.
57. Gorman DM, Itoh N, Kitamura T, Schreurs J, Yonehara S, Yahara I, et al. Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: identification of another member of the cytokine receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87:5459–63.
58. Itoh N, Yonehara S, Schreurs J, Gorman DM, Maruyama K, Ishii A, et al. Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science (New York, N.Y.)*. 1990;247:324–27.
59. Wang HM, Ogorochi T, Arai K, Miyajima A. Structure of mouse interleukin 3 (IL-3) binding protein (AIC2A). Amino acid residues critical for IL-3 binding. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:979–83.
60. Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitamins and hormones*. 2006;74:1–30.
61. Barry SC, Bagley CJ, Phillips J, Dottore M, Cambareri B, Moretti P, et al. Two contiguous residues in human interleukin-3, Asp21 and Glu22, selectively interact with the alpha- and beta-chains of its receptor and participate in function. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:8488–92.
62. Bagley CJ, Phillips J, Cambareri B, Vadas MA, Lopez AF. A discontinuous eight-amino acid epitope in human interleukin-3 binds the alpha-chain of its receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:31922–28.
63. Dey R, Ji K, Liu Z, Chen L. A cytokine-cytokine interaction in the assembly of higher-order structure and activation of the interleukine-3:receptor complex. *PLoS one*. 2009;4:e5188.

64. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, et al. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*. 2008;134:496–507.
65. Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, et al. Molecular basis of cytokine receptor activation. *IUBMB life*. 2010;62:509–18.
66. Broughton SE, Hercus TR, Hardy MP, McClure BJ, Nero TL, Dottore M, et al. Dual mechanism of interleukin-3 receptor blockade by an anti-cancer antibody. *Cell reports*. 2014;8:410–19. [25043189](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.019).
67. Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomarker research*. 2014;2:4.
68. Milatovich A, Kitamura T, Miyajima A, Francke U. Gene for the alpha-subunit of the human interleukin-3 receptor (IL3RA) localized to the X-Y pseudoautosomal region. *American journal of human genetics*. 1993;53:1146–53.
69. Miyajima I, Levitt L, Hara T, Bedell MA, Copeland NG, Jenkins NA, et al. The murine interleukin-3 receptor alpha subunit gene: chromosomal localization, genomic structure, and promoter function. *Blood*. 1995;85:1246–53.
70. Chen J, Olsen J, Ford S, Mirza S, Walker A, Murphy JM, et al. A new isoform of interleukin-3 receptor {alpha} with novel differentiation activity and high affinity binding mode. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:5763–73.
71. Broughton SE, Hercus TR, Nero TL, Dhagat U, Owczarek CM, Hardy MP, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the interleukin-3 alpha receptor bound to the Fab fragment of antibody CSL362. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*. 2014;70:358–61.
72. Carr PD, Gustin SE, Church AP, Murphy JM, Ford SC, Mann DA, et al. Structure of the complete extracellular domain of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration. *Cell*. 2001;104:291–300.
73. Carr PD, Conlan F, Ford S, Ollis DL, Young IG. An improved resolution structure of the human beta common receptor involved in IL-3, IL-5 and GM-CSF signalling which gives better definition of the high-affinity binding epitope. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*. 2006;62:509–13.

74. Murphy JM, Ford SC, Olsen JE, Gustin SE, Jeffrey PD, Ollis DL, et al. Interleukin-3 binding to the murine betaIL-3 and human betac receptors involves functional epitopes formed by domains 1 and 4 of different protein chains. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:26500–08.
75. Woodcock JM, Bagley CJ, Zacharakis B, Lopez AF. A single tyrosine residue in the membrane-proximal domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin (IL)-3, and IL-5 receptor common beta-chain is necessary and sufficient for high affinity binding and signaling by all three ligands. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:25999–6006.
76. Lopez AF, Eglinton JM, Lyons AB, Tapley PM, To LB, Park LS, et al. Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *Journal of cellular physiology*. 1990;145:69–77.
77. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell*. 1991;66:1165–74.
78. Taketazu F, Chiba S, Shibuya K, Kuwaki T, Tsumura H, Miyazono K, et al. IL-3 specifically inhibits GM-CSF binding to the higher affinity receptor. *Journal of cellular physiology*. 1991;146:251–57.
79. Gorman DM, Itoh N, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Miyajima A. Chromosomal localization and organization of the murine genes encoding the beta subunits (AIC2A and AIC2B) of the interleukin 3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:15842–48.
80. Carr PD, Ewens CL, Dai J, Ollis DL, Murphy JM, Jackson CJ, et al. Crystal structure of the mouse interleukin-3 beta-receptor: insights into interleukin-3 binding and receptor activation. *The Biochemical journal*. 2014;463:393–403.
81. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2007;179:5886–96.
82. Jelinek DF, Splawski JB, Lipsky PE. The roles of interleukin 2 and interferon-gamma in human B cell activation, growth and differentiation. *European journal of immunology*. 1986;16:925–32.

83. Itoh K, Inoue T, Ito K, Hirohata S. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. *Cellular immunology*. 1994;157:478–88.
84. Splawski JB, Jelinek DF, Lipsky PE. Immunomodulatory role of IL-4 on the secretion of Ig by human B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1989;142:1569–75.
85. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154:4341–50.
86. Pene J, Gauchat J, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2004;172:5154–57.
87. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst A, Robbins R, da Silva, Yong Sing, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;175:7867–79.
88. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2006;177:5236–47.
89. Rachmilewitz J, Tykocinski ML. Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway. *Blood*. 1998;92:223–29.
90. Bruhl H, Cihak J, Goebel N, Talke Y, Renner K, Hermann F, et al. Chondroitin sulfate activates B cells in vitro, expands CD138+ cells in vivo, and interferes with established humoral immune responses. *Journal of leukocyte biology*. 2014;96:65–72.
91. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374:546–49.
92. Kim Y, Lee S, Yoo Y, Lee J, Park J, Park S. Kinetic Analysis of CpG-Induced Mouse B Cell Growth and Ig Production. *Immune network*. 2012;12:89–95.

93. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2000;164:944–53.
94. Jung J, Yi A, Zhang X, Choe J, Li L, Choi YS. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2002;169:2368–73.
95. Janossy G, Gomez De La Concha, E, Waxdal MJ, Platts-Mills T. The effects of purified mitogenic proteins (Pa-1 and Pa-2) from pokeweed on human T and B lymphocytes in vitro. *Clinical and experimental immunology*. 1976;26:108–17.
96. Chessin LN, Borjeson J, Welsh PD, Douglas SD, Cooper HL. Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro. II. Morphological and biochemical studies on the transformation of lymphocytes by pokeweed mitogen. *The Journal of experimental medicine*. 1966;124:873–84.
97. Wu LY, Lawton AR, Cooper MD. Differentiation capacity of cultured B lymphocytes from immunodeficient patients. *The Journal of clinical investigation*. 1973;52:3180–89.
98. Maddaly R, Pai G, Balaji S, Sivaramakrishnan P, Srinivasan L, Sunder SS, et al. Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation--insights from both in vivo and in vitro approaches. *FEBS letters*. 2010;584:4883–94.
99. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, et al. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176:1543–50.
100. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology*. 1994;12:881–922.
101. Banchereau J, Paoli P de, Valle A, Garcia E, Rousset F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science (New York, N.Y.)*. 1991;251:70–72.
102. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172:1861–64.

103. Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1991;146:1836–42.
104. Banchereau J, Rousset F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature*. 1991;353:678–79.
105. Chaplin JW, Kasahara S, Clark EA, Ledbetter JA. Anti-CD180 (RP105) activates B cells to rapidly produce polyclonal Ig via a T cell and MyD88-independent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2011;187:4199–209.
106. Egli N, Zajonz A, Burger MT, Schweighoffer T. Human CD180 Transmits Signals via the PIM-1L Kinase. *PLoS one*. 2015;10:e0142741.
107. DeFranco AL, Kung JT, Paul WE. Regulation of growth and proliferation in B cell subpopulations. *Immunological reviews*. 1982;64:161–82.
108. DeFranco AL, Raveche ES, Paul WE. Separate control of B lymphocyte early activation and proliferation in response to anti-IgM antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1985;135:87–94.
109. Renner K, Hermann FJ, Schmidbauer K, Talke Y, Rodriguez Gomez M, Schiechl G, et al. IL-3 contributes to development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney international*. 2015;88:1088–98.
110. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and experimental immunology*. 2010;162:271–79.
111. Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Banchereau J, et al. Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*. 1993;82:752–61.
112. Munoz L, Nomdedeu JF, Lopez O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventin A, et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2001;86:1261–69.
113. Venkataraman G, Aguhar C, Kreitman RJ, Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *American journal of clinical pathology*. 2011;136:625–30.

114. Zhou M, Gu L, Holden J, Yeager AM, Findley HW. CD40 ligand upregulates expression of the IL-3 receptor and stimulates proliferation of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells in the presence of IL-3. *Leukemia*. 2000;14:403–11.
115. Larson AW, LeBien TW. Cross-linking CD40 on human B cell precursors inhibits or enhances growth depending on the stage of development and the IL costimulus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1994;153:584–94.
116. Saeland S, Duvert V, Moreau I, Banchereau J. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178:113–20.
117. Miller K. The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology*. 1983;165:132–46.
118. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1978;120:2027–32.
119. Ruscetti FW, Morgan DA, Gallo RC. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1977;119:131–38.
120. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science (New York, N.Y.)*. 1988;240:1169–76.
121. Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 2008;26:453–79.
122. Emrich F, Moll H, Simon MM. Recombinant Human Interleukin 2 Acts as a B Cell Growth and Differentiation Promoting Factor. *Immunobiology*. 1985;169:97–102.
123. Collins RA, Oldham G. Effect of recombinant bovine IL-1 and IL-2 on B cell proliferation and differentiation. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;1995:141–50.
124. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172:921–29.
125. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1986;136:2348–57.

126. Rabin EM, Ohara J, Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82:2935–39.
127. Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *The Journal of experimental medicine*. 1982;155:734–48.
128. Vitetta ES, Ohara J, Myers CD, Layton JE, Krammer PH, Paul WE. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *The Journal of experimental medicine*. 1985;162:1726–31.
129. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Advances in immunology*. 1993;54:1–78.
130. Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annual review of immunology*. 1985;3:133–57.
131. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal*. 1990;265:621–36.
132. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6:a016295.
133. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science (New York, N.Y.)*. 2015;347:1260–65.
134. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, et al. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology letters*. 2003;86:123–29.
135. Moore KW, de Waal Malefyt, R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683–765.
136. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263–74.
137. Yehudai D, Snir A, Peri R, Halasz K, Haj T, Odeh M, et al. B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scandinavian journal of immunology*. 2012;76:371–77.

## 7. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 AKTIVIERUNG DES IL-3-REZEPTOR-KOMPLEX .....	20
ABBILDUNG 2 AUFREINIGUNG VON PBMC AUS VOLLBLUT .....	33
ABBILDUNG 3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MAGNETISCHEN B-ZELLSEPARATION .....	35
ABBILDUNG 4 PBMC VOR AUFREINIGUNG .....	37
ABBILDUNG 5 AUFGEREINIGTE HUMANE B-ZELLEN .....	37
ABBILDUNG 6 BEISPIEL FÜR PIPETTIERSCHEMA .....	39
ABBILDUNG 7 SANDWICH-ELISA .....	40
ABBILDUNG 8 ZEITKINETIK DER B-ZELLPROLIFERATION .....	44
ABBILDUNG 9 PROLIFERATION NACH 6 TAGEN .....	45
ABBILDUNG 10 DOTBLOT DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN AUSWERTUNG DER PROLIFERATION NACH 6 TAGEN .....	46
ABBILDUNG 11 STIMULATION DER B-ZELL-PROLIFERATION .....	48
ABBILDUNG 12 ÜBERLEBEN DER B-ZELLEN UNTER STIMULATION MIT IL-3 .....	50
ABBILDUNG 13 KOSTIMULATION CD4 <sup>+</sup> UND CD19 <sup>+</sup> .....	52
ABBILDUNG 14 PROLIFERATION/DIFFERENZIERUNG DER B-ZELLEN ZU MEMORY-B-ZELLEN .....	53
ABBILDUNG 15 PROLIFERATION/DIFFERENZIERUNG DER B-ZELLEN ZU MEMORY-B-ZELLEN NACH 6 TAGEN INKUBATION .....	55
ABBILDUNG 16 SEKRETION VON IL-6 .....	57
ABBILDUNG 17 SEKRETION VON IL-10 .....	58
ABBILDUNG 18 SEKRETION VON IL-13 .....	59
ABBILDUNG 19 IL-3-BINDUNG AUF B-ZELLEN .....	60
ABBILDUNG 20 DOTBLOT DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	62
ABBILDUNG 21 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN STIMULANZIEN .....	62
ABBILDUNG 22 CD123 MEDIAN DER CD19 <sup>+</sup> B-ZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN STIMULANZIEN .....	63
ABBILDUNG 23 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN UNTER INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN STIMULANZIEN .....	65
ABBILDUNG 24 CD123 MEDIAN DER CD19 <sup>+</sup> B-ZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN STIMULANZIEN .....	66
ABBILDUNG 25 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN UNTER KOSTIMULATION MIT CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN .....	68
ABBILDUNG 26 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN UNTER KOSTIMULATION MIT CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN .....	69
ABBILDUNG 27 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN UNTER STIMULATION MIT VERSCHIEDENEN INTERLEUKINEN .....	71
ABBILDUNG 28 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN BEI KOSTIMULATION MIT T-ZELLEN UND IL-2 .....	73
ABBILDUNG 29 EXPRESSION VON CD123 AUF B-ZELLEN BEI KOSTIMULATION MIT T-ZELLEN UND IL-4 .....	74

## 8. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 LABORGERÄTE .....	27
TABELLE 2 GLASWARE UND PLASTIKWARE.....	28
TABELLE 3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, PUFFER UND REAKTIONSMEDIEN.....	29
TABELLE 4 ZELLKULTURMEDIEN UND ZELLKULTURZUSÄTZE .....	30
TABELLE 5 KITS .....	30
TABELLE 6 ZYTOKINE, STIMULANZIEN, ANTIKÖRPER UND ENZYME .....	31
TABELLE 7 ELISA .....	31
TABELLE 8 ZELLSEPARATION .....	31
TABELLE 9 ZELLKULTURMEDIEN.....	31
TABELLE 10 ANTIKÖRPER UND FÄRBUNGEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	32
TABELLE 11 ANALYSE- UND BEARBEITUNGSPROGRAMME .....	32

## 9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Dabei geht besonderer Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Mack, der mir die Ausarbeitung dieser Promotion erst ermöglicht hat und an das Team der Arbeitsgruppe Mack, die mir bei Problemen während der Laborarbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Meiner Betreuerin Kerstin Renner möchte ich dafür danken, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei allen Schwierigkeiten mit Hilfestellung, guten Ratschlägen und Anregungen unterstützt hat.

Darüber hinaus möchte ich meiner Mutter und meinen Freunden danken, für ihre Unterstützung und vor allen Dingen für ihre Geduld und Nachsichtigkeit während der zeitintensiven und stressigen Phasen der Arbeit.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Sophia Metz, geboren am 06.07.1990 in Straubing, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## Lebenslauf

### Schulbildung

09/1996 – 09/1999 Grundschole Oberschneiding  
09/1999 – 09/2000 Grundschole Bayreuth Altstadt  
09/2000 – 06/2009 Albertus Magnus Gymnasium, Regensburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2)

### Hochschulstudium

WS 2009 – SS 2011 Vorklinische Ausbildung an der Universität  
Regensburg  
08/2011 – 09/2011 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0  
WS 2011 – SS 2014 Klinischer Studienabschnitt am Universitätsklinikum  
Regensburg  
10/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2  
03/2012 Stationäre Famulatur Anesthesiologie, Klinikum  
Freising  
02/2013 Stationäre Famulatur Innere Medizin II,  
Universitätsklinikum Regensburg  
09/2013 Ambulante Famulatur, Allgemeinarztpraxis Dr. Hlawa,  
Oberschneiding  
02/2014 Stationäre Famulatur Anesthesiologie, Klinikum  
Freising  
11/2014 – 03/2015 Erstes Tertial des praktischen Jahres, Wahlfach  
Anesthesiologie, Klinikum Freising  
03/2015 – 06/2015 Zweites Tertial des praktischen Jahres, Innere  
Medizin, Klinikum St. Elisabeth Straubing  
06/2015 – 10/2015 Drittes Tertial des praktischen Jahres, Chirurgie,  
Universitätsklinikum Regensburg  
08/12/2015 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1  
10/12/2015 Approbation als Ärztin

### Dissertation

Titel Wirkung von Interleukin-3 auf humane B-Zellen und  
Regulation ihrer Interleukin-3 Rezeptor Expression  
Fertigstellung Juli 2017

### Weiterbildung

Seit 4/2016 Assistenzärztin der Klinik für Anesthesiologie am  
Universitätsklinikum Regensburg