

Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Ch. P. Speer

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANTIGENSPEZIFISCHE  
IMMUNITÄT NACH DIPHTHERIE- UND TETANUS-  
SCHUTZIMPfung MIT DEM B-ZELL-ELISPOT-TEST**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Daniela Heinrich  
aus Würzburg

Würzburg, Februar 2002

Referent: Professor Dr. med. H. W. Kreth  
Korreferentin: Professor Dr. phil. A. Schimpl  
Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2002

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Immunsystem	1
1.2.	Reifung der B-Zellen und Immunglobulin-Klassen	2
1.3.	Aktivierung der naiven B-Zelle durch Antigenkontakt	4
1.4.	Die Plasmazelle	8
1.5.	Die Memory-B-Zelle	9
1.6.	Ziele der Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>PROBANDEN</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>15</b>
3.1.	Bestimmung des Diphtherie- und Tetanus-Antitoxin-Spiegels mittels ELISA	15
3.2.	Bestimmung des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels mittels Neutralisationstest	15
3.3.	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Ficoll-Paque	17
3.4.	Ermittlung der Zellzahl	18
3.5.	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	18
3.6.	Durchflußzytometrie	19
3.7.	Zellfärbung für die Durchflußzytometrie	19
3.8.	B-Zell-ELISPOT-Assay	20
3.8.1.	Beschichtung der Platten	20
3.8.2.	Aktivierung der B-Zellen	21
3.8.3.	Entwicklung der Spots	21
3.8.4.	Berechnung der B-Zellfrequenzen	22
3.8.5.	Kontrollen	24
3.8.5.1.	Überprüfung der Beschichtungseffizienz	24
3.8.5.2.	Nachweis Rinderserumalbumin (BSA)-spezifischer Spots	24
3.9.	Statistische Methoden	24

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
4.1.	Etablierung des B-Zell-ELISPOT-Systems (Vorversuche)	25
4.1.1.	In-vitro-Aktivierung von PBL mit SAC und IL2	25
4.1.2.	Beschichtung der ELISPOT-Platten mit Antikörpern	27
4.1.3.	Beschichtung der ELISPOT-Platten mit Diphtherie- und Tetanustoxoid	28
4.1.4.	Spezifitäts-Kontrollen	28
4.1.5.	Reproduzierbarkeit	29
4.1.6.	Verwendung von kryokonservierten Zellen	29
4.2.	Untersuchungen über die Langzeitwirkung von Diphtherie- und Tetanusschutzimpfungen auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Höhe der Serumantitoxin-Spiegel	30
4.2.1.	Einfluß des Zeitintervalls seit der letzten Auffrischimpfung auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Antitoxin-Titer	30
4.2.2.	Korrelation zwischen antigenspezifischen Antikörper-Titern und B-Zellfrequenzen	31
4.2.3.	Einfluß der Anzahl an Auffrischimpfungen auf die antigenspezifischen B-Zellfrequenzen und die Antitoxin-Titer	32
4.3.	Untersuchungen über die Immunreaktionen nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung	33
4.3.1.	Boosterung der antigenspezifischen B-Zellen und der Antikörper-Titer	34
4.3.2.	Einfluß der prävakzinalen Frequenz antigenspezifischer B-Zellen auf die Boosterreaktion	38
4.3.3.	Einfluß vorausgegangener Auffrischimpfungen auf das Boosterergebnis	40
4.3.4.	Einfluß des prävakzinalen spezifischen Antitoxin-Spiegels auf die Boosterung antigenspezifischer B-Zellen und Antitoxin-Titer	41
4.3.5.	Einfluß des Zeitintervalls seit der vorletzten Auffrischimpfung auf die erneuten Boosterergebnisse	44

<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	46
5.1.	Langzeitwirkung von Impfungen auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Höhe der Antitoxin-Titer im Serum	46
5.2.	Untersuchungen über die antigenspezifischen Immunreaktionen nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung	53
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	60
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	61
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	76
8.1.	Materialien	76
8.1.1	Antikörper	76
8.1.1.1	Unkonjugierte Antikörper	76
8.1.1.2.	Konjugierte Antikörper	76
8.1.2.	Chemikalien und Reagentien	76
8.1.3.	Geräte	77
8.1.4.	Glas- und Plastikwaren	78
8.1.5.	Medien und Puffer	79
8.1.6.	Mitogene, Seren, Zytokine	80
8.1.7.	Toxoide	80
8.2.	Abkürzungen	81

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das Immunsystem

Der Organismus muß sich kontinuierlich mit einer Vielzahl von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten auseinandersetzen. Das Immunsystem als komplexes Netzwerk soll den Organismus durch unspezifische und spezifische Abwehrmaßnahmen vor Krankheit schützen. Das unspezifische Abwehrsystem setzt sich aus zellulären und nicht-zellulären Komponenten zusammen. Die wichtigsten Zellen der unspezifischen Abwehr sind Makrophagen/Monozyten und Granulozyten, die in der Lage sind, die Erreger zu phagozytieren und abzutöten. Makrophagen spielen auch eine wichtige Rolle in der Präsentation von Antigenen für die Zellen des spezifischen Abwehrsystems. Das Komplementsystem als nicht-zellulärer Teil der unspezifischen Abwehr unterstützt die Funktion der Abwehrzellen. Es besteht aus zirkulierenden Proenzymen, die nach Aktivierung und Komplexbildung eine Lyse der Zellmembran des Erregers bewirken.

Dem unspezifischen Abwehrsystem steht das spezifische oder erworbene Abwehrsystem gegenüber, das durch Spezifität, Diversität, Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ und Gedächtnisfunktion gekennzeichnet ist. Es besteht aus einer zellulären und humoralen Komponente. Die spezifischen Abwehrzellen sind B- und T-Lymphozyten. Jeder Lymphozyt trägt auf seiner Zelloberfläche Rezeptoren mit Bindungsstellen für ein bestimmtes Antigen, für das er „spezifisch“ ist. Voraussetzung für die Erkennung einer möglichst großen Anzahl fremder Antigene ist das Vorhandensein einer sehr hohen Zahl an Lymphozyten mit unterschiedlichen Rezeptoren. Diese Diversität der Rezeptoren wird durch Prozesse auf DNA-Ebene während der Reifung der Lymphozyten erreicht.

T-Lymphozyten bilden die spezifische zelluläre Abwehr. Im Thymus gereifte T-Zellen werden weiter in CD4+ und CD8+ Zellen unterteilt. Die CD4+ Zellen werden als Helferzellen bezeichnet. Sie unterstützen durch Zellkontakt und Produktion von Zytokinen die Abwehrfunktion zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen, sowie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper sezernierende Plasmazellen. Die CD8+ T-Zellen oder zytotoxischen T-Lymphozyten können solche Zellen erkennen und abtöten, die körperfremde oder veränderte eigene Genprodukte

exprimieren, wie z.B. virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. T-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche Antigenrezeptoren, die nur Antigenfragmente (Peptide) zusammen mit einem MHC (major histocompatibility complex)-Molekül der Klasse I oder II auf der Oberfläche von Zellen erkennen können. Dabei werden extrazelluläre Antigene, z.B. nicht replizierende Toxoid-Antigene, von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen durch Endozytose/Phagozytose aufgenommen, prozessiert und zusammen mit einem MHC-Molekül der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert. Der MHC II-Antigenkomplex kann nur von CD4+ T-Zellen erkannt werden. In einer Zelle de novo synthetisierte Antigene werden nach Prozessierung an ein MHC I-Molekül gebunden, das von allen Körperzellen exprimiert werden kann. Die auf der Zelloberfläche präsentierten MHC I-Peptidkomplexe dienen der Antigenpräsentation für CD8+ T-Zellen.

B-Lymphozyten tragen als Antigenrezeptor Antikörpermoleküle auf der Zelloberfläche. Durch Kontakt mit dem spezifischen Antigen werden B-Zellen aktiviert, sie können dann antigenspezifische Antikörper in löslicher Form sezernieren. Daher repräsentieren die Antikörper den humoralen Teil der spezifischen Abwehr.

Neben der Differenzierung in Effektorzellen können sich B- und T-Zellen nach Antigenkontakt auch zu Memory-Zellen differenzieren, die bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere und effizientere Immunantwort generieren.

Will man eine Aussage über den Immunschutz eines Individuums z.B. nach Impfung mit einem spezifischen Antigen treffen, so spielen die B-Zellen sowohl als Antikörper sezernierende Plasmazellen als auch als Memory-B-Zellen eine wichtige Rolle.

## **1.2. Reifung der B-Zellen und Immunglobulin-Klassen**

Beim Menschen findet die Entwicklung und Reifung der B-Zellen vor der Geburt in der fetalen Leber und Milz statt (Phillips und Miller, 1974), nach der Geburt ist das Knochenmark der Bildungsort für B-Zellen (Osmond, 1990; Nunez et al., 1996). B-Zellen gehen zusammen mit den anderen Zellreihen des Blutes aus einer pluripotenten, teilungsfähigen Stammzelle hervor (Abramson et al., 1977). Die Entwicklung bis zur reifen B-Zelle läuft über mehrere Zellstadien ab, die jeweils durch bestimmte Oberflächen-Marker charakterisiert sind (Uckun, 1990): aus der pluripotenten Stammzelle geht eine Pro-B-Zelle hervor, die jedoch noch keinen Antigenrezeptor exprimiert.



Der Antigenrezeptor der B-Zelle ist ein Antikörpermolekül, das aus 2 schweren und 2 leichten Proteinketten besteht, die jeweils eine antigenbindende variable und eine konstante Region besitzen. Die Gene für die variable Region der schweren bzw. leichten Kette bestehen aus V-(variable), D-(diversity) und J-(joining) bzw. V- und J-Segmenten (Tonegawa, 1983). Während der B-Zellreifung werden Gensegmente unterschiedlicher Länge nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert (Tonegawa, 1983; Rajewsky, 1996). Durch dieses Rearrangement entsteht im Prä-B-Zellstadium zunächst die Genregion für die variable Region der schweren Kette. Danach wird diese mit der Genregion für die konstante Region der schweren Kette ( $C\mu$ ) kombiniert, so daß die schwere Kette eines Immunglobulin (Ig) M-Moleküls intrazellulär exprimiert werden kann. Danach findet das Rearrangement der Genregion für die variable Region der leichten Kette statt, nach Kombination mit der Genregion für die konstante Region der leichten Kette kann nun das gesamte IgM-Molekül membranständig exprimiert werden. Solche Zellen werden als unreife B-Zellen bezeichnet. Die reife B-Zelle exprimiert membranständige IgM- und IgD-Moleküle, sowie eine Vielzahl anderer Moleküle (Rajewsky, 1996). Die reifen B-Zellen zeigen nach dem Rearrangement eine sehr große Diversität in ihren Antigenrezeptoren; vermutlich existieren  $10^9$  verschiedene Bindungsspezifitäten (Paul, 1993).

Es gibt insgesamt 5 verschiedene Klassen menschlicher Immunglobuline: IgM, IgD, IgG<sub>1-4</sub>, IgE und IgA<sub>1-2</sub>, die jeweils durch eine klassenspezifische konstante Genregion der schweren Ig-Kette determiniert werden. Die Antikörper einer Ig-Klasse sind jeweils auf spezifische Funktionen spezialisiert. IgM und IgD sind in ihrer membrangebundenen Form B-Zellrezeptoren. Antigen-spezifische IgM-Moleküle steigen nach primärem Antigenkontakt als erste Ig-Fraktion im Serum an. IgG-Moleküle machen im Serum den Hauptanteil der Ig aus. Sie steigen in der zweiten Phase der Immunantwort an und sind für den Langzeit-Antikörper-Titer nach Antigenkontakt verantwortlich. IgA-Antikörper finden sich in hoher Konzentration in den Körpersekreten. Dadurch können Erreger direkt an der Eintrittspforte neutralisiert werden. IgE-Antikörper spielen eine Rolle in der Abwehr gegen Parasiten und bei allergischen Reaktionen. Die an Mastzellen gebundenen IgE-Moleküle führen nach Antigenkontakt zur Degranulation der Zelle und zur Freisetzung vasoaktiver Stoffe.

Wird die Genregion für die variable Region der schweren Ig-Kette mit den verschiedenen Genregionen für die konstante Region der schweren Ig-Kette kombiniert, bleibt die Spezifität des Ig-Moleküls erhalten, während sich die Ig-Klasse ändert. Diesen Prozeß nennt man Ig-Klassenswitch. Auf Chromosom 14 des Menschen liegen in 3' Richtung (abwärts) von den Genen der variablen Region der schweren Kette die konstanten Genregionen der Ig-Klassen (Hofker et al., 1989). Durch nicht homologe Rekombination zwei konstanter Genregionen bildet die dazwischen liegende DNA einen Ring, der herausgeschnitten wird. Die Gene der variablen Region liegen jetzt neben dem abwärts gelegenen konstanten Genabschnitt der neuen Ig-Klasse (Schwedler et al., 1990).

Das wichtigste Signal für die Induktion des Switchprozesses ist die Aktivierung der B-Zelle durch die Interaktion von CD40-Molekülen mit CD40-Liganden aktivierter T-Zellen (Banchereau et al., 1994; Gray et al., 1996). Unter dem Einfluß von Zytokinen kommt es zum Klassenswitch, wobei die verschiedenen Zytokine jeweils den Switch in eine bestimmte Ig-Klasse determinieren. Beim Menschen führt IL4 als wichtigstes Switch-Interleukin zur Expression von IgG<sub>4</sub> und IgE Molekülen (Lundgren et al., 1989). TGF  $\beta$  bewirkt einen Switch nach IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>, IL10 nach IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> (Banchereau et al., 1994).

### **1.3. Aktivierung der naiven B-Zelle durch Antigenkontakt**

Die naiven IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> B-Zellen zeichnen sich durch eine vergleichsweise kurze Lebensdauer aus (Ahmed und Gray, 1996; Arpin et al., 1997), obwohl kontroverse tierexperimentelle Daten über ihre Langlebigkeit vorliegen (Freitas und Rocha, 1993; Sprent und Tough, 1994; Sprent, 1993). Nachdem sie das Knochenmark verlassen haben, rezirkulieren sie zwischen den sekundären lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques des Darmes. Sie machen ca. 90% des peripheren rezirkulierenden B-Zellpools (Gray, 1993) und 60% des B-Zellpools im menschlichen Blut aus (Klein et al., 1998). In den B-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe bilden die naiven B-Zellen sog. Primärfollikel. Sie durchwandern die T-Zellzonen (parakortikale Zone des Lymphknotens bzw. periarterioläre lymphatische Scheide (PALS) der Milz) und können dort z.B. im Rahmen einer Infektion oder einer Impfung auf ihr spezifisches Antigen treffen.

Die B-Zelle kann von T-Zell-abhängigen oder T-Zell-unabhängigen Antigenen aktiviert werden. T-Zell-unabhängige Antigene zeigen in ihrer Struktur repetitive Epitope (Bachmann, 1998). Dazu gehören Polysaccharide und polyklonale B-Zell-Aktivatoren wie Lipopolysaccharide und Staphylococcus Aureus Stamm Cowan I (SAC), die B-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität aktivieren. Für die Differenzierung der B-Zelle in eine Antikörper sezernierende Zelle genügt bei T-Zell-unabhängigen Antigenen die Antigen-Bindung an den B-Zellrezeptor ohne zusätzliche Hilfe spezifischer CD4+ T-Zellen (Rajewsky, 1996). Allerdings kommt es überwiegend zur Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse und nicht zur Ausbildung eines B-Zell-Gedächtnisses (Rajewsky, 1996; Bachmann und Zinkernagel, 1997).

Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung der naiven B-Zelle mit T-Zell-abhängigen Antigenen - dazu gehören z.B. die Proteine - zur Differenzierung entweder in Plasmazellen, die hochaffine Antikörper der Klasse G (A oder E) sezernieren oder in Memory-B-Zellen. Bei diesen Antigenen ist die B-Zelle auf die Hilfe der CD4+ Helfer-T-Zellen angewiesen (Gray et al., 1996; Rajewsky, 1996). Bindet das Antigen an das membranständige Ig-Molekül, entsteht ein Aktivierungssignal, das im Zytoplasma zu einer Kaskade von Phosphorylierungen und Enzymaktivierungen, einer Erhöhung des intrazellulären Calciums (DeFranco, 1992) und der vermehrten Expression von Zelloberflächenmolekülen führt (Davidson et al., 1991, DeFranco, 1993). Es kommt zur Endozytose des Antigen-Rezeptorkomplexes und zur intrazellulären Prozessierung des Antigens, dessen Peptide die B-Zelle zusammen mit MCH II-Molekülen auf der Zelloberfläche den T-Zellen präsentiert (Tulp et al., 1994). Erkennen CD4+ T-Zellen ihr spezifisches Antigen über den T-Zellrezeptor, kommt es zu wechselseitigen Aktivierungsschritten zwischen B- und T-Zellen über Zelloberflächenmoleküle wie CD40 und CD40 Ligand (Banchereau et al., 1994; Gray et al., 1996) und zur Sekretion von Zytokinen durch die T-Zellen (Parker, 1993). Dabei spielt das Zytokin IL2 eine besonders wichtige Rolle für die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Außerdem sind die Zytokine IL4, IL5 (Noelle et al., 1991) und IL12 von Bedeutung (Dubois et al., 1998).

In der ersten Phase einer primären Immunantwort auf ein Antigen proliferieren die naiven B-Zellen zu B-Blasten, die sich in IgM sezernierende Plasmazellen differenzieren. So lassen sich 3-4 Tage nach primärer Immunisierung antigenspezifische IgM-

Antikörper im Serum nachweisen. Diese Moleküle weisen nur eine geringe Affinität zu ihrem Antigen auf (Berek, 1992).

Die kurzlebigen IgM sezernierenden Plasmazellen können jedoch keine Langzeitimmunität aufrechterhalten. In der zweiten Phase der Immunantwort werden hochaffine IgG-Antikörper gebildet und es entstehen langlebige Memory-B-Zellen. Dabei spielen Keimzentren eine entscheidende Rolle (MacLennan, 1994; Liu und Arpin, 1997). Die B-Blasten wandern in die primären Follikel (Liu et al., 1997) und proliferieren dort unter dem Einfluß von T-Helferzellen und speziellen antigenpräsentierenden Zellen, den follikulären dendritischen Zellen (Grouard et al., 1995; Liu et al., 1996). Es bildet sich die typische Keimzentrumsarchitektur mit einer dunklen Zone aus sich schnell teilenden Zentroblasten, einer hellen Zone aus nicht mehr teilungsfähigen Zentrozyten und einer Mantelzone aus naiven B-Zellen (Gray et al., 1996; Bachmann, 1998).

In den Keimzentren findet ein für die Entstehung von Memory-B-Zellen essentieller Prozeß statt: die Affinitätsreifung der Immunglobuline (Rajewsky, 1996; Manser et al., 1998). Während die B-Zellen proliferieren, kommt es, induziert durch Antigenpräsenz, zu einer hohen Frequenz an zufälligen Punktmutationen in den variablen Regionen der Gene für die leichte und die schwere Ig-Kette (Tonegawa, 1983; Andersson et al., 1998). Diese somatische Hypermutation kann zu einem Aminosäureaustausch in der antigenbindenden Region des Ig-Moleküls führen (Siekevitz et al., 1987). Dadurch entstehen sowohl Ig-Moleküle mit höherer Affinität und mit niedrigerer Affinität zu ihrem Antigen. Die Zentrozyten können dem programmierten Zelltod, der Apoptose, nur entgehen, wenn sie ein Überlebenssignal erhalten, das über die Bindung des Antigens an ihren B-Zellrezeptor vermittelt wird (Liu et al., 1997). Mit Abnahme der Antigenkonzentration nach einer Immunisierung erhalten nur noch die höchstaffinen Zellen dieses Anti-Apoptose-Signal (Liu und Banchereau, 1996; Rajewsky, 1996), während mehr als 95% der Zentrozyten absterben (Gray, 1993; Smith et al., 1994). Die Folge dieses Reifungs- und Selektionsprozesses ist ein starker Anstieg der Affinität der IgG-Antikörper nach primärem Antigenkontakt.

Es kommt also zunächst zur klonalen Expansion der B-Zellen in den Keimzentren, von denen allerdings nur 5% überleben und einen stabilen Zellpool bilden (Gray, 1993; Smith et al., 1994). Dieser Mechanismus der klonalen Kontraktion ist besonders

gut für T-Zellen am Tiermodell untersucht (Ahmed und Gray, 1996, Bush et al., 1998). Nach einer initialen Phase der klonalen Expansion antigenspezifischer T-Zellen, aus denen Effektorzellen generiert werden, folgt der „aktivierungsinduzierte Zelltod“, durch den mehr als 95% der spezifischen T-Zellen eliminiert werden (Moskophidis et al., 1993; Tripp et al., 1995; Antia et al., 1998). Die überlebenden Zellen bilden das antigenspezifische T-Zell-Memory-Kompartiment (Ahmed und Gray, 1996).

Die Regulation der Stärke der klonalen Expansion und Kontraktion ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Lymphozyten, d.h. für die Konstanthaltung ihrer Populationsgröße innerhalb bestimmter Grenzen. Versagt der Mechanismus der klonalen Kontraktion, kommt es zu einer überschießenden Immunantwort. Die Überladung des Immunsystems mit neugenerierten antigenspezifischen Zellen würde zu einer Verdrängung von Zellen anderer Antigenespezifität führen und die Fähigkeit herabsetzen, auf ein breites Spektrum an Fremdanigenen zu reagieren (Sprent, 1994).

Parallel zur Affinitätsreifung mit klonaler Expansion und Kontraktion antigenspezifischer B-Zellen findet in den Keimzentren der Klassenswitch der Ig-Moleküle statt.

Nach der Generierung hochaffiner, IgG exprimierender B-Zellen in den Keimzentren differenzieren sich diese entweder zu Plasmazellen, die in der zweiten Phase der primären Immunantwort für die Produktion hochaffiner IgG-Moleküle verantwortlich sind, oder sie differenzieren sich zu Memory-B-Zellen (Liu et al., 1997). Ob dabei Plasma- bzw. Memory-B-Zellen aus einem gemeinsamen Pool stammen und sich durch unterschiedliche Signale in die eine oder andere Richtung differenzieren (Jacob und Kelsoe, 1992; Gray, 1993), oder ob sie jeweils aus verschiedenen Vorläuferzellen hervorgehen (Linton et al., 1989; Klinman, 1997) wird kontrovers diskutiert.

Welche Signale der Umgebung die B-Zellen zur Differenzierung in die eine oder andere Richtung führen, ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Das wichtigste Signal für die Differenzierung in das Memory-Kompartiment ist die CD40/CD40 Ligand-Interaktion in den Keimzentren (Arpin et al., 1995; Callard et al., 1995; Liu et al., 1997). Liu et al. konnten 1991 zeigen, daß die Interaktion zwischen CD40 und CD40 Ligand zur Differenzierung der B-Zellen in Memory-Zellen führt, während die Zugabe von CD23, das von den folliculären dendritischen Zellen exprimiert wird, die Differenzierung in Plasmoblasten bewirkt. Stimuliert man humane Zentroblasten mit Antigen

unter Zugabe von IL4 *in vitro*, so führt das zur Generierung von Memory-B-Zellen (Choe et al., 1997), während für die Differenzierung zur Plasmazelle v.a. die Zytokine IL10 (Choe und Choi, 1998) und IL6 (Cerutti et al., 1998) von Bedeutung sind.

Kommt das Immunsystem in Kontakt mit vermehrungsfähigen Erregern wie z.B. bei einer Infektion oder nach Verabreichung von Lebendimpfstoff, entstehen bereits beim ersten Antigenkontakt ein hochaffiner IgG Antikörper-Titer sowie langlebige Memory-B-Zellen. Handelt es sich bei dem Antigen hingegen um inerte Antigene, wie z.B. Tetanustoxoid, muß die Impfung in bestimmten Abständen mehrmals wiederholt werden, damit es zur Etablierung eines langlebigen Antikörper-Titers und eines B-Zell-Gedächtnisses kommt. Nach der Grundimmunisierung müssen in regelmäßigen Abständen Auffrischimpfungen erfolgen. Da sowohl die Antikörper sezernierenden Plasmazellen als auch die Memory-B-Zellen eine wichtige, aber unterschiedliche Rolle für den Immunschutz des Individuums spielen, sollen sie im folgenden genauer betrachtet werden.

#### **1.4. Die Plasmazelle**

Plasmazellen werden in den ersten Tagen bis Wochen nach Antigenkontakt v.a. in Lymphknoten und Milz gefunden (Slifka et al., 1995), wie Untersuchungen im Mausmodell zeigen. Danach kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall der Plasmazellen in diesen Kompartimenten, während ihre Zahl im Knochenmark ansteigt, bis sie dort ein Plateau erreicht (Slifka et al., 1995; Slifka et al., 1998). Die ins Knochenmark eingewanderten Plasmazellen sezernieren antigenspezifische Antikörper, die den Organismus dauerhaft vor Reinfektion schützen. Daher korreliert die Anzahl spezifischer Plasmazellen mit der Höhe des Antikörper-Titers, wie Slifka et al. 1995 im Mausmodell zeigen konnten. Andere Experimente konnten bestätigen, daß auch beim Menschen das Knochenmark der Hauptbildungsort der Serumimmunglobuline ist (Benner et al., 1981; Terstappen et al., 1990; Tew et al., 1992).

Antigenspezifische Antikörper-Titer lassen sich im Serum des Menschen oft noch Jahrzehnte nach dem letzten Antigenkontakt nachweisen (Ahmed und Gray, 1996). Wie über einen so langen Zeitraum spezifische Antikörper persistieren können, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Beim Menschen ist noch unklar, ob kurzlebige Plasmazellen stetig aus langlebigen Memory-B-Zellen rekrutiert werden (Gray et

al., 1996; Zinkernagel et al., 1996) oder ob es langlebige Plasmazellen, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte, gibt, die unabhängig von Memory-B-Zellen überleben können (Manz et al., 1997; Slifka et al., 1998).

Der im Serum meßbare Antikörper-Titer galt bislang als das wichtigste Kriterium zur Beurteilung des Immunschutzes eines Individuums nach einer Impfung, da präexistierende Antikörper Toxine bzw. Erreger binden, neutralisieren und so eine Infektion bzw. Erkrankung verhindern (Ahmed und Gray, 1996; Zinkernagel, 1997). Sinkt der Antikörper-Titer unter eine definierte Schutzgrenze, so gilt dies als Kriterium zur Auffrischimpfung (Naumann et al., 1983). Es hat sich jedoch gezeigt, daß z.B. nach einer Hepatitis B-Impfung auch ohne präexistierende Antikörper ein Immunschutz vorhanden ist (West und Calandra, 1996). Neben den T-Zellen scheinen dabei die Memory-B-Zellen eine besondere Rolle zu spielen.

### **1.5. Die Memory-B-Zelle**

Beim Menschen findet man Memory-B-Zellen in verschiedenen Kompartimenten. Sie rezirkulieren zwischen den sekundären lymphatischen Organen (Butcher und Picker, 1996), wobei die Marginalzone der Milz ein wichtiges Memory-Kompartiment darstellt (Dunn-Walters et al., 1995; Tierens et al., 1999). Im Gegensatz zu naiven B-Zellen können sie auch in sog. Effektororgane des Immunsystems, wie z.B. Haut oder Schleimhäute, gelangen, um eine Immunantwort direkt an der Eintrittspforte der Erreger auszulösen (Butcher und Picker, 1996). Humane Memory-B-Zellen können auch ins Knochenmark wandern (Paramithiotis und Cooper, 1997). Das Blut stellt ein weiteres wichtiges Kompartiment dar: 40% des B-Zellpools im Blut des Menschen bestehen aus Memory-B-Zellen mit hochmutierten Antigenrezeptoren (Klein et al., 1998).

Will man Memory-B-Zellen charakterisieren, so läßt sich bislang kein einzelner Marker finden, mit dessen Hilfe Memory-B-Zellen sicher von anderen Zellen differenziert werden könnten (Zinkernagel et al., 1996; Tangye et al., 1998). Die Zugehörigkeit einer B-Zelle zum Memory-Kompartiment wird durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle sowie v.a. durch funktionelle Merkmale bestimmt. Ein Oberflächenmarker ist das HSA (heat stable antigen), welches Memory-B-Zellen niedriger exprimieren als andere Zellpopulationen (Linton et al., 1989; Klinman, 1997). Camp et al. konnten 1991 im Tiermodell zeigen, daß Memory-B-Zellen das Oberflächenmolekül

CD44 hoch exprimieren, welches ihnen z.B. durch Bindung an die Endothelien der postkapillären Venolen eine stärkere Retention in den sekundären lymphatischen Geweben ermöglicht. CD44 stellt auch für die B-Zellen des Menschen einen wichtigen Gedächtnis-Marker dar (Kremmidiotis und Zola, 1995). Tangye et al. (1998) wiesen nach, daß humane Memory-B-Zellen in der Milz durch die Expression von CD148 und CD27 gekennzeichnet sind. Klein et al. (1998) bestätigten die Bedeutung von CD27 als einen wichtigen Marker für humane Memory-B-Zellen im peripheren Blut.

Neben Oberflächenmolekülen lassen sich Memory-Zellen v.a. durch folgende funktionelle Merkmale von anderen Zellen differenzieren: erstens findet ihre Generierung in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe statt. Zweitens zeigen ihre Antigenrezeptoren in der variablen Region eine hohe Anzahl somatischer Mutationen. Diese haben demnach einen Selektionsprozeß durchlaufen und sind hochaffin für ihr spezifisches Antigen. Drittens haben ihre Antigenrezeptoren auch den Switchprozeß durchlaufen und gehören nicht mehr der Klasse M, sondern den Klassen G, A oder E an (Gray, 1993). Das trifft jedoch nicht auf alle Memory-B-Zellen zu. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, daß es eine Subpopulation humaner Memory-B-Zellen in Knochenmark, Milz und Blut gibt, die hypermutierte Antigenrezeptoren der IgM-Klasse tragen (van Es et al., 1992, Insel et al., 1994; Klein et al., 1997, Paramithiotis und Cooper, 1997). Memory-B-Zellen sind außerdem nicht mehr in der Lage, spontan Antikörper zu sezernieren, sondern sie differenzieren sich erst nach erneuter Stimulation zu Antikörper sezernierenden Zellen (Zinkernagel et al., 1996). Dabei zeigen sie im Gegensatz zu naiven B-Zellen reduzierte Anforderungen an eine Aktivierung. Ferner haben Memory-B-Zellen eine lange funktionelle Lebensspanne (Gray, 1993; Ahmed und Gray, 1996). So können antigenspezifische Memory-B-Zellen beim Menschen noch Jahre nach dem letzten Antigenkontakt nachgewiesen werden (West und Calandra, 1996). Ob die Memory-B-Zelle per se eine langlebige Zelle ist (Zinkernagel et al., 1996) oder ob durch Stimulation mit persistierendem Antigen ihre lange funktionelle Lebensdauer aufrechterhalten wird (Gray et al., 1996), konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Die Hauptaufgabe der Memory-B-Zellen besteht darin, bei erneutem Antigenkontakt sehr schnell zu proliferieren und sich zu Antikörper sezernierenden Zellen zu differenzieren. Es kommt dabei innerhalb weniger Tage zum Anstieg hochaffiner IgG Antikörper in großen Mengen, was die Infektion nicht per se, aber die weitere Ausbrei-



tung des Erregers und letztlich die erneute Erkrankung verhindert (Gray, 1993; Ahmed und Gray 1996).

Die hohe Affinität der sekundären Antikörper-Antwort reflektiert den Mutations- und Selektionsprozeß, der während der primären Immunantwort in den Keimzentren stattgefunden hat. Die höhere Effizienz hat 2 Gründe: zum einen liegt bereits vor Antigenkontakt eine Population antigenspezifischer Lymphozyten vor, zum anderen sind die Anforderungen an Antigen, T-Zell-Hilfe und Zytokinen zur Aktivierung von Memory-B-Zellen geringer als zur Aktivierung naiver B-Zellen (reviewed in Slifka und Ahmed, 1996; Kindler und Zubler 1997).

Auch im Verlauf einer Memory-B-Zellantwort müßte sich an die Phase der klonalen Expansion antigenspezifischer B-Zellen eine Phase der klonalen Kontraktion anschließen, durch die eine Überexpansion antigenspezifischer Zellen verhindert werden kann. Das ist jedoch beim Menschen bisher kaum untersucht.

Neben der Generierung einer sekundären Immunantwort spielen die B-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Antigen-Präsentation, in der Initiierung der T-Zellantwort und in der Zytokin-Produktion, was ebenfalls entscheidend zur Langzeitimmunität beiträgt (Bachmann und Kopf, 1999; Mittrucker et al., 2000). Bisher gibt es jedoch keine ausreichenden Daten beim Menschen darüber, welche Rolle Memory-B-Zellen für die Langzeitimmunität - z.B. nach Impfungen - spielen und ob diese stärker vom Antikörper-Titer oder den Memory-B-Zellen reflektiert wird.

## 1.6. Ziele der Arbeit

Wenn es um die Beurteilung des Impfschutzes und den Zeitpunkt von Reimmunisierungen geht, wurde bislang beim Menschen als alleiniger Parameter der Antikörper-Titer herangezogen. Über den Einfluß von Impfungen auf die antigenspezifischen Memory-B-Zellen und ihre Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunität ist jedoch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, **zunächst einen ELISPOT(Enzyme-linked immuno spot)-Test zu standardisieren**, der die Quantifizierung antigenspezifischer Memory-B-Zellen aus menschlichem Blut erlaubt. Es stellte sich die Frage, ob es mit diesem Test überhaupt möglich ist, antigenspezifische B-Zellen zu quantifizieren und welche Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Test besitzt.

Am Beispiel der Antigene Diphtherie- und Tetanustoxoid sollten dann nach Quantifizierung spezifischer Memory-B-Zellen und Bestimmung der Serumantitoxin-Titer bei 13 Probanden folgende zwei Aspekte der postvakzinalen Immunität untersucht werden:

### **1) Langzeiteffekte von Impfungen auf die Frequenz spezifischer Memory-B-Zellen und die Höhe spezifischer Antikörper-Titer**

Dabei ging es um die Beantwortung folgender Fragen: Nehmen Antikörper-Titer und Memory-B-Zellen mit der Zeit signifikant ab? Besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörper-Titer und der Anzahl der Memory-B-Zellen? Wird die Anzahl bisheriger Auffrischimpfungen mehr durch die Anzahl der Memory-B-Zellen oder mehr durch die Höhe des Antikörper-Titers reflektiert?

### **2) Kurzeiteffekte einer Auffrischimpfungen auf die Frequenz spezifischer Memory-B-Zellen und die Höhe spezifischer Antikörper-Titer**

Hier sollten folgende Fragen beantwortet werden: Welchen Einfluß hat die prävakzinale Frequenz spezifischer Memory-B-Zellen und der prävakzinale Antikörper-Titer auf die Boosterreaktion? Unterliegt die sekundäre Immunantwort einem Regulationsmechanismus zur Verhinderung einer klonalen Überexpansion? Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Anzahl bisheriger Impfungen und der Stärke der Boosterreaktion nach erneuter Auffrischimpfung? Welchen Einfluß hat die Zeit seit der vorletzten Impfung auf die postvakzinale Boosterreaktion?

## 2. PROBANDEN

Die Untersuchungen wurden an 13 freiwilligen Probanden im Alter von 22-40 Jahren (mittleres Alter: 27 Jahre, Standardabweichung: 5,6 Jahre) durchgeführt. Bei keinem der Probanden lag eine chronische Erkrankung oder ein Immundefekt vor, sie wurden eingehend über Ablauf und Zweck der Untersuchung informiert. Die Grundimmunisierung mit Tetanus- und Diphtherietoxoid erfolgte im Kindesalter, mit Ausnahme zweier Probanden, die keine Grundimmunisierung mit Diphtherietoxoid erhalten hatten. Die Auffrischimpfungen waren mit reduzierter Dosis des Diphtherietoxoids (2 IE) vorgenommen worden. Im Mittel lag die letzte Tetanusimpfung 82 Monate zurück (Standardabweichung: 66,9 Monate), die letzte Diphtherieimpfung 133 Monate (Standardabweichung: 129,6 Monate). **Tabelle 1** zeigt eine Auflistung der bei den Probanden erhobenen Daten.

Für die Etablierung des Testsystems wurde einigen der Probanden einmalig 100 ml Blut entnommen und periphere Blutlymphozyten (PBL) isoliert.

Für die Untersuchung der antigenspezifischen Immunität nach einer Diphtherieauffrischimpfung wurde den Probanden am Tag 0 150 ml Blut entnommen, danach erfolgte die Injektion von 0,5 ml Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff für Erwachsene (Firma Chiron-Behring) in den M. deltoideus. Die Impfung wurde von allen Probanden gut vertragen. Am 5. und 12. Tag, sowie 3 Monate nach der Impfung wurde den Probanden erneut jeweils 150ml Blut entnommen. Zu allen Zeitpunkten wurden Serum und PBL kryokonserviert. Die 4 Proben eines Impflings wurden immer gleichzeitig analysiert. Das trifft sowohl für die Bestimmung der Antitoxin-Titer als auch für die Quantifizierung der spezifischen Memory-B-Zellen mittels ELISPOT-Assay zu.

**Tabelle 1**

**Impfstatus der 13 erwachsenen Probanden, die an dieser Studie teilnahmen**

<b>Proband</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Grundimmuni- sierung mit D</b>	<b>Anzahl der Boosterimpf. mit d</b>	<b>Zeit seit der letzten d- Impfung [Mo- nate]</b>	<b>Grundimmuni- sierung mit T</b>	<b>Anzahl der Boosterimpf. mit T</b>	<b>Zeit seit der letzten T- Impfung [Mo- nate]</b>
<b>P 1</b>	32	m	nein	0	-----	ja	1	180
<b>P 2</b>	40	w	nein	0	-----	ja	5	36
<b>P 3</b>	37	w	ja	1	431	ja	5	49
<b>P 4</b>	22	w	ja	1	250	ja	3	62
<b>P 5</b>	24	m	ja	1	273	ja	1	273
<b>P 6</b>	24	m	ja	2	29	ja	5	29
<b>P 7</b>	24	w	ja	1	23	ja	4	25
<b>P 8</b>	23	m	ja	2	66	ja	3	66
<b>P 9</b>	23	w	ja	4	27	ja	5	78
<b>P 10</b>	30	w	ja	4	46	ja	5	46
<b>P 11</b>	25	w	ja	3	34	ja	5	87
<b>P 12</b>	23	m	ja	1	198	ja	2	52
<b>P 13</b>	25	w	ja	3	83	ja	4	83

**Legende:**

m=männlich

w=weiblich

D=Diphtherietoxoid, 75 IE (Kinderimpfstoff)

d=Diphtherietoxoid, 2 IE (Erwachsenenimpfstoff)

T=Tetanustoxoid

### **3. METHODEN**

#### **3.1. Bestimmung des Diphtherie- und Tetanus-Antitoxin-Spiegels mittels ELISA**

Die Diphtherie- und Tetanus-Serologie wurde mittels ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bestimmt (Tabelle 2). Die Tetanus-Antitoxin-Spiegel im Serum lagen zwischen 0,2 - 8,5 IU/ml, im Mittel bei 2,6 IU/ml (Standardabweichung: 1,51 IU/ml). Die Höhe des Antikörper-Titers, der Schutz vor einer Erkrankung bietet, liegt über 0,01 IU/ml.

Vergleicht man verschiedene ELISA-Test-Kits zur Bestimmung der Diphtherie-Antitoxin-Konzentration (Immunozyt-ELISA, Virion-ELISA, Virotech-ELISA, Ibl-ELISA, in vitro-ELISA), so liegt die Spezifität zwischen 56-100%, die Sensitivität zwischen 54-83% (Bigl und Drechsler, 1997). Dabei ist bei hoher Spezifität des ELISA die Sensitivität vergleichsweise niedrig und umgekehrt (Bigl und Drechsler, 1997). Zur Untersuchung unserer Probandenserum wurde der Immunozyt-ELISA verwendet. Bei 7 Probanden (P 8-13) zeigte sich ein schützender Diphtherie-Antitoxin-Titer  $> 0,1$  IU/ml. Die Werte lagen zwischen 0,13 - 0,5 IU/ml, im Mittel bei 0,28 IU/ml (Standardabweichung: 0,13 IU/ml). Bei den übrigen 6 Probanden (P 1-6) lag der Diphtherie-Antitoxin-Spiegel unter der Nachweisbarkeitsgrenze des ELISA. Die genaue Quantifizierung im Bereich  $< 0,1$  IU/ml ist aber wichtig, da im Bereich zwischen 0,01 - 0,1 IU/ml zwar kein Schutz, aber noch eine Grundimmunität besteht (Naumann et al., 1983). Daher mußte hier auf den empfindlicheren Neutralisationstest zur Antitoxin-Bestimmung zurückgegriffen werden.

#### **3.2. Bestimmung des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels mittels Neutralisationstest**

Serum-ELISA-Werte  $< 0,1$  IU/ml wurden dankenswerterweise in der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (Präsident PD Dr. med. habil. S. Bigl) untersucht.

Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Neutralisation von Diphtherietoxin durch spezifische Antikörper (Miyamura et al., 1974). Dabei wird Diphtherietoxin zu verschiedenen Serumverdünnungen gegeben. Dieses Gemisch wird anschließend mit VERO-Zellen, einer Zelllinie abstammend von haploiden Nierenfibroblasten der afrika-

nischen grünen Meerkatze, inkubiert und die zytotoxische Wirkung auf die Zellen untersucht. Anhand von mitgeführten Standards und der letzten noch zytoprotektiven Serumverdünnung läßt sich die Konzentration neutralisierender Antikörper berechnen.

Der Vorteil des Neutralisationstestes gegenüber dem ELISA besteht darin, daß nur Antikörper nachgewiesen werden, die den zytotoxischen Effekt von Diphtherietoxin inhibieren. Nichtprotektive Antikörper, die lediglich an das Toxin binden, ohne es zu neutralisieren, werden nicht erfaßt (Bigl und Drechsler, 1997). Die minimale nachweisbare Antikörperkonzentration im Neutralisationstest liegt bei 0,006 IU/ml. Die Spezifität und Sensitivität beträgt 100% (Bigl und Drechsler, 1997).

Bei den Probanden P 3-6, mit Titern im ELISA  $< 0,1$  IU/ml konnten im Neutralisationstest Diphtherie-Antitoxin-Spiegel im Bereich von 0,096 - 1,52 IU/ml nachgewiesen werden (Mittelwert: 0,59 IU/ml, Standardabweichung: 0,55 IU/ml, Tabelle 2). Bei den Probanden P 1-2 waren sowohl im ELISA als auch im Neutralisationstest keine Diphtherie-Antikörper nachweisbar. Diese Probanden hatten bisher keine Grundimmunisierung gegen Diphtherie erhalten. Für die Probanden P 8-13, die im ELISA schützende Antikörper-Titer  $> 0,1$  IU/ml zeigten, ergab der Neutralisationstest Diphtherie-Antitoxin-Werte  $> 3$  IU/ml. Diese Seren wurden nicht weiter untersucht. Durch die Diphtherie-Antitoxin-Bestimmung mit diesen 2 Testverfahren war es möglich, den Titer in niedrigen Bereichen ( $< 0,1$  IU/ml) durch den Neutralisationstest und in hohen Bereichen ( $> 0,1$  IU/ml) durch den ELISA-Test genau zu quantifizieren. Durch Bildung des Quotienten aus Neutralisationstest- und ELISA-Titerwerten ergab sich ein Faktor, mit dem sich die Werte des Neutralisationstestes in ELISA-Einheiten umrechnen ließen.

**Tabelle 2**  
**Tetanus- und Diphtherie-spezifische**  
**Antikörper bei 13 erwachsenen Probanden**  
**(Impfstatus siehe Tabelle 1)**

<b>Proband</b>	<b>Tetanus-Antitoxin ELISA [IU/ml]</b>	<b>Diphtherie-Antitoxin ELISA [IU/ml]</b>	<b>Diphtherie-Antitoxin NT [IU/ml]</b>
<b>P 1</b>	0,2	< 0,1	< 0,006
<b>P 2</b>	1,9	< 0,1	< 0,006
<b>P 3</b>	2,9	< 0,1	0,096
<b>P 4</b>	5,5	< 0,1	0,38
<b>P 5</b>	0,4	< 0,1	0,38
<b>P 6</b>	4,1	< 0,1	1,52
<b>P 7</b>	2,5	0,13	3
<b>P 8</b>	2	0,15	3
<b>P 9</b>	2,1	0,16	3
<b>P 10</b>	3,6	0,24	3
<b>P 11</b>	3,6	0,34	> 3
<b>P 12</b>	4,2	0,41	> 3
<b>P 13</b>	1	0,5	> 3

**Legende:**

NT=Neutralisationstest

**3.3. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Ficoll-Paque**

150 ml venöses Blut wurde zur Gerinnungshemmung mit Heparin 10 I.E./ml vermischt und im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Als Trennlösung diente Ficoll-Paque, ein hydrophiles Polymer mit einer Dichte von 1.077 g/ml bei 20°C. In silikonisierten Glasröhrchen (V-Form) wurden maximal 30 ml Blut über 10 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach Zentrifugation bei 400xg, 20°C für 35 Minuten bildeten die Blutbestandteile in Abhängigkeit von ihrem spezifischen Gewicht verschiedene Schichten im Glasröhrchen: über dem Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten befand sich die Trennlösung, darüber ein sichtbarer Ring aus mononukleären Zellen. Darauf

folgte der die Thrombozyten enthaltende Plasma/RPMI-Überstand. Dieser wurde mit einer Pasteurpipette soweit abgesaugt, daß der Lymphozytenring vollständig erhalten blieb. Nach vorsichtiger Abnahme des Lymphozytenringes mit einer Glaspipette und Resuspension mit der doppelten Menge RPMI 1640 erfolgte die Zentrifugation bei 500xg und 4°C für 10 Minuten. Der Waschvorgang mit Zentrifugation bei 300xg und 4°C für 10 Minuten wurde zweimal wiederholt.

### **3.4. Ermittlung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Im Lichtmikroskop stellten sich vitale Zellen hell dar, tote Zellen färbten sich mit dem Farbstoff blau an. Nach Auszählung wurde die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt: gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 10 000.

### **3.5. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden sie in Einfriermedium bestehend aus RPMI 1640, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20% fetalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und Aliquots von 1 ml oder 4 ml in Einfrier Röhrchen gegeben. Diese wurden in einer Isopropanol enthaltenden Einfrierbox (Fa. Nalgene) bei -70°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt.

Der Auftauvorgang sollte rasch und gleichmäßig erfolgen. Dazu wurden die Einfrier Röhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis sich der Probeninhalt bis auf einen Eiskern gelöst hatte. Sofort wurden die Zellen in 15 ml oder 50 ml Röhrchen gegeben, mit komplettem Medium aufgenommen und bei 300xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.



### **3.6. Durchflußzytometrie**

Mit dieser Methode wurden im Durchflußzytometer (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter) Zellen mit Hilfe eines Laserstrahls untersucht. Der Argon-Laser emittiert dabei Strahlen mit einer Wellenlänge von 480 nm. Beim Durchfluß der einzelnen Zelle kommt es zur Streuung der emittierten Wellenlänge. Dabei ist die Vorwärtslichtstreuung (FSC: forward scatter) ein Maß für die Größe einer Zelle und die Seitwärtslichtstreuung (SSC: side scatter) ein Maß für ihre Granulierung. So lassen sich z.B. Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten voneinander differenzieren. Desweiteren regt der Laser Fluorochrome zur Fluoreszenz an. Über 3 verschiedene Fluoreszenzkanäle können die emittierten Wellenlängen von 3 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen registriert werden. So können Zellen identifiziert werden, die einen Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörper an ein bestimmtes Oberflächenmolekül gebunden haben. Dabei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Dichte der Oberflächenmoleküle auf der Zellmembran. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den folgenden Versuchen verwendet: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC: emittierte Wellenlänge 530 nm) als Fluoreszenzfarbstoff 1, Phycoerythrin (PE: emittierte Wellenlänge 580 nm) als Fluoreszenzfarbstoff 2 und das PE Derivat Red 670 (emittierte Wellenlänge 670 nm) als Fluoreszenzfarbstoff 3.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte an einem angeschlossenen Rechner. Es wurden pro Messung 10000 Zählereignisse auf Datenträgern gespeichert und ausgewertet. Dabei ließen sich in einem Punktediagramm FSC und SSC oder jeweils 2 der 3 möglichen Fluoreszenzwellenlängen gegeneinander auftragen. In das Punktediagramm ließ sich ein Koordinatensystem so plazieren, daß die gesuchte Zellpopulation in einem Quadranten lag. Durch rechnerische Quadrantenanalyse konnte so die gesuchte Population quantifiziert werden.

### **3.7. Zellfärbung für die Durchflußzytometrie**

$2 \times 10^5$  PBL wurden pro Ansatz in Färbemedium PBS+ (Phosphat buffered saline) gewaschen und bei 1400 U und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100µl PBS+ in eine 96-well Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert, erneut zentrifugiert (1400 U, 4°C für 2 Minuten) und der Überstand ausgegossen. Die monoklonalen Antikörper FITC-anti-CD19 und PE-anti-CD3 wurden im Verhältnis 1:25

und 1:100 in PBS+ aufgenommen und je Ansatz 100µl davon auf das Zellsediment pipettiert. Die Zellen wurden resuspendiert und 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert, dann erneut zentrifugiert (1400 U, 4°C für 2 Minuten). Nach 2 weiteren Waschschritten wurden die Zellen mit 200µl PBS+ in ein FACS-Polystyrol-Meßröhrchen pipettiert und anschließend gemessen.

### **3.8. B-Zell-ELISPOT-Assay**

Zur Quantifizierung Antikörper sezernierender B-Zellen wurde ein B-Zell-ELISPOT-Assay (Enzyme-linked-Immuno-Spot-Assay) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Nachweis der von einer B-Zelle sezernierten Antikörper. Die Methode wurde 1983 von Sedgwick und Holt publiziert.

#### **3.8.1. Beschichtung der Platten**

Quadratische 25-Felderplatten (Feldgröße 1x1 cm) wurden mit Ziege-anti-Human Antikörper, Tetanustoxoid oder Diphtherietoxoid beschichtet (Coating). Ziege-anti-Human IgA+IgG+IgM Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml, Ziege-anti-Human IgG und Ziege-anti-Human IgM Antikörper wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml in 0,05 molarem Tris-Puffer, pH 9,5 aufgenommen. Die Konzentration der Toxoide wurden in LF/ml angegeben. Toxoide liegen immer als heterogenes Proteingemisch mit unterschiedlicher Immunreaktivität vor, da bei der Detoxifizierung der Toxine mit Formaldehyd inter- und intramolekulare Kopplungen entstehen. LF bedeutet Limes flocculationis oder Flockungseinheit und steht für die Menge Toxin oder Toxoid, die in Gegenwart von 1 IE Antitoxin in der kürzesten Zeit zu einer Flockung führt. Die LF-Einheiten geben somit den Gehalt an spezifischem Protein an und sind ein Maß für die Immunreaktivität des Toxoids. Tetanustoxoid wurde in einer Konzentration von 20 LF/ml und Diphtherietoxoid in einer Konzentration von 30 LF/ml in 0,05 molarem Tris-Puffer, pH 7,5 als Coating-Lösung benutzt. Die Platten wurden dann mit 1 ml der Coating-Lösung pro Feld über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung der Coating-Lösung wurden die Platten mit Hilfe einer 50 ml Spritze dreimal mit PBS/1% FCS gewaschen. Um unbesetzte Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurden die Platten 1 Stunde bei 20°C mit PBS/1% BSA inkubiert.

### **3.8.2. Aktivierung der B-Zellen**

Die Stimulation der PBL erfolgte mit SAC [1: 5000] und IL2 [35 IU/ml] bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$ /ml in komplettem Medium über 5 Tage. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation bei 1500 U, 20°C für 10 Minuten) und gezählt. Ein Teil der Zellen wurde durchflußzytometrisch auf ihre CD19- und CD3-Expression untersucht. Die restlichen Zellen stellte man in sterilen 2 ml Reaktionsgefäßen auf die gewünschte Zellzahl ein. Nach Entfernung der PBS/1%BSA-Lösung aus den Platten wurde 1 ml der Zellsuspension pro Feld eingesetzt und die Platten für 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurden die Zellen absolut erschütterungsfrei gelagert.

### **3.8.3. Entwicklung der Spots**

Nach Abgießen der Zellsuspension wurden die Platten dreimal mit PBS/1% FCS gewaschen und trockengeklopft. Die während der Inkubation von den B-Zellen synthetisierten und an die Platte gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe eines Entwicklungs-Antikörpers, an den das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, detektiert. AP-Ziege-anti-Human IgA+IgG+IgM und AP-Ziege-anti-Human IgG wurden 1: 1000, AP-Ziege-anti-Human IgM 1: 830 in PBS/1% BSA verdünnt. Es folgte die Inkubation der Platten mit 1 ml Antikörperlösung pro Feld für 4 Stunden bei 4°C. Nach Abgießen der Antikörperlösung wurden die Platten viermal mit kaltem PBS gewaschen und trockengeklopft, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als Substrat der alkalischen Phosphatase wurde 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) verwendet. Für die Substratlösung wurden pro Platte 25 ml Amino-Methyl-Propanol (AMP)-Substratpuffer in ein lichtgeschütztes 50 ml Röhrchen pipettiert und 25 mg BCIP-Pulver zugegeben. Nach Sterilfiltration (Filterporengröße 0,45µm) erfolgte die Erwärmung im Wasserbad auf 40°C. 3 g Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt wurden in 100 ml Ampuwa durch Kochen gelöst. Nach Abkühlung auf 40°C wurden 5 ml Agarose mit 25 ml der fertigen Substratlösung vermischt und 1 ml pro Feld eingesetzt. Die Platten wurden bis zur Verfestigung der Agarose bei 4°C, anschließend bei 20°C gelagert. Nach 2 Stunden wurden die ersten Spots, die jeweils eine Antikörper sezernierende B-Zelle repräsentierten, sichtbar.

### 3.8.4. Berechnung der B-Zellfrequenzen

Mit Hilfe des ELISPOT-Assays ließen sich B-Zellen quantifizieren, die IgG, IgM, anti-Tetanustoxoid- oder anti-Diphtherietoxoid-spezifische Antikörper sezernierten (Abb. 1). In jeweils einer Spalte der Platte wurden die PBL in einer Verdünnungsreihe von oben nach unten aufgetragen, die Spots je Feld ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Nachdem man den B-Zellanteil der PBL durchflußzytometrisch bestimmt hatte, ließ sich die Anzahl der Antikörper sezernierenden B-Zellen auf die Gesamtzahl der B-Zellen beziehen. Die ermittelte Frequenz spezifischer anti-Tetanustoxoid bzw. anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierender B-Zellen wurde in Beziehung gesetzt zur Anzahl aller IgG sezernierenden B-Zellen und als Prozentwert angegeben. Analog wurde die Frequenz der anti-Tetanustoxoid bzw. anti-Diphtherietoxoid IgM sezernierenden B-Zellen bestimmt.

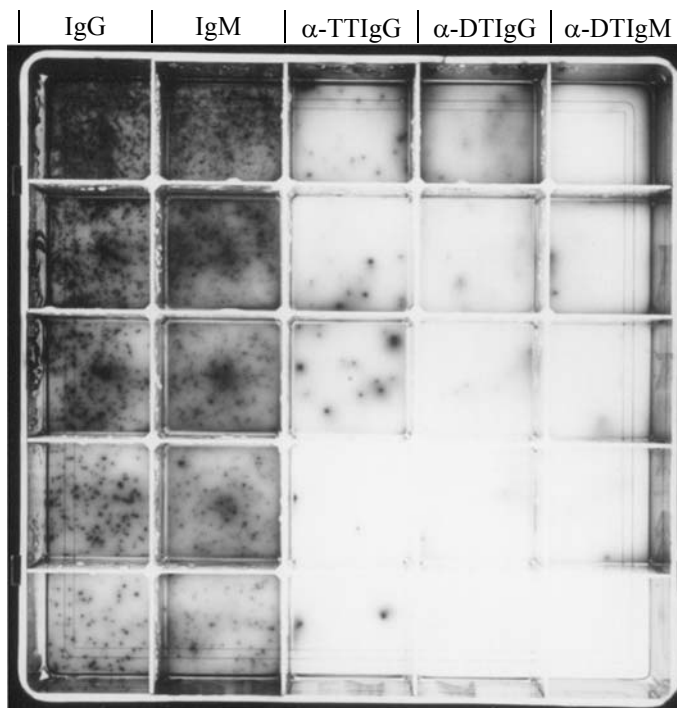
#### Berechnungsbeispiel:

1) Quantifizierung IgG sezernierender B-Zellen (Abb. 1, Spalte 1)

B-Zellanteil der PBL (nach 5 tägiger Inkubation)	18,9%
Mittelwert der ausgezählten Spots	133 Spots / $10^5$ PBL 133 Spots / 18 900 B-Zellen 7041 Spots / $10^6$ B-Zellen
Frequenz IgG sezernierender B-Zellen	<u>0,7% der gesamten B-Zellen</u>

2) Quantifizierung anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierender B-Zellen (Abb.1, Spalte 4)

B-Zellanteil der PBL (nach 5 tägiger Inkubation)	18,9%
Mittelwert der ausgezählten Spots	10 Spots / $10^7$ PBL 10 Spots / 1 890 000 B-Zellen
Frequenz der anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden B-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der IgG sezernierenden B-Zellen	133 IgG Spots / $10^5$ PBL 10 anti-Diphtherietoxoid IgG Spots / $10^7$ PBL <u>→ 0,075% anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierende B-Zellen</u>



**Abb. 1:** Photographie einer B-Zell ELISPOT-Platte

Oberhalb der Spalten sind die Antikörper sezernierenden B-Zellen angegeben, die in der jeweiligen Spalte quantifiziert wurden. Die PBL wurden in jeder Spalte, von oben nach unten pro Feld jeweils um den Faktor 2 verdünnt, pipettiert, beginnend mit  $10^6$  PBL in Spalte 1 und mit  $1,8 \times 10^7$  PBL in Spalte 4. Die Spots wurden ausgezählt und pro Spalte aus den Ergebnissen der einzelnen Felder der Mittelwert gebildet.

### **3.8.5. Kontrollen**

#### **3.8.5.1. Überprüfung der Beschichtungseffizienz**

Um die Beschichtung der Platten zu überprüfen, wurden folgende Kontrollen durchgeführt: Felder, die entweder mit Ziege-anti-Human IgG Antikörpern oder Ziege-anti-Human IgM Antikörpern oder Tetanustoxoid oder Diphtherietoxoid beschichtet worden waren, wurden mit Tetanus-Antitoxin- und Diphtherie-Antitoxin-positivem Humanserum über Nacht inkubiert. Nach Entwicklung mit AP-konjugiertem Ziege-anti-Human IgG bzw. Ziege-anti-Human IgM Antikörpern zeigte sich ein positiver Farbumschlag. Als Negativkontrolle diente ein mit der Blockierungs-Lösung PBS/1% BSA beschichtetes Feld, das nach Inkubation mit Humanserum und Entwicklung hell blieb.

#### **3.8.5.2. Nachweis Rinderserumalbumin (BSA)-spezifischer Spots**

Um BSA-spezifische Spots zu detektieren, wurden 2 Felder mit der Blockierungs-Lösung PBS/1%BSA beschichtet und nach Zugabe der PBL mit AP-konjugiertem Ziege-anti-Human IgG bzw. IgM Antikörper entwickelt. Diese Spots wurden bei der Berechnung spezifischer B-Zellfrequenzen mitberücksichtigt. Die Anzahl der IgG anti-BSA Spots lag zwischen 0 und 2 pro  $10^7$  PBL, die Anzahl der IgM anti-BSA Spots lag zwischen 0 und 140 pro  $10^7$  PBL.

### **3.9. Statistische Methoden**

Zeigten die mit der dritten Wurzel transformierten Werte keine wesentliche Abweichung von der Gaußverteilung, konnten parametrische Verfahren zur Berechnung der Pearsonschen Korrelation  $r$  verwendet werden. Bei nicht gaußverteilten, kontinuierlichen Werten wurde die Spearmannsche rho-Korrelation verwendet. Bei nicht gaußverteilten Werten, die Rangbindungen aufwiesen, wurde die Kendallsche tau-Korrelation verwendet. Die jeweiligen Korrelationen wurden für signifikant erachtet, wenn  $p \leq 0,05$  war. Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm WinMEDAS durchgeführt.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. Etablierung des B-Zell-ELISPOT-Systems (Vorversuche)**

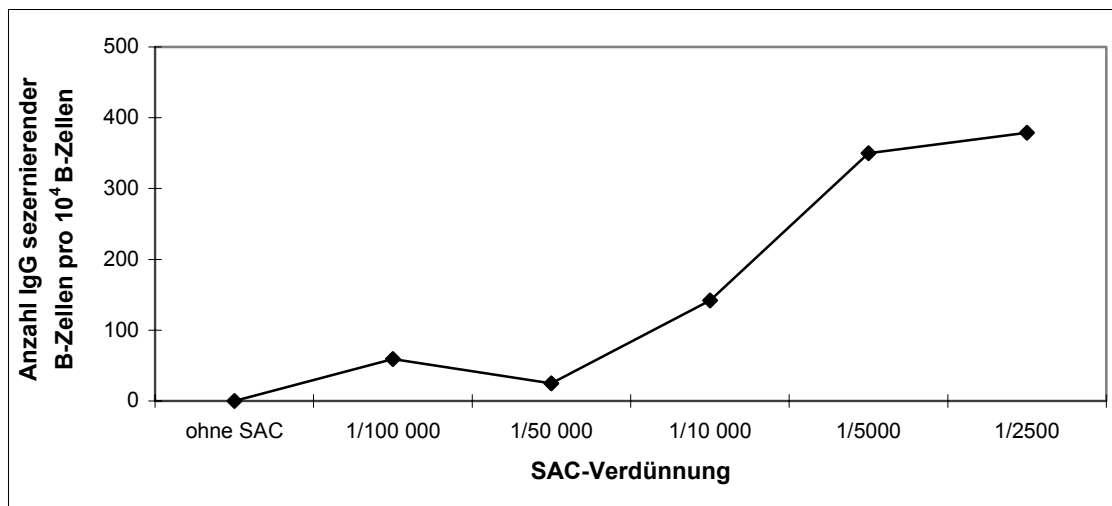
Das Prinzip des ELISPOT-Assays beruht auf dem Nachweis der von einer B-Zelle sezernierten Antikörper, die an beschichteten Platten haften und sich nach Entwicklung mittels einer Antikörper-Farbreaktion als Spot darstellen lassen. Der Test wurde erstmals 1983 von Sedgwick und Holt beschrieben. In dieser Arbeit wurde dieses Testsystem etabliert und optimiert, um Memory-B-Zellen zu quantifizieren, die nach Aktivierung in vitro Tetanus- und Diphtherietoxoid-spezifische Antikörper sezernieren. Die Inkubationszeit der PBL auf der Testplatte betrug jeweils 16 Stunden, da in diesem Bereich, gemäß einem Protokoll von Czerkinsky et al. (1983), die Anzahl der Spots ein Optimum erreicht. Alle Vorversuche wurden einmalig durchgeführt, die in den Abbildungen dargestellten Werte für die Anzahl der B-Zellen wurden, wie unter Abschnitt 3.8.4 beschrieben, berechnet.

#### **4.1.1. In-vitro-Aktivierung von PBL mit SAC und IL2**

Da der Anteil der spontan Antikörper sezernierenden B-Zellen im peripheren Blut gering ist, mußte mittels polyklonaler Aktivatoren wie SAC und IL2 die Differenzierung der B-Zellen in Antikörper sezernierende Zellen induziert werden.

Es wurde zunächst der Einfluß von SAC/IL2 auf die Anzahl der IgG/IgA/IgM sezernierenden B-Zellen untersucht. Dazu wurden PBL ohne SAC/IL2-Stimulation und nach 5-tägiger Stimulation mit SAC (Verdünnung 1: 10 000) und IL2 (50 IU/ml) in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml im ELISPOT-Assay analysiert. Die Anzahl der Antikörper sezernierenden B-Zellen ließ sich dabei durch Stimulation um das 43 fache steigern.

Um die optimale SAC-Verdünnung für die Zellstimulation zu bestimmen, wurden Verdünnungen zwischen 1: 100 000 und 1: 2500 sowie ein Ansatz ohne SAC getestet und IgG sezernierende B-Zellen im ELISPOT-Assay quantifiziert (Abb. 2). Bei SAC-Verdünnungen von 1: 5000 und 1: 2500 wurde ein optimaler Konzentrationsbereich erreicht. Wenn nicht anders angegeben, wurde für alle weiteren Experimente eine SAC-Verdünnung von 1: 5000 zur Zellstimulation verwendet.

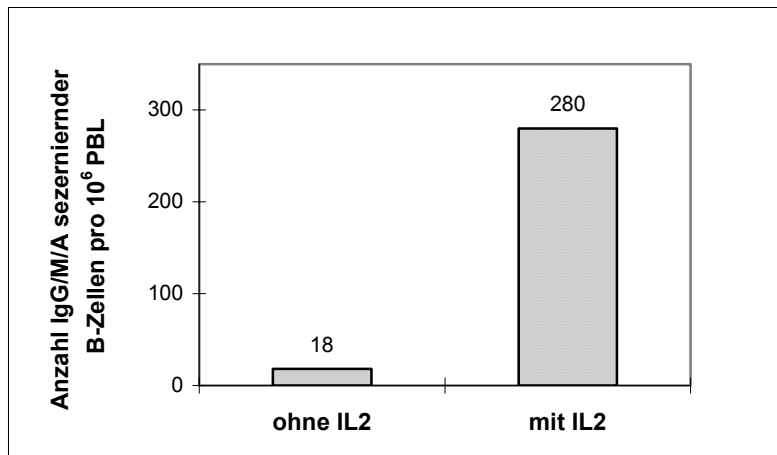


**Abb. 2:** Einfluß der SAC-Konzentration in der Zellkultur auf die Anzahl der IgG sezernierenden B-Zellen. PBL wurden mit IL2 [35 IU/ml] und unterschiedlichen SAC-Konzentrationen 5 Tage lang stimuliert und danach im ELSPOT-Assay untersucht.

Desweiteren wurden PBL für 5 Tage mit SAC (1: 10 000) ohne IL2 oder mit IL2 in einer Konzentration von 50 IU/ml inkubiert. Das Ergebnis des ELISPOT-Assays ist in Abb. 3 dargestellt. Durch Zugabe von IL2 während der Zellstimulation konnte die Anzahl der IgG/IgM/IgA sezernierenden B-Zellen pro 10<sup>6</sup> PBL um das 16 fache gesteigert werden.

In einem weiteren Versuch wurden IL2-Konzentrationen von 25 IU/ml, 40 IU/ml und 50 IU/ml eingesetzt. Es zeigte sich, daß in diesem Konzentrationsbereich die Anzahl der im ELISPOT ermittelten Ig sezernierenden B-Zellen konstant blieb. Dies galt sowohl für IgG/IgM sezernierende B-Zellen, als auch für anti-Tetanustoxoid IgG sezernierende B-Zellen. Für weitere Experimente wurde eine IL2 Konzentration von 35 IU/ml für die Zellstimulation verwendet.

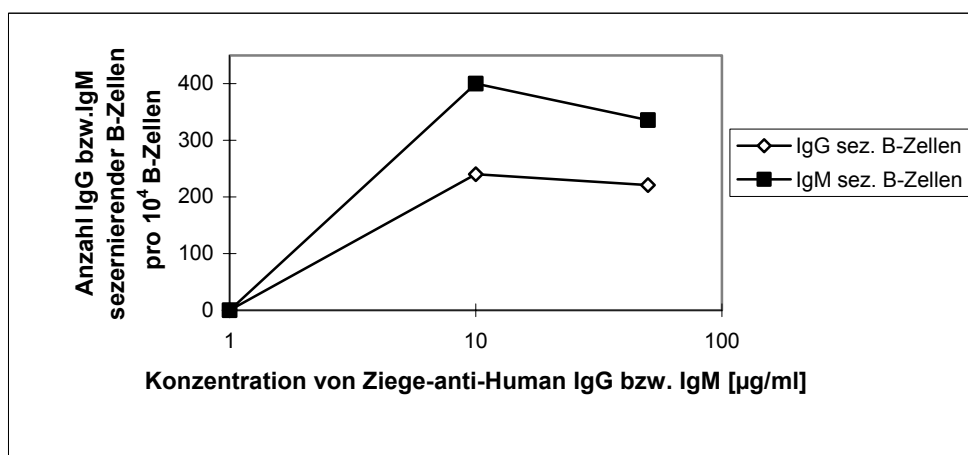




**Abb. 3:** Einfluß von IL2 auf die B-Zellstimulation mit SAC. PBL wurden mit SAC [Verdünnung 1: 10 000] ohne und mit IL2 [50 IU/ml] stimuliert und im ELISPOT-Assay untersucht.

#### 4.1.2. Beschichtung der ELISPOT-Platten mit Antikörpern

Zur Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration des Ziege-anti-Human IgG bzw. des Ziege-anti-Human IgM Antikörpers wurden diese in Konzentrationen zwischen 1 und 50 µg/ml Tris-Puffer verwendet (Abb. 4). Für beide Antikörper ergab sich eine optimale Konzentration zwischen 10 und 50 µg/ml, wobei die Spots bei höheren Konzentrationen besser abgrenzbar waren. Für weitere Experimente wurde eine Antikörper-Konzentration von 20 µg/ml gewählt.

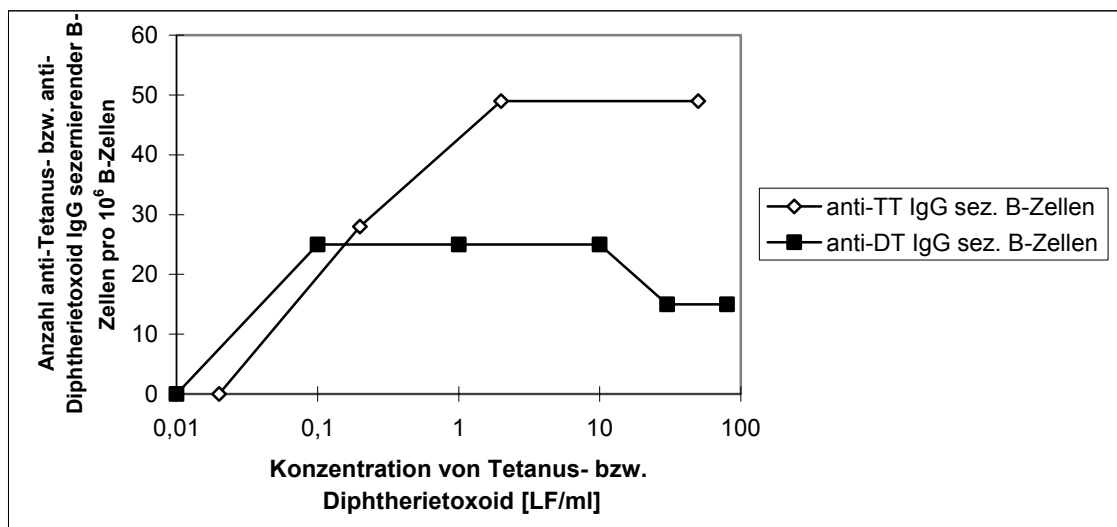


**Abb. 4:** Einfluß der Beschichtungskonzentration des Ziege-anti-Human IgG bzw. IgM Antikörpers auf die Anzahl der IgG bzw. IgM sezernierenden B-Zellen (x-Achse logarithmisch skaliert).

#### 4.1.3. Beschichtung der ELISPOT-Platten mit Diphtherie- und Tetanustoxoid

Zur Bestimmung der Beschichtungskonzentration wurde Tetanustoxoid in Konzentrationen von 0,02 bis 50 LF/ml eingesetzt (Abb. 5). Es zeigte sich ein optimaler Bereich zwischen 2 und 50 LF/ml, wobei die Spots bei höheren Konzentrationen schärfer abgrenzbar waren. Für weitere Experimente wurde eine Beschichtungskonzentration von 20 LF/ml benutzt.

Für Diphtherietoxoid wurden Beschichtungskonzentrationen von 0,01 bis 80 LF/ml ausgetestet (Abb. 5). Die optimale Konzentration lag im Bereich zwischen 0,1 und 80 LF/ml; 30 LF/ml wurden für weitere Experimente verwendet. Auch hier ließen sich die Spots bei höheren Konzentrationen besser abgrenzen.



**Abb. 5:** Einfluß der Beschichtungskonzentrationen von Tetanus- bzw. Diphtherietoxoid auf die Anzahl der anti-Tetanustoxoid- bzw. anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden B-Zellen (x-Achse logarithmisch skaliert).

#### 4.1.4. Spezifitätskontrollen

Die Versuche zur Prüfung der Spezifität sind nicht im einzelnen dargestellt. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1) Weder die von den B-Zellen im ELISPOT-Assay sezernierten Antikörper noch die AP-konjugierten Entwicklungs-Antikörper zeigten eine unspezifische Bindung an die

unbeschichtete Platte oder an das zur Blockierung verwendete bovine Serumalbumin (BSA).

2) Beschichtungs- und Entwicklungs-Antikörper, die für den Nachweis nur einer Immunglobulin-Klasse bestimmt waren, detektierten spezifisch nur diese Immunglobulin-Klasse.

3) Eine unspezifische Bindung des Entwicklungs-Antikörpers an den Beschichtungs-Antikörper oder an Tetanus- oder an Diphtherietoxoid konnte ausgeschlossen werden.

4) An Tetanus- oder Diphtherietoxoid beschichtete Platten wurden nur die spezifischen Antikörper, nicht aber Antikörper anderer Spezifität gebunden.

#### **4.1.5. Reproduzierbarkeit**

Von einem Probanden, der seit der Grundimmunisierung 6 Tetanus- und 3 Diphtherie-Auffrischimpfungen erhalten hatte, wurde zu 4 verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen und im ELISPOT-Assay untersucht. Die Quantifizierung IgG anti-Tetanustoxoid sezernierender B-Zellen ergab im Mittel eine Frequenz von 1,83% bei einer Standardabweichung von 0,49%. Die Frequenz von IgG anti-Diphtherietoxoid sezernierenden B-Zellen betrug im Mittel 0,33%, mit einer Standardabweichung von 0,014%. Daraus kann man schließen, daß das ELISPOT-Testsystem eine relativ hohe Reproduzierbarkeit besitzt.

#### **4.1.6. Verwendung von kryokonservierten Zellen**

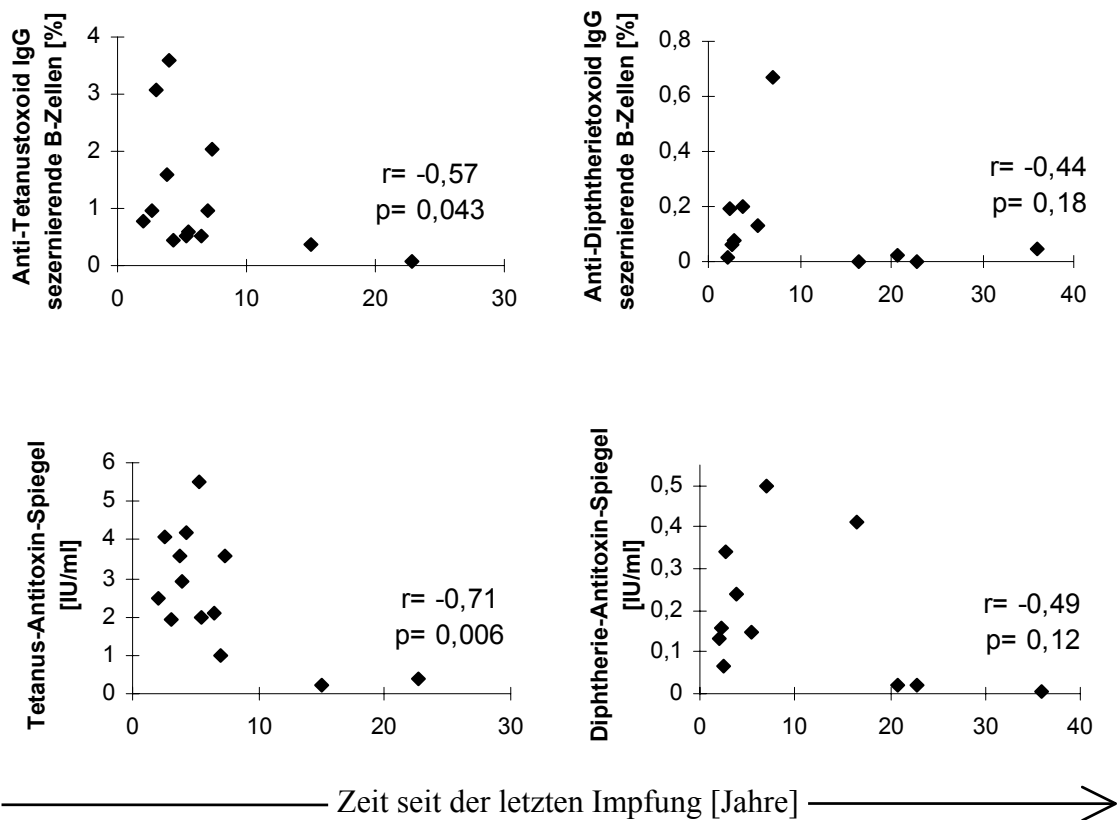
In den bisherigen Voruntersuchungen wurden ausschließlich frisch isolierte Blutlymphozyten eingesetzt. Um die Frage zu beantworten, ob sich für den ELISPOT-Assay auch kryokonservierte Zellen verwenden lassen, wurden PBL direkt ex-vivo und nach Kryokonservierung vergleichend untersucht. Die Anzahl Antikörper sezernierender B-Zellen war in beiden Ansätzen identisch. Der B-Zellanteil der PBL vor Kryokonservierung betrug 6,1% und nach dem Auftauen 5,9%. Für alle weiteren Experimente wurden deshalb kryokonservierte Zellen verwendet.

## **4.2. Untersuchungen über die Langzeitwirkung von Diphtherie- und Tetanus-schutzimpfungen auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Höhe der Serumentoxin-Spiegel**

### **4.2.1. Einfluß des Zeitintervalls seit der letzten Auffrischimpfung auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Antitoxin-Titer**

Den Zusammenhang zwischen der Länge des Zeitintervalls seit der letzten Auffrischimpfung und der Frequenz der antigenspezifischen B-Zellen bzw. der Höhe des spezifischen Antikörper-Titers zeigt Abb. 6. Die letzte Auffrischimpfung gegen Tetanus erfolgte im Mittel vor 82 Monaten (Standardabweichung 66,9 Monate), gegen Diphtherie im Mittel vor 133 Monaten (Standardabweichung 129,6 Monate; Tab. 1). Sowohl die Anzahl der Tetanustoxoid-spezifischen Memory-B-Zellen als auch die Höhe des Tetanus-Antitoxin-Titers nahmen mit der Zeit seit der letzten Impfung signifikant ab ( $r = -0,57$ ,  $p = 0,043$  und  $r = -0,71$ ,  $p = 0,006$  nach Transformation der x-Werte mit der dritten Wurzel und Logarithmierung der y-Werte als Produkt-Moment-Korrelation). Für die Diphtherietoxoid-spezifischen Memory-B-Zellen und den Diphtherie-Antitoxin-Titer fand sich keine signifikante Abnahme mit der Zeit ( $r = -0,44$ ,  $p = 0,18$  und  $r = -0,49$ ,  $p = 0,12$  nach Transformation der x-Werte mit der dritten Wurzel und Logarithmierung der y-Werte als Produkt-Moment-Korrelation).

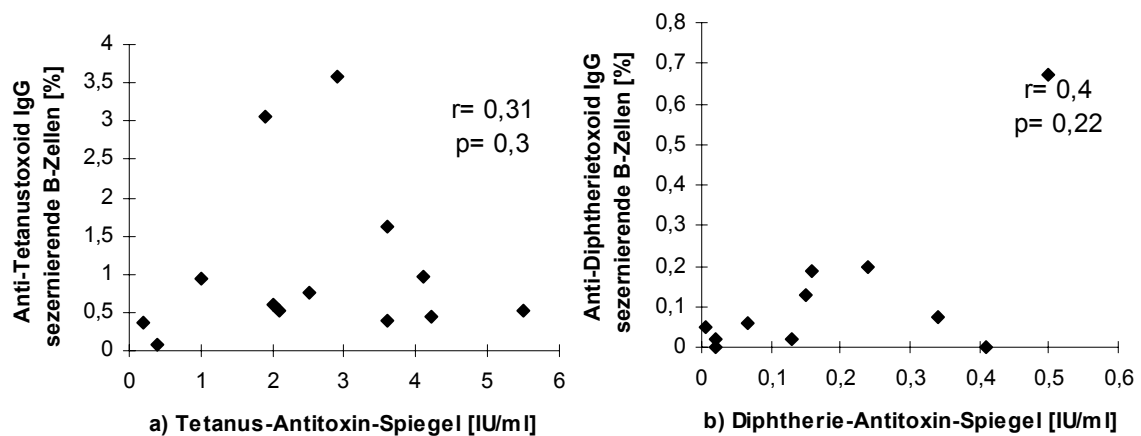
Die Frequenz der Tetanustoxoid-spezifischen Memory-B-Zellen betrug im Mittel 1,19% (Standardabweichung 1,05%). Sie war im Mittel 9 mal höher als die mittlere Frequenz der Diphtherietoxoid-spezifischen B-Zellen mit 0,13% (Standardabweichung 0,18%). Ein vergleichbarer Unterschied ließ sich auch zwischen den Tetanus- und Diphtherie-Antitoxin-Spiegeln feststellen.



**Abb. 6:** Einfluß der Zeit seit der letzten Tetanus-Auffrischimpfung (links) bzw. Diphtherie-Auffrischimpfung (rechts) auf die antigenspezifischen B-Zellfrequenzen (oben) und die antigenspezifischen Antikörper-Titer (unten). Jeder Punkt repräsentiert das Datenpaar aus einer Einzelmessung der Werte eines Probanden. Die Korrelationskoeffizienten der Produkt-Moment-Korrelation beziehen sich auf die mit der dritten Wurzel transformierten x-Werte und die logarithmierten y-Werte.

#### 4.2.2. Korrelation zwischen antigenspezifischen Antikörper-Titern und B-Zellfrequenzen

Untersuchte man den Zusammenhang zwischen spezifischen Antikörper-Titern und B-Zellfrequenzen, so war die Höhe des Tetanus-Antitoxin-Spiegels völlig unabhängig von der Frequenz Tetanustoxoid-spezifischer IgG sezernierender B-Zellen ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,3$  Produkt-Moment-Korrelation der transformierten Werte, Abb. 7). Auch der Diphtherie-Antitoxin-Spiegel korrelierte nicht mit den Diphtherietoxoid-spezifischen B-Zellfrequenzen ( $r = 0,4$ ;  $p = 0,22$ , Produkt-Moment-Korrelation der transformierten Werte, Abb. 7).

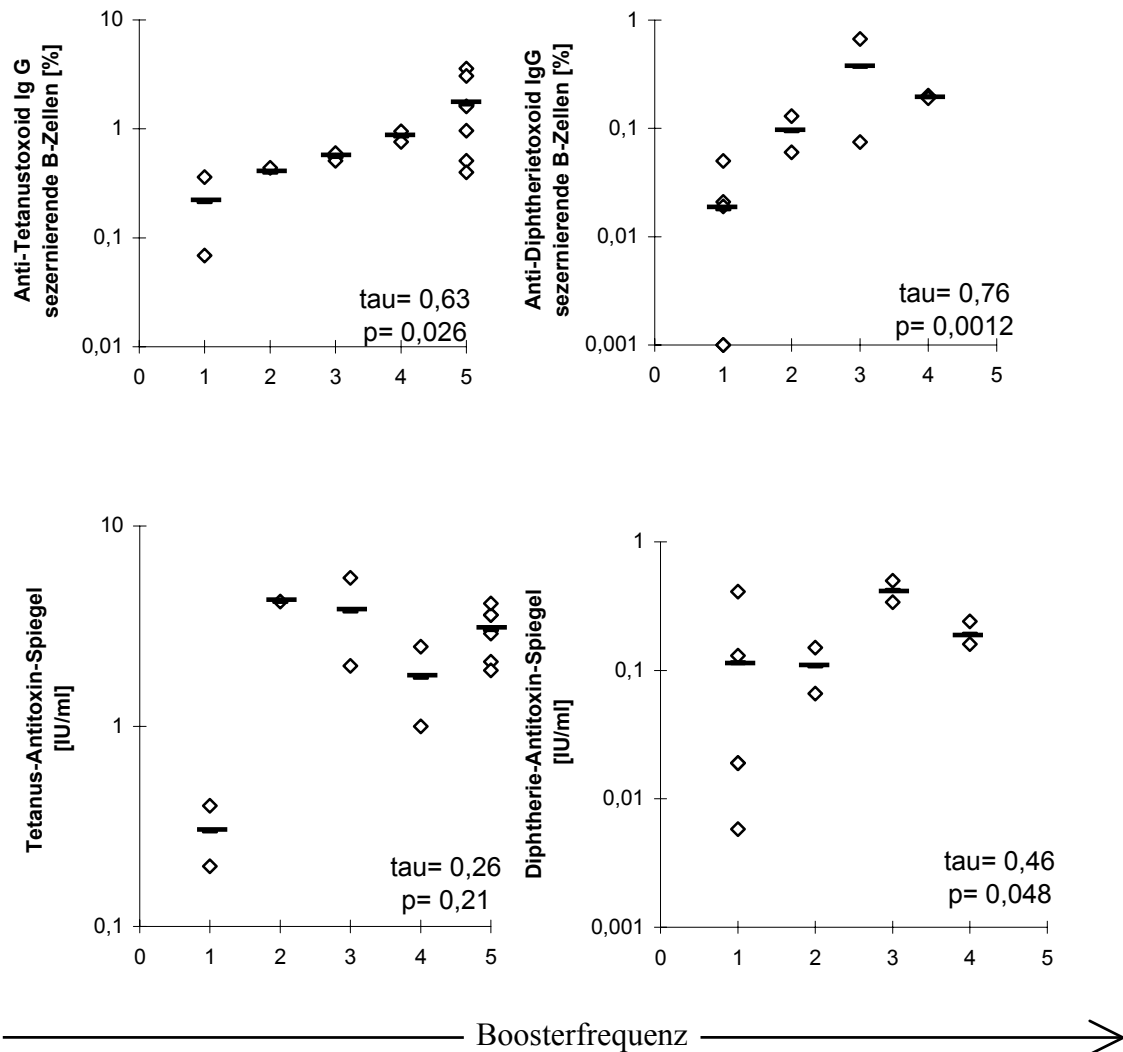


**Abb. 7:** Korrelation zwischen den antigenspezifischen Antikörper-Titern und B-Zellfrequenzen. (a) Tetanustoxoid-Antigen, (b) Diphtherietoxoid-Antigen. Jeder Punkt repräsentiert das Datenpaar aus einer Einzelmessung der Werte eines Probanden. Die Korrelationskoeffizienten der Produkt-Moment-Korrelation beziehen sich auf die transformierten Werte.

#### 4.2.3. Einfluß der Anzahl an Auffrischimpfungen auf die antigenspezifischen B-Zellfrequenzen und die Antitoxin-Titer

Die Anzahl der Auffrischimpfungen der Probanden variierten für Diphtherietoxoid zwischen 1 und 4 und für Tetanustoxoid zwischen 1 und 5. Zwischen der Anzahl an Boosterimmunisierungen und der Frequenz antigenspezifischer Memory-B-Zellen bestand eine hoch signifikante Korrelation sowohl für Tetanustoxoid ( $\tau = 0,63$ ,  $p = 0,0026$  nach Kendallscher tau-Korrelation) als auch für Diphtherietoxoid ( $\tau = 0,76$ ;  $p = 0,0012$ , nach Kendallscher tau-Korrelation; [Abb. 8](#)).

Im Gegensatz dazu korrelierte die Anzahl der Auffrischimpfungen nicht mit der Höhe des Tetanus-Antitoxin-Spiegels ( $\tau = 0,26$ ,  $p = 0,21$  nach Kendallscher tau-Korrelation) und nur schwach mit der Höhe des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels ( $\tau = 0,46$ ,  $p = 0,048$  nach Kendallscher tau-Korrelation; [Abb. 8](#)).



**Abb. 8:** Einfluß der Anzahl an Tetanus-Boosterimmunisierungen (links) bzw. Diphtherie-Boosterimmunisierungen (rechts) auf die Frequenz antigenspezifischer IgG sezernierender B-Zellen (oben) und auf die antigenspezifischen Antikörper-Titer (unten). ( $\diamond$ ) steht für das Datenpaar eines Probanden aus einer Einzelmessung, (—) für den Mittelwert (y-Achse logarithmisch skaliert). Zur Berechnung der Korrelation wurde die Kendallsche tau-Korrelation verwendet.

### 4.3. Untersuchungen über die Immunreaktionen nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung

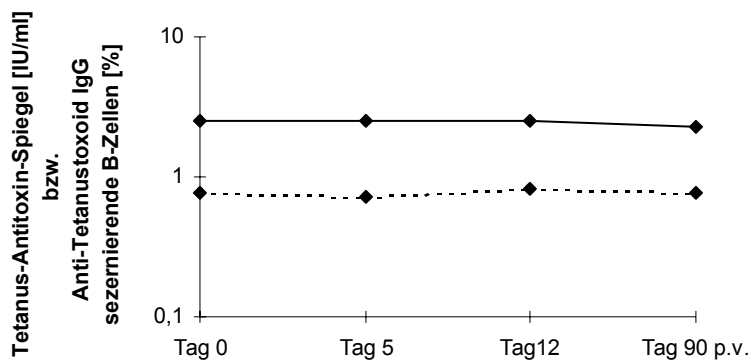
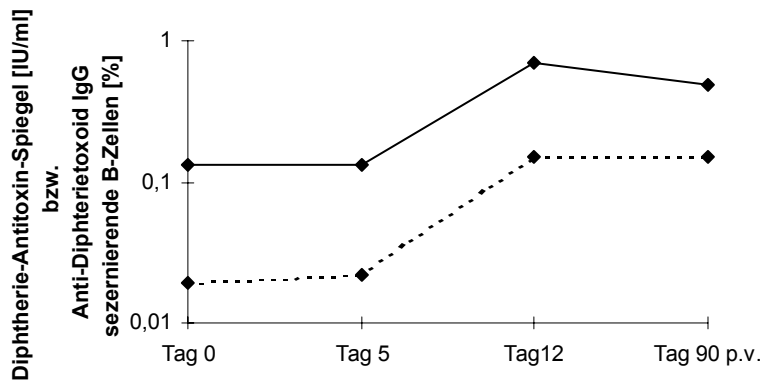
Nach bisher publizierten Untersuchungen (Czerkinsky et al., 1988) ist der optimale Zeitpunkt zur Untersuchung antigenspezifischer Antikörper sezernierender B-Zellen nach einer Impfung der 5. und der 12. Tag post vaccinationem (p. v.). An diesen

Tagen liegt die Frequenz Impfantigen-spezifischer, spontan Antikörper sezernierender B-Zellen im peripheren Blut am höchsten (Stevens and Saxon, 1978; Stevens et al., 1979). Daher untersuchten wir die antigenspezifischen Antikörper sezernierenden B-Zellen und die Antikörper-Titer an Tag 5, Tag 12 und 3 Monate nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung.

#### **4.3.1. Boosterung der antigenspezifischen Memory-B-Zellen und der Antikörper-Titer**

Nach der erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung kam es bei allen 11 grundimmunisierten Probanden zu einem starken Anstieg der Diphtherietoxoid-spezifischen, IgG sezernierenden B-Zellen und des Diphtherie-Antitoxin-Titers. Der Anstieg beider Parameter erreichte sein Maximum am 12. Tag p. v.. Am Tag 90 nach der Auffrischimpfung waren die impfspezifischen B-Zellfrequenzen und die Antikörper-Titer entweder konstant geblieben oder leicht abgefallen. Im Gegensatz dazu blieben die Frequenzen der Tetanustoxoid-spezifischen, IgG sezernierenden B-Zellen und die Tetanus-Antitoxin-Spiegel über den ganzen Zeitraum auf gleicher Höhe. Abb. 9 zeigt beispielhaft die Daten des Probanden P7 (siehe Tab. 1).





**Abb. 9:** Diphtherie-Antitoxin-Spiegel (—◆—) und anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierende B-Zellen (- - -◆- - -) (oben) sowie Tetanus-Antitoxin-Spiegel (—◆—) und anti-Tetanustoxoid IgG sezernierende B-Zellen (- - -◆- - -) (unten) am Tag 0, Tag 5, Tag 12 und Tag 90 nach erneuter Diphtherie-Auffrischimpfung am Tag 0. Proband P7. (y-Achse logarithmisch skaliert).

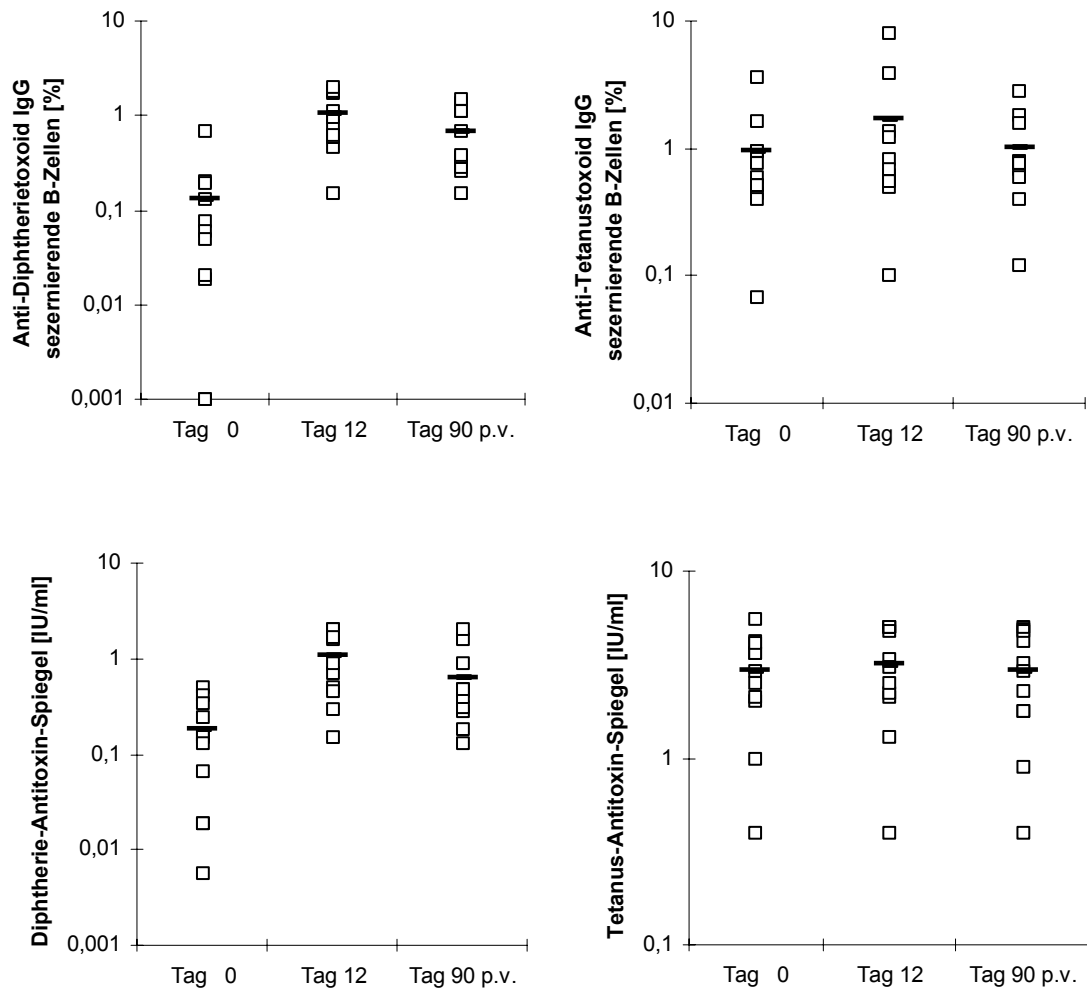
In Abb. 10 sind die Frequenzen der antigenspezifischen IgG sezernierenden B-Zellen und die Antitoxin-Titer aller Probanden nach der erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung zusammengestellt. Abb. 11 zeigt die antigenspezifischen IgM sezernierenden B-Zellfrequenzen aller Probanden p. v..

Am 12. Tag nach der Impfung waren die Frequenzen Diphtherie-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen im Mittel von 0,13% am Tag 0 auf 1,09% angestiegen. Das entsprach einer durchschnittlichen Steigerung um das 8 fache des Ausgangswertes. 3 Monate p. v. fiel die mittlere Frequenz der anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden

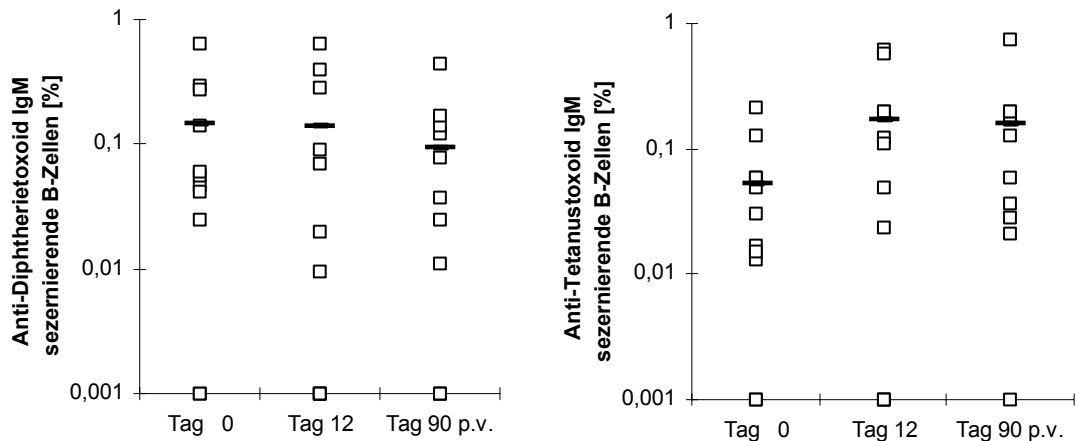
B-Zellen auf 0,68% ab. Der mittlere Diphtherie-Antitoxin-Spiegel zeigte einen ähnlichen Verlauf; er stieg von 0,19 IU/ml am Tag 0 um das 5,8 fache auf 1,1 IU/ml am Tag 12, um dann 3 Monate nach der Impfung auf 0,65 IU/ml abzufallen.

Hingegen blieben die Frequenzen Tetanus-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen und die Tetanus-Antitoxin-Spiegel über den ganzen Zeitraum (Tag 0 - Tag 90) auf etwa gleicher Höhe (Abb. 10). Zusätzlich konnte bei den zwei Probanden ohne Grundimmunisierung gegen Diphtherie gezeigt werden, daß eine einzige Impfung zu keinem Anstieg spezifischer Antikörper und/oder spezifischer B-Zellen führt (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung spricht für die hohe Spezifität des vorliegenden Testsystems.

Die Frequenzen der Diphtherietoxoid-spezifischen, IgM sezernierenden B-Zellen verhielten sich nach der Impfung bei den einzelnen Probanden sehr unterschiedlich. Sie fielen ab, blieben auf gleicher Höhe oder stiegen an. Im Mittel blieb ihre Frequenz mit 0,14% p. v. konstant (Abb. 11). Die mittlere Frequenz der anti-Tetanustoxoid IgM sezernierenden B-Zellen stieg von 0,05% am Tag 0 auf 0,17% an den Tagen 12 und 90 p. v. an (Abb. 11). Sie blieb somit im Gegensatz zu den Tetanustoxoid-spezifischen, IgG sezernierenden B-Zellfrequenzen nach der Diphtherie-Auffrischimpfung nicht konstant. Da sich somit unspezifische Einflüsse auf die IgM sezernierenden B-Zellfrequenzen stark auszuwirken schienen, konnte keine Aussage über das Verhalten anti-Diphtherietoxoid IgM sezernierender B-Zellen nach einer Diphtherie-Impfung gemacht werden.



**Abb. 10:** Immunantwort von 11 Probanden an den Tagen 0, 12 und 90 nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung. Frequenzen Diphtherietoxoid-spezifischer IgG sezernierender B-Zellen (links, oben), Diphtherie-Antitoxin-Spiegel (links, unten). Frequenzen Tetanustoxoid-spezifischer IgG sezernierender B-Zellen (rechts, oben), Tetanus-Antitoxin-Spiegel (rechts, unten). ( $\square$ ) steht für das Datenpaar eines Probanden, (—) für den Mittelwert der Daten aller Probandeneinzelmessungen (y-Achse logarithmisch skaliert).

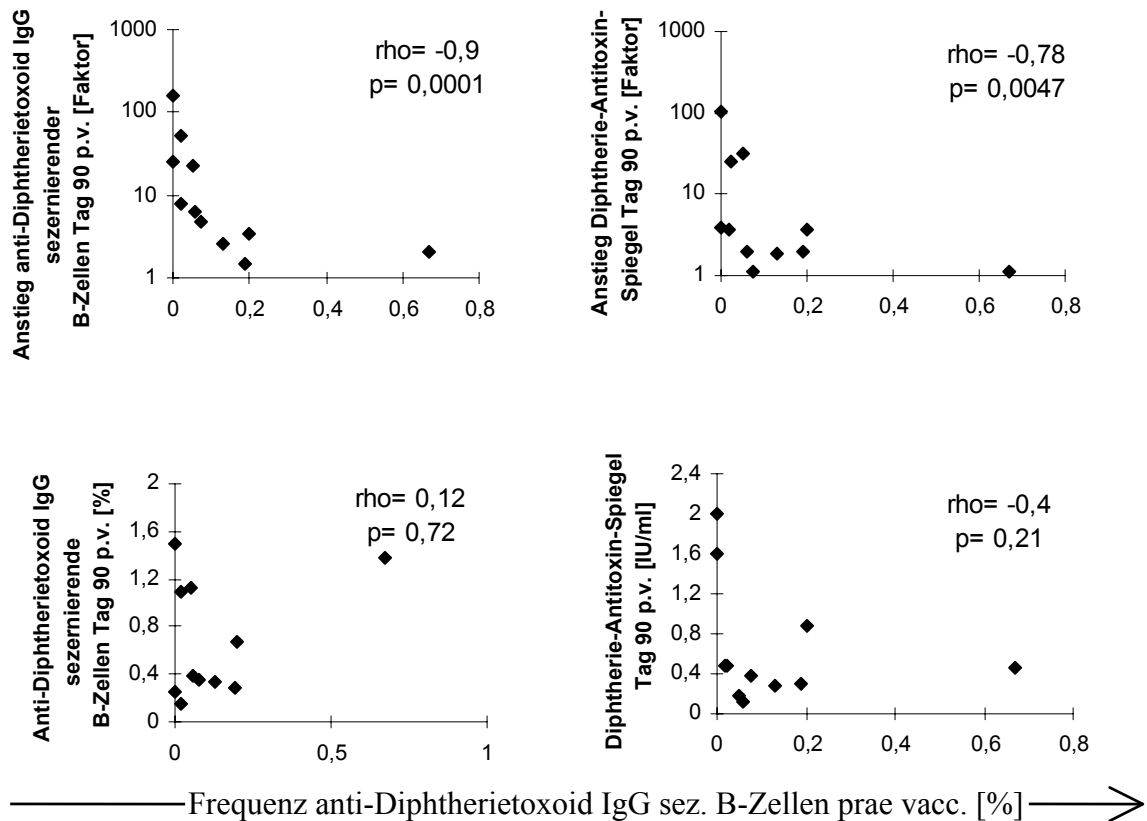


**Abb. 11:** Immunantwort von 11 Probanden an den Tagen 0, 12 und 90 nach einer Diphtherie-Auffrischimpfung. Frequenzen Diphtherietoxoid-spezifischer, IgM sezernierender B-Zellen (links), Frequenzen Tetanustoxoid-spezifischer, IgM sezernierender B-Zellen (rechts). (□) steht für das Datenpaar eines Probanden, (—) für den Mittelwert der Daten aller Probandeneinzelmessungen (y-Achse logarithmisch skaliert).

#### 4.3.2. Einfluß der prävakzinalen Frequenz antigenspezifischer B-Zellen auf die Boosterreaktion

Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl Diphtherietoxoid-spezifischer, IgG sezernierender Memory-B-Zellen vor einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung und der Stärke der Boosterreaktion nach der Impfung. Je niedriger die prävakzinale Frequenz Diphtherietoxoid-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen war, desto stärker stiegen Diphtherietoxoid-spezifische B-Zellen und Antikörper-Titer an den Tagen 12 und 90 nach der Impfung an ( $\rho = -0,9$ ,  $p = 0,0001$  und  $\rho = -0,78$ ,  $p = 0,0047$  nach Spearman'scher rho-Korrelation, Tag 90 p.v., [Abb. 12](#) (oben)). Diese Korrelation ist hoch signifikant. Der Anstiegsfaktor errechnete sich aus dem Quotienten der Werte an den Tagen 90 und 0. Lagen die prävakzinalen Diphtherietoxoid-spezifischen, IgG sezernierenden B-Zellen unter 0,1%, waren sie am 90. Tag p. v. um das 4,8 - 160 fache, im Mittel auf das 40 fache ihres Ausgangswertes, angestiegen. Lagen die prävakzinalen B-Zellfrequenzen über 0,1%, so stiegen sie auf das 1,5 - 3,4 fache, im Mittel auf das 2,4 fache an. Der Diphtherie-Antitoxin-Titer stieg im Mittel auf das 24,6 fache am Tag 90 p. v. an (Streubreite 1,2 - 105,3), wenn die prävakzinalen B-Zellfrequenzen we-

niger als 0,1% betragen. Hingegen stieg er im Mittel lediglich auf das 2,1 fache an (Streubreite 1,1 - 3,7), wenn die B-Zellfrequenzen vor der Impfung über 0,1% lagen.



**Abb. 12:** Einfluß der prävakzinalen Frequenz Diphtherietoxoid-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen auf den Anstieg Diphtherietoxoid-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen bzw. Antitoxin-Titer (oben; y-Achse logarithmisch skaliert) und auf die Anzahl Diphtherietoxoid-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen bzw. Antitoxin-Titer (unten) am Tag 90 nach einer Diphtherie-Auffrischimpfung. Jeder Punkt repräsentiert das Datenpaar aus einer Einzelmessung der Werte eines Probanden. Zur Berechnung der Korrelation wurde die Spearmansche rho-Korrelation verwendet.

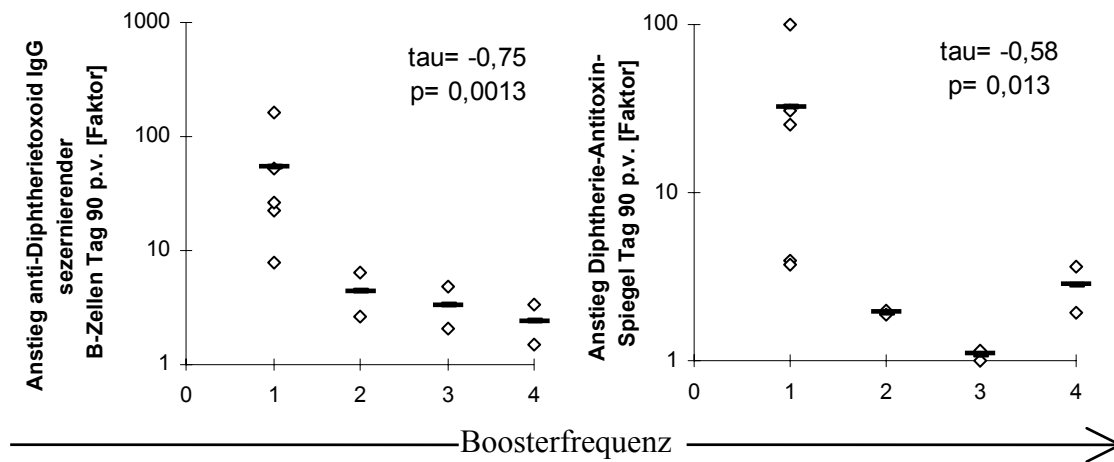
Die Anzahl antigenspezifischer B-Zellen bzw. die Höhe des Antitoxin-Titers 12 bzw. 90 Tage p. v. waren unabhängig von der Frequenz spezifischer B-Zellen vor der Impfung ( $\rho = 0,12$ ,  $p = 0,72$  bzw.  $\rho = -0,41$ ,  $p = 0,21$ ; Abb. 12 (unten), Tag 90 p. v.).

Sowohl bei prävakzinalen Frequenzen  $<0,1\%$  als auch bei Frequenzen  $>0,1\%$  betrug der Mittelwert spezifischer B-Zellen am Tag 90 p. v.  $0,69\%$  (Standardabweichung  $0,49\%$  bzw.  $0,43\%$ ). Der mittlere Diphtherie-Antitoxin-Spiegel betrug  $0,75$  IU/ml (Standardabweichung  $0,68$  IU/ml) wenn die prävakzinalen spezifischen B-Zellfrequenzen unter  $0,1\%$  lagen und  $0,48$  IU/ml (Standardabweichung  $0,24$  IU/ml), wenn sie über  $0,1\%$  lagen. Unabhängig von der Höhe der prävakzinalen B-Zellfrequenzen und ihrem Anstieg nach der Impfung überschritt die Anzahl der antigenspezifischen B-Zellen an den Tagen 12 und 90 p. v. bei keinem Probanden den Wert von  $2\%$ .

#### **4.3.3. Einfluß vorausgegangener Auffrischimpfungen auf das Boosterergebnis**

Untersuchte man den Zusammenhang zwischen der Anzahl vorausgegangener Diphtherie-Auffrischimpfungen und dem Anstieg der spezifischen B-Zellen und des Antitoxin-Titers nach erneuter Boosterimmunisierung, so zeigte sich, daß der Anstieg beider Parameter mit zunehmender Anzahl bisheriger Boosterimmunisierungen geringer ausfiel. Abb. 13 zeigt beispielhaft für den Zeitpunkt Tag 90 p. v. die hoch signifikante negative Korrelation zwischen der bisherigen Boosterfrequenz und dem Anstieg der B-Zellfrequenzen bzw. der Antitoxin-Titer ( $\tau = -0,75$ ,  $p = 0,0013$  bzw.  $\tau = -0,58$ ,  $p = 0,013$ , nach Kendallscher tau-Korrelation). War vor dieser Impfung nur eine Auffrischimpfung erfolgt, stiegen die spezifischen B-Zellfrequenzen 90 Tage p. v. auf das 8 - 160 fache, im Mittel auf das 54 fache an, die spezifischen Antitoxin-Titer auf das 4 - 100 fache, im Mittel auf das 34 fache ihres Ausgangswertes. Hingegen betrug der Anstieg der B-Zellfrequenzen maximal das 7 fache und der Anstieg des Antitoxin-Titers maximal das 4 fache des Ausgangswertes, wenn die Probanden bereits 2, 3 oder 4 Auffrischimpfungen erhalten hatten.

Sowohl die Höhe des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels als auch die Anzahl spezifischer B-Zellen an den Tagen 12 und 90 p. v. waren unabhängig von der Boosterfrequenz (Daten nicht gezeigt). Die stärkere Boosterung spezifischer B-Zellen bei Probanden mit nur einer vorausgegangenen Auffrischimpfung hatte zur Folge, daß im Mittel genauso hohe spezifische B-Zellfrequenzen p. v. erreicht wurden, wie bei Probanden mit häufigeren Auffrischimpfungen.



**Abb. 13:** Einfluß der Anzahl vorausgegangener Diphtherie-Auffrischimpfungen auf den Anstieg der anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden B-Zellen (links) und den Anstieg des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels (rechts) 90 Tage nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung. ( $\diamond$ ) steht für das Datenpaar eines Probanden, (—) für den Mittelwert aller Probandeneinzelmessungen (y-Achse logarithmisch skaliert). Zur Berechnung der Korrelation wurde die Kendallsche tau-Korrelation verwendet.

#### 4.3.4. Einfluß des prävakzinalen spezifischen Antitoxin-Spiegels auf die Boosterrückgang antigenspezifischer B-Zellen und Antitoxin-Titer

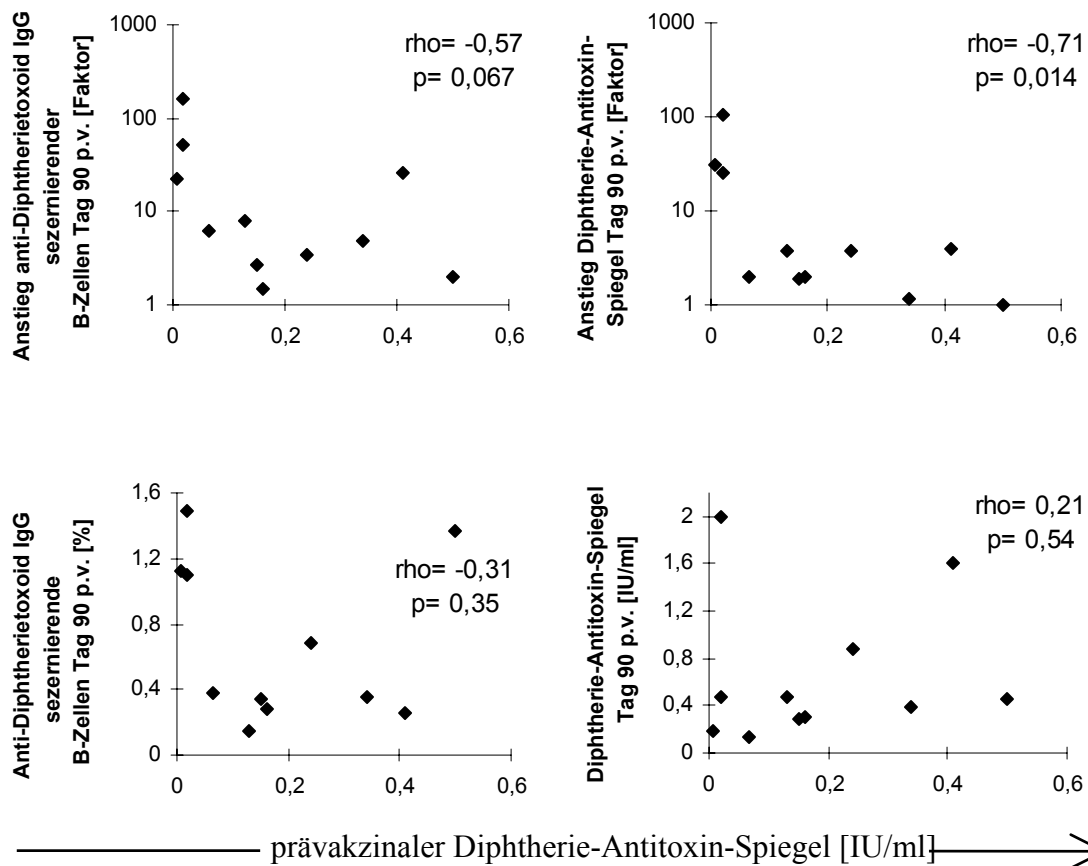
Im folgenden wurde untersucht, wie sich die Höhe des prävakzinalen Diphtherie-Antitoxin-Titers auf den Anstieg der spezifischen B-Zellen bzw. auf den Anstieg des Diphtherie-Antitoxin-Titers p. v. auswirkt. Abb. 14 zeigt den Zusammenhang beispielhaft für den Zeitpunkt Tag 90 p. v.. Je niedriger die prävakzinalen spezifischen Antikörpertiter waren, desto stärker war ihr Anstieg am Tag 90 p. v. ( $\rho = -0,71$ ,  $p = 0,014$ , nach Spearmanscher rho-Korrelation). Diese negative Korrelation war signifikant.

Zwar bestand zwischen der Höhe der prävakzinalen Antitoxin-Titer und dem Anstieg der spezifischen B-Zellen p. v. keine signifikante negative Korrelation ( $\rho = -0,57$ ,  $p = 0,067$ , nach Spearmanscher rho-Korrelation, Abb. 14 oben links), jedoch stiegen bei der Gruppe von Probanden mit niedrigen prävakzinalen Antitoxin-Spiegeln auch die spezifischen B-Zellfrequenzen stärker an. Lag der prävakzinale Diphtherie-Antitoxin-Spiegel unter 0,1 IU/ml, so waren 90 Tage p. v. die spezifischen B-Zellfrequenzen im Mittel um das 60 fache (Streubreite 6 - 160), die Antitoxin-Titer im Mittel um das 40

fache (Streuung 2 - 105) des Ausgangswertes angestiegen. Lag der prävakzinale Antikörper-Titer hingegen über 0,1 IU/ml, so betrug der Anstieg der spezifischen B-Zellfrequenzen bzw. des Antitoxin-Titers nur das 7 fache (Streuung 1,5 - 26) bzw. das 2,5 fache (Streuung 1 - 3,9) des Ausgangswertes.

Sowohl die postvakzinalen antigenspezifischen B-Zellfrequenzen als auch die Höhe der postvakzinalen spezifischen Antikörper-Titer waren unabhängig von der Höhe des prävakzinalen Antitoxin-Titers ( $\rho = -0,31$ ,  $p = 0,35$  bzw.  $\rho = 0,21$ ,  $p = 0,54$ , nach Spearman'scher  $\rho$ -Korrelation). Abb. 14. (unten) zeigt das beispielhaft für den Zeitpunkt 90 Tage p. v.. Probanden mit prävakzinalen Antitoxin-Spiegeln  $< 0,1$  IU/ml erreichten aber aufgrund der stärkeren Boosterung eine mittlere Frequenz spezifischer B-Zellen von 1% (Streuung 0,38 - 1,49%), Probanden mit prävakzinalen Antitoxin-Spiegeln  $> 0,1$  IU/ml dagegen nur eine mittlere Frequenz von 0,5% (Streuung 0,15 - 1,37). Unabhängig davon, ob der prävakzinale Antitoxin-Spiegel unter 0,1 IU/ml oder über 0,1 IU/ml lag, war der Titer 90 Tage p. v. in beiden Probandengruppen im Mittel auf 0,6 IU/ml angestiegen (Streuung 0,13 - 2 bzw. 0,28 - 1,6 IU/ml). Alle Probanden erreichten durch die Auffrischimpfung einen Antikörper-Titer von  $\geq 0,1$  IU/ml, was mit einem Schutz gegen eine Erkrankung an Diphtherie gleichgesetzt wird. Ein Titerwert von 2 IU/ml wurde p. v. nicht überschritten.



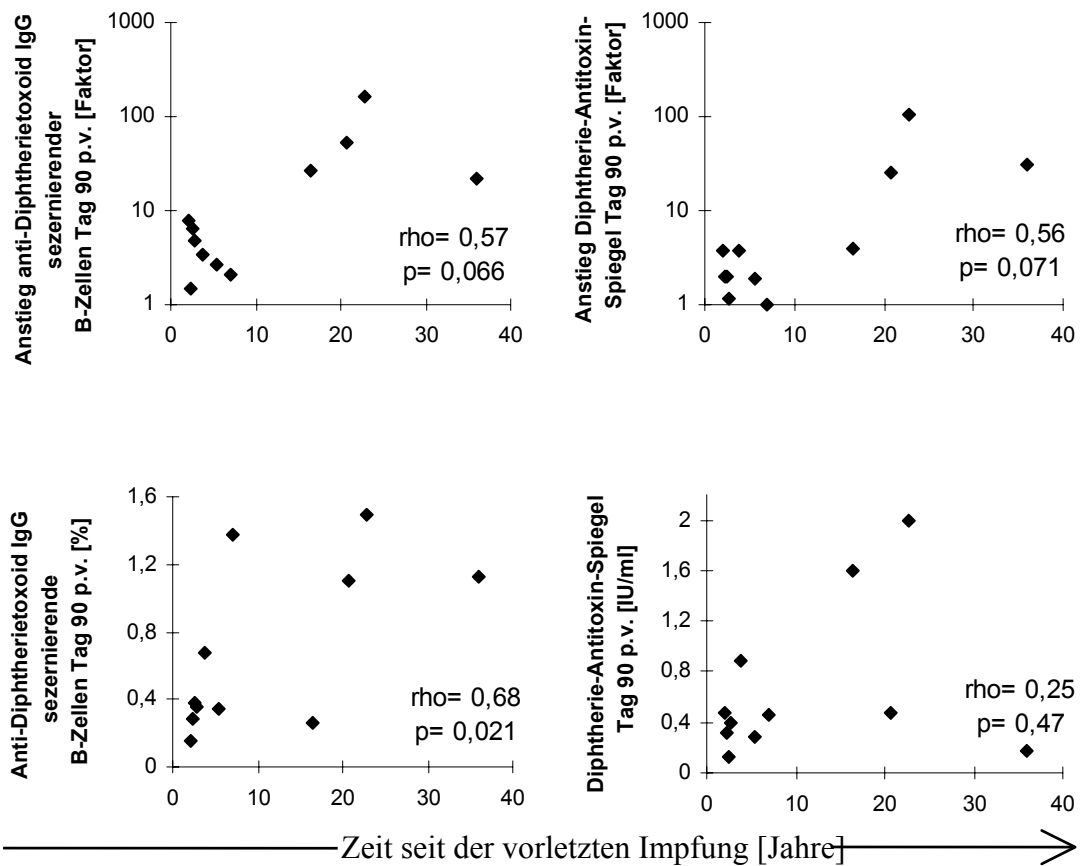


**Abb. 14:** Einfluß des prävakzinalen Diphtherie-Antitoxin-Spiegels auf den Anstieg Diphtherie-spezifischer, IgG sezernierender B-Zellen und des Diphtherie-Antitoxin-Titers (oben; y-Achse logarithmisch skaliert) und auf die Anzahl impfspezifischer IgG sezernierender B-Zellen und die Höhe des postvakzinalen Antitoxin-Titers (unten). Die Werte stammen von Tag 90 p. v.. Jeder Punkt repräsentiert das Datenpaar aus einer Einzelmessung der Werte eines Probanden. Zur Berechnung der Korrelation wurde die Spearmansche rho-Korrelation verwendet.

#### 4.3.5. Einfluß des Zeitintervalls seit der vorletzten Auffrischimpfung auf die erneuten Boosterergebnisse

Abb. 15 zeigt beispielhaft für den Zeitpunkt Tag 90 p.v. den Zusammenhang zwischen der Länge des Zeitintervalls seit der vorletzten Diphtherie-Auffrischimpfung und dem Anstieg spezifischer IgG sezernierender B-Zellen und des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels. Die Anstiege spezifischer B-Zellen und Antitoxin-Titer korrelierten gerade nicht signifikant mit der Zeit seit der vorletzten Impfung ( $\rho = 0,57$ ,  $p = 0,066$  und  $\rho = 0,56$ ,  $p = 0,071$ , nach Spearmanscher rho-Korrelation), jedoch waren beide Parameter p. v. im Mittel um ein Vielfaches stärker angestiegen, wenn die vorletzte Impfung länger als 10 Jahre zurücklag. So waren die spezifischen B-Zellfrequenzen am Tag 90 p. v. im Mittel auf das 65 fache (Streubreite 20 - 160) und die Antitoxin-Titer auf das 41 fache (Streubreite 4 - 105) des Ausgangswertes angestiegen, wenn die vorletzte Impfung länger als 10 Jahre zurücklag. Der Anstieg der B-Zellfrequenzen und der Antikörper-Titer betrug dagegen nur das 4 fache (Streubreite 1,5 - 7,9) bzw. das 2,2 fache (Streubreite 1 - 3,7) des Ausgangswertes, wenn die vorletzte Impfung vor weniger als 10 Jahren erfolgte.

Die Anzahl der Diphtherie-spezifischen, IgG sezernierenden B-Zellen am Tag 90 p. v. zeigte eine gerade signifikante positive Korrelation mit der Zeit seit der vorletzten Impfung ( $\rho = 0,68$ ,  $p = 0,021$ , nach Spearmanscher rho-Korrelation, Abb. 15 unten links). Hingegen war die Höhe der Antitoxin-Spiegel nach der erneuten Impfung unabhängig von der Länge des Zeitintervalls seit der vorletzten Auffrischimpfung ( $\rho = 0,25$ ,  $p = 0,47$ , nach Spearmanscher rho-Korrelation, Abb. 15 unten links). Aufgrund des stärkeren Anstiegs spezifischer B-Zellfrequenzen und Antikörper-Titer bei Probanden, deren vorletzte Impfung länger als 10 Jahre zurück lag, wurden 90 Tage p. v. im Mittel höhere spezifische B-Zellfrequenzen und der Antikörper-Titer erreicht (0,99% bzw. 1,1 IU/ml) als bei Probanden, deren vorletzte Auffrischimpfung weniger als 10 Jahre zurücklag (0,51% bzw. 0,42 IU/ml). Ähnliche Ergebnisse wurden auch an Tag 12 p. v. erhoben (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 15:** Einfluß des Zeitintervalls seit der vorletzten Diphtherie-Impfung auf den Anstieg Diphtherietoxoid-spezifischer IgG sezernierender B-Zellen und der Antitoxin-Titer (oben; y-Achse logarithmisch skaliert) und auf die Anzahl der Diphtherietoxoid-spezifischen IgG sezernierenden B-Zellen und die Höhe der Antitoxin-Titer (unten). Die Daten wurden am Tag 90 nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung erhoben. Jeder Punkt repräsentiert das Datenpaar aus einer Einzelmessung der Werte eines Probanden. Zur Berechnung der Korrelation wurde die Spearmansche rho-Korrelation verwendet.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Langzeitwirkung von Impfungen auf die Frequenz antigenspezifischer B-Zellen und die Höhe der Antitoxin-Titer im Serum

Zur Untersuchung des antigenspezifischen Gedächtnisses erfolgte die Quantifizierung antigenspezifischer Antikörper-Titer und Memory-B-Zellen im menschlichen Blut. Als wichtigstes Kriterium für die Bestimmung von B-Gedächtniszellen gilt ihre Eigenschaft, nicht spontan, sondern erst nach In-vivo- oder In-vitro-Stimulation Antikörper zu sezernieren (Slifka und Ahmed, 1996; Zinkernagel et al., 1996). Während sich nach einer Impfung die Gedächtnis-B-Zellen als Antikörper sezernierende Zellen (ASZ) direkt aus dem Blut nachweisen lassen (Stevens et al., 1979), müssen sie bei Untersuchungen ohne erneuten Antigenkontakt in einer In-vitro-Kultur mit ihrem spezifischen Antigen (Fievet et al., 1993), mit polyklonalen Aktivatoren wie der EL4-Zelllinie (Migot et al., 1995), Pokeweed Mitogen (Wismans et al., 1989(a)) oder SAC (Munoz und Insel, 1987) stimuliert werden, um als ASZ detektiert werden zu können.

In dieser Arbeit konnten nach 5-tägiger SAC-Stimulation der PBL sowohl antigenspezifische IgG als auch IgM sezernierende B-Zellen nachgewiesen werden. Untersuchungen von Klein et al. (1994, 1997, 1998) belegen, daß auch IgM<sup>+</sup> B-Zellen im Blut des Menschen, die nicht den Klassenswitchprozeß durchlaufen haben, dem Memory-Kompartiment angehören, da sie in ihren Genen für die variablen Regionen des Ig-Moleküls die für Memory-B-Zellen typische somatische Hypermutation zeigen. Obwohl der überwiegende Teil der Memory-B-Zellen im humanen Blut aus IgG<sup>+</sup> B-Zellen besteht, kann der Anteil der IgM<sup>+</sup>, hypermutierten Memory-B-Zellen 15% des humanen B-Zellpools ausmachen (Klein et al., 1998). Dennoch sind in der vorliegenden Arbeit nur die antigenspezifischen IgG sezernierenden B-Zellen als Korrelat der B-Gedächtniszellen berücksichtigt worden, da sich die im Folgenden dargestellten Ergebnisse nur für die IgG sezernierenden B-Zellen zeigen ließen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Wismans et al. (1989(a)) bei der Untersuchung anti-HBs (Hepatitis-B-virus-surface-antigen) sezernierender B-Zellen im Blut nicht HBV (Hepatitis-B-Virus)-immunisierter und HBV-immunisierter Probanden nach In-vitro-Stimulation der Zellen. Während die Frequenz der IgG anti-HBs sezernierenden B-Zellen gut mit dem Antigen-

kontakt der Probanden korrelierte, korrelierte die Frequenz der IgM anti-HBs sezernierenden B-Zellen damit nicht.

Untersuchte man den Einfluß des Zeitintervalls seit der letzten Auffrischimpfung mit dem Diphtherietoxoid- bzw. Tetanustoxoid-Antigen auf die Höhe der spezifischen Antitoxin-Spiegel und auf die Frequenz der spezifischen IgG sezernierenden Memory-B-Zellen (Abschnitt 4.2.1.), so zeigte sich nur für das Tetanustoxoid-Antigen eine signifikante negative Korrelation zwischen der Zeit seit der letzten Impfung und beiden Parametern. Für Diphtherie und Tetanus ist ein kontinuierlicher Titerabfall zumindest in den ersten Jahren nach Antigenkontakt beschrieben worden (Gottlieb et al., 1964; Scheibel et al., 1966). Das nicht für beide Antigene ein derartiger Zusammenhang gefunden wurde, hängt vermutlich damit zusammen, daß jeder Proband nach der letzten Impfung einen unterschiedlichen absoluten Wert des Antikörper-Titers und der spezifischen B-Zellfrequenzen bei gleicher Absinkrate hatte (West und Calandra, 1996), oder daß neben der Zeit noch andere Einflußfaktoren die Höhe des Titers und der B-Zellfrequenzen mitbestimmen. Es wäre auch denkbar, daß der Abfall beider Parameter mit der Zeit nicht immer einer linearen Funktion folgt. Obwohl die antigenspezifische Immunität mit der Zeit absinkt, konnten in dieser Arbeit für das Diphtherietoxoid-Antigen noch 35 Jahre und für das Tetanustoxoid-Antigen noch 23 Jahre nach der letzten Impfung antigenspezifische Antikörper und B-Zellen im Blut nachgewiesen werden. Auch andere Untersuchungen bestätigen die Langlebigkeit des immunologischen Gedächtnisses; so sind antigenspezifische Memory-B-Zellen beim Menschen mehrere Jahre (Migot et al., 1995, West und Calandra, 1996), Antikörper-Titer oft noch Jahrzehnte nach dem letzten Antigenkontakt nachweisbar (Simonsen et al., 1984; Kjeldsen et al., 1985; Cohen et al., 1994; Ahmed und Gray 1996). Es stellt sich daher die Frage, wie über lange Zeit hinweg Memory-B-Zellfrequenzen und Antikörper-Titer aufrecht erhalten werden können.

Die Mechanismen, die für die Langlebigkeit der Memory-B-Zellen verantwortlich sind, werden kontrovers diskutiert (Sprent und Tough, 1994; Ahmed und Gray, 1996; Butcher und Picker, 1996). Viele Autoren vertreten die Meinung, daß Memory-B-Zellen nicht per se langlebige Zellen sind, sondern sich langsam teilende Klone, die für eine lange funktionelle Lebensdauer die Stimulation mit persistierendem Antigen benö-

tigen (Gray, 1993; Mac Lennan, 1994; Fishman und Perelson, 1995; Gray et al., 1996). Gray und Skarvall (1988) konnten im Tiermodell zeigen, daß es bei Transfer von Memory-Zellen in Abwesenheit von Antigen zu einem raschen Abfall dieser Zellen kommt. Die folliculären dendritischen Zellen der Keimzentren sollen dabei eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation spielen. Antigen kann in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen auf den folliculären dendritischen Zellen für lange Zeit persistieren und den Memory-B-Zellen präsentiert werden (Mandel et al., 1980; Kosco et al., 1992; Bachmann et al., 1994). Andere Formen der Antigenstimulation könnten die Persistenz des Erregers auf niedrigem Niveau oder die Stimulation mit kreuzreagierenden Antigenen sein (Zinkernagel et al., 1996; Gray et al., 1996). Ob die Stimulation mit Antigen nur das Überleben oder eine Zellteilung der Memory-B-Zellen bewirkt, ist bisher nicht bekannt (Gray, 1993).

Hingegen konnten Schittek und Rajewsky (1990) im Mausmodell zeigen, daß Memory-B-Zellen in einem nicht proliferativen Zustand einige Wochen überleben können. Daher favorisieren andere Autoren, daß die Memory-B-Zelle unabhängig von Antigenpersistenz und Proliferation langlebig ist (Zinkernagel et al., 1996; Bachmann, 1998). In einem mathematischen Modell konnte eine Halbwertszeit der Memory-Zellen ohne Antigenanwesenheit von einem Jahr errechnet werden (Antia et al., 1998). Eine weitere Hypothese, die die kontroversen Daten zu vereinen sucht, geht davon aus, daß das Überleben der Memory-Zellen, die in der frühen Phase der Immunantwort generiert werden, antigenabhängig ist, während die Memory-Zellen der späten Phase unabhängig von Antigen überleben (Sprent, 1994).

Wenn auch bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob Antigen obligatorisch für das Überleben der Memory-B-Zellen ist, so wird ihre Überlebensfähigkeit durch Antigenpräsenz sicherlich potenziert (Mac Lennan, 1994; Ahmed und Gray 1996; Gray et al., 1996).

Auf molekularer Ebene wird die Langlebigkeit der Memory-B-Zellen v.a. über die Expression des Anti-Apoptosegens *bcl-2* reguliert. Eine Überexpression in *bcl-2* transgenen Mäusen führt zu verlängerter Lebensdauer von Memory-B-Zellen und Ig sezernierenden Zellen (Nunez et al., 1991). Als Korrelat ihrer besonderen Langlebigkeit exprimieren Memory-B-Zellen aus dem peripheren Blut des Menschen gleichzeitig *bcl-*

2 und das Anti-Apoptosegen *bcl-x*, die in allen anderen B-Zellpopulationen gegensätzlich exprimiert werden (Bovia et al., 1998). In aktivierten Memory-B-Zellen kommt es zur Hochregulation des Enzyms Telomerase, das die Verkürzung der Chromosomenenden bei jeder Zellteilung verhindert, so daß die Langlebigkeit einer Zelle trotz multipler Zellteilungen aufrechterhalten werden kann (Hu et al., 1997).

Darüber wie es zur Persistenz eines Antikörper-Titers über einen langen Zeitraum kommt, gibt es verschiedene Theorien. Da die Halbwertszeit der Immunglobuline im Serum des Menschen und der Maus ca. 3 Wochen beträgt (Morell et al., 1970; Vieira und Rajewsky, 1988), müssen Plasmazellen des Knochenmarks durch kontinuierliche Antikörper-Produktion den Antikörper-Titer aufrechterhalten. Bisher ging man davon aus, daß Plasmazellen, die sich als terminal ausdifferenzierte Zellen nicht mehr teilen können, kurzlebig sind, mit einer im Tiermodell errechneten Halbwertszeit von wenigen Tagen (Schooley, 1961; Nossal und Makela 1962; Levy et al., 1987) bis zu wenigen Wochen (Ho et al., 1986). Dann wäre zur Langzeitaufrechterhaltung eines Antikörper-Titers die ständige Stimulation von Memory-B-Zellen durch persistierendes Antigen auf follikulären dendritischen Zellen notwendig, um eine Proliferation und Differenzierung der Memory-B-Zellen zu Plasmazellen zu bewirken (Szakal et al., 1989; Mac Lennan et al., 1992; Tew et al., 1992; Gray et al., 1996; Zinkernagel et al., 1996; Bachmann, 1998). In diesem vorwiegend am Tier untersuchten Modell würden die Serum-Antikörper die zirkulierenden Memory-B-Zellen reflektieren, da diese durch ihre kontinuierliche Differenzierung zu Plasmazellen den Antikörper-Titer determinieren würden (Tew et al., 1979).

Neuere Untersuchungen zeigen die Existenz langlebiger Plasmazellen in der Milz und im Knochenmark der Maus (Manz et al., 1997; Manz et al., 1998; Slifka et al., 1998; Slifka und Ahmed, 1998). Die Plasmazellen können für länger als 1 Jahr, somit für die Lebensspanne einer Maus überleben und Antikörper sezernieren (Slifka et al., 1998). Sie sind dabei unabhängig von der Anwesenheit von Memory-B-Zellen und Antigen (Manz et al., 1998). Gegen eine kontinuierliche Neubildung kurzlebiger Plasmazellen aus Memory-B-Zellen spricht auch, daß sich jede murine Memory-B-Zelle alle 1,5 Tage teilen müßte, um kurzlebige Plasmazellen zu ersetzen. Geht man dagegen von der Existenz langlebiger Plasmazellen aus, errechnet sich eine Teilung der B-Memory-

Zelle alle 35 Tage (Slifka et al., 1998), was mit anderen Studien zum Memory-B-Zellturnover an der Maus übereinstimmt (Schittek und Rajewsky, 1990; Vieira und Rajewsky, 1990).

Beim Menschen ist im Gegensatz zur Maus noch nicht genau bekannt, ob ebenfalls langlebige Plasmazellen existieren. Ob sich die Untersuchungsergebnisse des Mausmodells auf das menschliche System übertragen lassen, kann jedoch indirekt anhand der Ergebnisse dieser Arbeit geprüft werden. Untersuchte man den Zusammenhang zwischen der Höhe des Antigen-spezifischen Antikörper-Titers und der Frequenz Antigen-spezifischer Memory-B-Zellen im Blut der Probanden (Abschnitt 4.2.2.), so ergab sich für die beiden verwendeten Antigene (Diphtherie- und Tetanustoxoid) keine Korrelation zwischen beiden Parametern. Die fehlende Korrelation der Antikörper-Titer mit den B-Zellfrequenzen spricht dagegen, daß der Antikörper-Titer von der Anzahl sich kontinuierlich zu Plasmazellen differenzierenden Memory-B-Zellen reflektiert wird. Das weist auf eine getrennte Kontrolle und eine Unabhängigkeit der beiden Komponenten des immunologischen Gedächtnisses hin. Somit wäre auch beim Menschen die Existenz langlebiger Plasmazellen denkbar, die unabhängig von den Memory-B-Zellen überleben können. Andere Untersuchungen am Menschen zeigen ebenfalls keine Korrelation zwischen Antikörper-Titern und Memory-B-Zellfrequenzen (Wismans et al., 1991; Fievet et al., 1993; Böcher et al., 1996; West und Calandra, 1996; Leyendeckers et al., 1999) und stützen somit diese Hypothese.

Die fehlende Korrelation zwischen beiden Parametern könnte noch andere Ursachen haben. Wenn die Antikörper-Sekretionsrate der einzelnen Plasmazelle individuell verschieden wäre, würde ein bestimmter Antikörper-Titer eine unterschiedliche Anzahl an Plasmazellen reflektieren. Wenn es tatsächlich eine kontinuierliche Differenzierung von Memory-B-Zellen zu Plasmazellen gäbe, so hätten eine Reihe von individuellen Faktoren Einfluß auf diesen Prozeß, die in der Zwei-Parameterdarstellung nicht berücksichtigt werden. Außerdem stellt sich die Frage, ob das Blut ein repräsentatives Kompartiment zur Untersuchung von Memory-B-Zellen darstellt. Da Memory-B-Zellen zwischen den sekundären lymphatischen Organen rezirkulieren, um dabei auf ihr Antigen zu treffen, lassen sie sich im Blut des Menschen gut quantifizieren (Fievet et al., 1993; Bovia et al., 1998; Leyendeckers et al., 1999). Sie akkumulieren sogar mit zunehmen-



dem Alter in diesem Kompartiment (Klein et al., 1994) und machen ca. 40% des B-Zellpools im menschlichen Blut aus (Klein et al., 1998). Daher liegt es nahe, daß die im Blut gefundenen Memory-B-Zellen repräsentativ für den gesamten Zell-Pool sind.

In Abschnitt 4.2.2. wurde gezeigt, daß es Probanden gibt, bei denen trotz eines hohen Diphtherie-Antitoxin-Spiegels ( $> 0,4$  IU/ml) keine anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden B-Zellen mehr nachweisbar sind. Andererseits war es möglich, bei Probanden ohne einen schützenden Diphtherie-Antitoxin-Spiegel ( $< 0,1$  IU/ml) spezifische zirkulierende B-Zellen nachzuweisen. Wie soll der Immunschutz bei solchen Probanden beurteilt werden? Welchen Beitrag leisten Antikörper-Titer bzw. Memory-B-Zellen für die protektive Immunität eines Individuums? Welche Rolle spielen die Memory-B-Zellen, wenn sie nicht für die Langzeitaufrechterhaltung des Antikörper-Titers zuständig sind?

Da präexistierende spezifische Antikörper den wichtigsten Infektionsschutz darstellen (Ada, 1990; Ahmed und Gray, 1996; Zinkernagel et al., 1996; Zinkernagel, 1997), galt der Antikörper-Titer bislang als das Immunitätskriterium, an dem sich auch die Empfehlungen für Auffrischimpfungen orientierten. Am Beispiel der HBV-Impfung ließ sich jedoch zeigen, daß Probanden, deren Antikörper-Titer nach aktiver HBV-Impfung unter die Schutzgrenze von 10 mIU/ml bzw. unter die Nachweisgrenze abgefallen war, dennoch bei Kontakt mit dem Hepatitis-B-Virus gegen die Infektion geschützt waren (Margolis, 1993; West und Calandra, 1996). Bei diesen Probanden waren noch 5-12 Jahre nach der letzten Impfung persistierende antigenspezifische Memory-B-Zellen nachweisbar (West und Calandra, 1996). Da die Inkubationszeit bei Hepatitis B mehrere Wochen bis Monate beträgt, können die Memory-B-Zellen bei erneutem Antigenkontakt innerhalb von Tagen einen hohen spezifischen Antikörper-Titer generieren, der vor Erkrankung schützt (Wismans et al., 1989(b)). Diese Erkenntnis hat in den USA bereits dazu geführt, die Empfehlung zur Boosterimmunisierung nicht mehr an der Höhe des Antikörper-Titers zu orientieren (Tilzey, 1995). Neben der Generierung einer schnellen sekundären Immunantwort spielen Memory-B-Zellen eine wichtige Rolle in der Antigen-Prozessierung und Präsentation. Selbst wenn die Memory-B-Zellen nicht für die Aufrechterhaltung des Antikörper-Titers verantwortlich sein sollten, so leisten sie dennoch einen wichtigen Beitrag zur protektiven Immunität.

Da die Memory-B-Zellen im Gegensatz zu den präexistierenden Antikörpern die Infektion nicht per se verhindern können, sondern nur durch schnelle Expansion und Antikörper-Produktion das Infektionsausmaß kontrollieren (Ahmed und Gray, 1996), hängt ihre Bedeutung für den Immunschutz stark von der Art des infektiösen Agens ab. So zeigte sich, daß eine Infektion von Mäusen mit dem Vesicular stomatitis Virus (VSV) durch passive Gabe spezifischer Antikörper verhindert werden konnte, während bei alleinigem Vorhandensein von Memory-B-Zellen die Infektion einen tödlichen Ausgang nahm (Steinhoff et al., 1995, Bachmann et al., 1997). Auch bei anderen Infektionen mit kurzer Inkubationszeit, wie z.B. Diphtherie oder Tetanus, leisten die präexistierenden Antikörper den wichtigsten Beitrag zum Immunschutz.

Welche wichtige Rolle antigenspezifische Memory-B-Zellen für die Beurteilung der Langzeitimmunität eines Individuums spielen, zeigt die Untersuchung über den Einfluss der Boosterfrequenz auf die Höhe des spezifischen Antikörper-Titers bzw. auf die Anzahl der spezifischen IgG sezernierenden B-Zellen (Abschnitt 4.2.3.). Es konnte in dieser Arbeit am Beispiel von Tetanustoxoid erstmals gezeigt werden, daß die Anzahl der bisherigen Auffrischimpfungen stark mit der Frequenz zirkulierender Memory-B-Zellen korreliert, nicht jedoch mit der Höhe der Antikörper-Titer. Für Diphtherietoxoid zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen Boosterfrequenz und Anzahl spezifischer B-Zellen und nur eine schwache Korrelation mit den Antikörper-Titern. Die Frequenz spezifischer Memory-B-Zellen reflektiert das Ausmaß früherer Lymphozytenproliferationen (Zinkernagel et al., 1996) und somit die Häufigkeit bisheriger Antigenkontakte. So konnte man auch bei natürlichen Infektionen, wie z.B. Malaria, höhere Memory-B-Zellfrequenzen nachweisen, wenn multiple Antigenkontakte stattgefunden hatten (Migot et al., 1995). Hingegen hat die Häufigkeit der Antigenkontakte offensichtlich keinen direkten Einfluß auf die Höhe des spezifischen Antikörper-Titers. Das spricht dafür, daß das durch Boosterimmunisierungen induzierte immunologische Gedächtnis besser von den zirkulierenden Memory-B-Zellen reflektiert wird als von der Höhe des Antikörper-Titers. Memory-B-Zellen scheinen also ein weit wichtigerer Parameter für die Beurteilung der Langzeitimmunität zu sein, z. B. im Hinblick auf Impfungen, als bisher angenommen wurde.

Die Korrelation der Boosterfrequenz mit der Anzahl spezifischer B-Gedächtniszellen, jedoch nicht mit der Höhe spezifischer Antikörper-Titer, spricht außerdem dafür, daß der Antikörper-Titer nicht über die ständige Restimulation von Memory-B-Zellen aufrecht erhalten wird, sondern eher über langlebige Plasmazellen, die unabhängig von Antigenpräsenz überleben und, wie von Manz et al. (1998) im Mausmodell gezeigt, auf einen erneuten Antigenkontakt keinerlei Reaktion zeigen.

## **5.2. Untersuchungen über die antigenspezifischen Immunreaktionen nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung**

Nach einer Diphtherie-Impfung reagierten 11 von 13 Probanden mit einem Anstieg des Diphtherie-Antitoxin-Spiegels und der anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierenden B-Zellen im Blut. Bei 2 Probanden konnten jedoch kein spezifischer Antikörper-Titer und keine spezifischen B-Zellen nachgewiesen werden. Beide Probanden hatten noch keine Grundimmunisierung mit Diphtherietoxoid erhalten. Folglich sind bei inerten Antigenen wie Diphtherie- und Tetanustoxoid mehrere Injektionen nötig, z.B. in Form einer dreimaligen Impfung bei Grundimmunisierung, um eine ausreichende Expansion der Memory-B-Zellen zu bewirken (Ahmed und Gray, 1996) und einen nachweisbaren, langanhaltenden Antikörper-Titer zu generieren (Benner et al., 1981). Im Gegensatz dazu kommt es nach Kontakt mit replizierenden Pathogenen, z.B. Viren, zu einer effizienteren B- und T-Zell-Aktivierung und Keimzentrumsformation (Bachmann und Zinkernagel, 1997), so daß eine einmalige Exposition für die Etablierung des immunologischen Gedächtnisses genügt.

Bei den restlichen 11 Probanden kam es im Rahmen einer Auffrischimpfung mit Diphtherietoxoid zur Expansion spezifischer Antikörper und B-Zellen (Abschnitt 4.3.1.). Wie in der Einleitung bereits erläutert, wurden die Veränderungen der Populationsgröße antigenspezifischer Zellen nach einer Immunreaktion besonders gut für die primäre Immunreaktion von T-Zellen untersucht (Ahmed und Gray, 1996; Busch et al., 1998). Obwohl auch die antigenspezifischen B-Zellen in den Keimzentren nach ihrer Expansion zum größten Teil eliminiert werden, ist bisher noch offen, ob sich der Mechanismus der klonalen Expansion/Kontraktion auch auf die Regulation der B-Zellpopulationsgröße übertragen läßt (Sprent, 1994).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Boosterung antigenspezifischer IgG sezernierender B-Zellen und der Antitoxin-Spiegel nach einer Diphtherie-Auffrischimpfung in Abhängigkeit von der Frequenz antigenspezifischer B-Zellen vor der Impfung untersucht (Abschnitt 4.3.2.). Es fand sich eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen der Anzahl prävakzinaler spezifischer B-Zellen und dem Anstieg der spezifischen B-Zellen und Antikörpertiter p. v.. Die Probanden mit niedrigen prävakzinalen spezifischen B-Zellfrequenzen ( $< 0,1\%$ ) zeigten nach der Impfung im Mittel eine 17 mal stärkere Boosterung der spezifischen B-Zellen als die Probanden mit hohen prävakzinalen B-Zellfrequenzen ( $> 0,1\%$ ). Nach der Impfung konnten daher Probanden mit niedrigen prävakzinalen B-Zellfrequenzen im Mittel genauso hohe B-Zellfrequenzen erreichen wie Probanden mit hohen prävakzinalen B-Zellfrequenzen. Hingegen konnte für antigenspezifische T-Zellen gezeigt werden, daß ihre Frequenz nach einer Impfung von der prävakzinalen Frequenz reflektiert wird (Busch et al., 1998). Von keinem Probanden wurde nach der Impfung der absolute Wert von 2% anti-Diphtherietoxoid IgG sezernierender B-Zellen überschritten. Die Boosterung des Antitoxin-Spiegels war ebenfalls stärker bei Probanden mit niedrigen prävakzinalen spezifischen B-Zellfrequenzen. Keiner der Probanden erreichte p. v. einen Antikörper-Titerwert über 2 IU/ml.

Diese Daten zeigen, daß es nach einer Impfung zu einem Anstieg der antigenspezifischen B-Zellen kommt. Die Generierung neuer, antigenspezifischer B-Zellen muß aber einem strengen Regulationsmechanismus unterliegen, da die absolute Anzahl der spezifischen B-Zellen p. v. und der Antikörper-Titer einen gewissen „Grenzwert“ (hier 2% bzw. 2 IU/ml) nicht überschreiten, unabhängig davon, wie hoch der prävakzinale Wert und der Anstieg nach der Impfung war. Das spricht dafür, daß auch die B-Zellen des Menschen nach ihrer klonalen Expansion durch Antigenkontakt eine Phase der klonalen Kontraktion durchlaufen, und so eine Überexpansion mit anschließender Akkumulation neuer antigenspezifischer B-Zellen verhindert wird.

Gleichzeitig zeigen diese Daten einen möglichen Kontrollmechanismus der klonalen Expansion/Kontraktion auf: die prävakzinale Frequenz antigenspezifischer B-Zellen kontrolliert die Stärke der Boosterung der B-Zellen und des Antikörper-Titers, wobei die Boosterung besonders stark ist, wenn prävakzinal wenig spezifische B-Zellen vorliegen. Dieses Ergebnis kann durch folgende Zusammenhänge erklärt werden. Die

Populationsgröße der B- und T-Zellen, v.a. aber des Memory-Zellpools, wird innerhalb gewisser Grenzen konstant gehalten (Sprent und Tough, 1994; Franceschi et al., 1995; Mackall et al., 1997). Diese Homöostase beruht auf der Konkurrenz verschiedener Zellpopulationen um ein begrenztes Angebot an Faktoren, die ihnen das Überleben ermöglichen. Solche Faktoren sind Wachstumsfaktoren und andere kostimulatorische Signale, ohne die die Zellen der Apoptose unterliegen (Ahmed und Gray, 1996). Jede Zellpopulation nimmt dabei aufgrund unterschiedlicher Anforderungen an ihre Umwelt eine bestimmte Nische ein, um die alle Zellen dieser Population konkurrieren (Butcher und Picker, 1996). Ist eine Nische leer oder wenig gefüllt, indem z.B. nur eine geringe Anzahl Diphtherie-spezifischer Memory-B-Zellen vorliegt, bietet sie genug Kapazität, um nach Antigenkontakt vielen neu generierten antigenspezifischen B-Zellen das Überleben zu ermöglichen. Ist sie hingegen bereits gefüllt, z.B. durch eine hohe Anzahl Diphtherie-spezifischer Memory-B-Zellen, besteht ein starker Konkurrenzdruck, und nur die am besten angepaßten Klone aus dem Repertoire und die, die durch bestimmte Homing-Moleküle besser in eine Nische gelangen können, überleben (Butcher und Picker, 1996). Dieses Modell wurde durch Untersuchungen bestätigt, in denen naive T-Zellen, die normalerweise stabil sind und nicht proliferieren, und Memory-T-Zellen in eine T-Zell-defiziente Maus transferiert wurden. Durch die fehlende Konkurrenz in dieser noch leeren Nische konnten sie stark expandieren und den gesamten rezirkulierenden T-Lymphozytenpool repopulieren (Sprent und Tough, 1994). Das Zellgleichgewicht wird also v.a. von der totalen Anzahl und der Diversität konkurrierender Zellen reguliert (Butcher und Picker, 1996), indem nach jeder Immunantwort ein bestimmter Anteil aktivierter Lymphozyten durch programmierten Zelltod eliminiert wird.

Die Regulation der Expansion und Kontraktion von Lymphozytenpopulationen auf molekularer Ebene sind v.a. im Tiermodell untersucht worden. Die wichtigste Rolle für den aktivierungsinduzierten Zelltod und die Selektion autoreaktiver T-Zellen spielt die Interaktion der Zelloberflächenmoleküle Fas/Fas Ligand, die zum programmierten Zelltod der Fas tragenden Zelle führt (Ju et al., 1995; Nagata und Golstein, 1995). In Mäusen, die einen Defekt des Fas oder Fas Ligand-Moleküls zeigen, kommt es hingegen zur Akkumulation aktivierter Lymphozyten und zu Autoimmunkrankheiten (Russell und Wang, 1993; Watanabe et al., 1995(a)). Die Rolle der Fas/Fas Ligand Interaktion für die Homöostase der B-Zellpopulation wird verschieden beurteilt. Einerseits

scheinen Fas/Fas Ligand nicht direkt in antigenspezifische B-Zellantworten involviert zu sein (Smith et al., 1995). Andererseits zeigen Untersuchungen an Mensch und Maus, daß es durch T-zelluläre Stimulation in den Keimzentren zur Hochregulation des Fas-Moleküls auf den B-Zellen kommt (Lagresle et al., 1995), und daß diese Zellen nach Interaktion mit dem Fas Ligand-Molekül durch Apoptose eliminiert werden können (Garrone et al., 1995). Daher scheint die Interaktion über Fas/Fas Ligand das Gleichgewicht der Expansion und Elimination der B-Zellen, und die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen zu regulieren (Nagata und Golstein, 1995; Watanabe et al., 1995(b); Rathmell und Goodnow, 1998). Dagegen kann der Fas-induzierte Zelltod durch Expression des Anti-Apoptosegens bcl-2 aufgehoben werden (Takayama et al., 1995; Smith et al., 1994; Blandino und Strano, 1997; Rolink et al., 1999).

Neben der Apoptose gibt es noch einen anderen Mechanismus, um die Größe des Memory-B-Zell-Kompartimentes nach Antigenstimulation zu kontrollieren. Arpin et al. (1997) kultivierten menschliche naive und Memory-B-Zellen unter gleichen Bedingungen und konnten zeigen, daß sich die Memory-B-Zellen im Gegensatz zu den naiven B-Zellen sehr stark zu Plasmazellen differenzierten, während nur wenige B-Blasten aus ihnen hervorgingen. Diese besondere Tendenz der Memory-B-Zellen, sich nach Aktivierung bevorzugt zu Effektorzellen zu differenzieren und nicht zu Memory-Zellen, hat 2 Konsequenzen: Erstens kommt es zur schnellen Generierung einer großen Anzahl Plasmazellen und damit eines spezifischen Antikörper-Titers während einer sekundären Immunantwort. Zweitens wird die Überexpansion eines speziellen Memory-Zellklones verhindert, der das verfügbare Ig-Repertoire einschränken würde (Arpin et al., 1997; Sprent, 1994). Im Rahmen dieser Theorie nimmt man an, daß Memory-Zellen mit jedem Antigenkontakt ein sinkendes Potential besitzen, neue Memory-Zellen zu generieren, aber ein steigendes Potential, sich zu Plasmazellen zu differenzieren (Sprent, 1994; Ahmed und Gray, 1996).

Abschnitt 4.3.3. stellt die Boosterung der antigenspezifischen B-Zellen und des Antikörper-Titers p. v. in Abhängigkeit von der Anzahl bisheriger Auffrischimpfungen dar. Mit zunehmender Boosterfrequenz fällt der Anstieg der spezifischen B-Zellen p. v. geringer aus, was die obige Theorie stützen würde. Diese negative Korrelation ist signifikant. Allerdings zeigt auch der Anstieg des Antikörper-Titers p. v. eine solche signifikante Abhängigkeit von der Boosterfrequenz. Der Anstieg war am stärksten, wenn bis-

her nur eine Auffrischimpfung erfolgt war, was durch die o.g. Theorie nicht erklärt werden kann.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die sekundäre Immunantwort noch von einem weiteren Parameter kontrolliert wird; nämlich von der Höhe des prävakzinalen Antikörper-Titers. Probanden, deren prävakzinale Antitoxin-Spiegel unter 0,1 IU/ml lagen, zeigten im Mittel einen 8,6 fach stärkeren Anstieg ihrer spezifischen B-Zellfrequenzen p. v. als Probanden mit einem prävakzinalen Antitoxin-Spiegel > 0,1 IU/ml (Abschnitt 4.3.4.). Diese negative Korrelation war gerade nicht signifikant. Ähnliche Daten ergaben sich bei der Untersuchung der Boosterung des Antitoxin-Spiegels p. v. in Abhängigkeit vom prävakzinalen Antitoxin-Spiegel (Abschnitt 4.3.4.). Die negative Korrelation zwischen beiden Parametern war signifikant. Der mittlere Anstieg des Antikörper-Titers nach der Impfung war um das 16 fache höher bei Probanden mit prävakzinalen Antikörper-Titern < 0,1 IU/ml als bei Probanden mit prävakzinalen Antikörper-Titern > 0,1 IU/ml. Daher erreichten die Probanden, die vor der Impfung keinen schützenden Antikörper-Titer gehabt hatten, nach der Impfung im Mittel genauso hohe Titerwerte, wie die Probanden mit prävakzinalen Antitoxin-Spiegeln > 0,1 IU/ml. Dabei wurde unabhängig vom prävakzinalen Titer und seinem Anstieg nach der erneuten Impfung der Wert von 2 IU/ml von keinem Probanden überschritten.

Dieses Ergebnis könnte man folgendermaßen erklären: Die Stärke der Expansion antigenspezifischer B-Zellen nach Antigenkontakt reflektiert die Antigenkonzentration und die Kinetik der Antigenelimination (Sprent, 1994; Zinkernagel et al., 1996). Dabei werden die Memory-B-Zellen nur von freiem Antigen aktiviert (Picker und Siegelman, 1993). Liegt bei Antigenkontakt bereits ein hoher Titer an spezifischen Antikörpern vor, eliminieren diese das zirkulierende Antigen durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und erhöhen den Schwellenwert, um spezifische Memory-B-Zellen zu aktivieren, so daß es zu keinem weiteren Titeranstieg kommt (Manz et al., 1998). Präexistierende Antikörper konkurrieren also mit dem B-Zellrezeptor der Memory-B-Zellen um die Bindung von freiem Antigen. Übersteigt die Antigenkonzentration die Menge der prävakzinalen spezifischen Antikörper im Blut, können die Memory-B-Zellen aktiviert werden und über die Differenzierung zu Plasmazellen zu einem Titeranstieg führen. Es entstehen solange neue Plasmazellen, bis diese zusammen mit dem Pool be-

reits existierender, langlebiger Plasmazellen eine solche Antikörpermenge bilden, die dann eine weitere Aktivierung von Memory-B-Zellen verhindert (Manz et al., 1998).

Unsere Daten belegen, daß die Höhe des Antikörper-Titers auf diese Weise einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Expansion spezifischer B-Zellen und Antikörper nach einer sekundären Immunantwort darstellt. Die Daten zeigen auch, daß besonders solche Probanden von der einmaligen Auffrischimpfung profitierten (gemessen an dem Anstieg des spezifischen Antikörper-Titers und der B-Zellfrequenzen), die vor der Impfung keinen schützenden Antikörper-Titer von 0,1 IU/ml hatten. All diese Probanden erreichten nach der Auffrischimpfung die Schutzgrenze von 0,1 IU/ml. Die Höhe des Antikörper-Titers ist heute in der Impfpraxis das Kriterium für den Immunschutz des Individuums und für die Indikation zu einer erneuten Auffrischimpfung. Sinkt der Antikörper-Titer unter eine definierte Schutzgrenze ab (hier  $< 0,1$  IU/ml Diphtherie-Antitoxin), stellt sich die Frage, ob eine einfache Auffrischimpfung genügt, oder ob erneut grundimmunisiert werden muß (Hasselhorn et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei Probanden ohne schützenden Antikörper-Titer eine einfache Auffrischimpfung genügte, um die Schutzgrenze zu erreichen oder sogar zu überschreiten.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der Zeit seit der vorletzten Auffrischimpfung und der Boosterreaktion nach der aktuellen Auffrischimpfung (Abschnitt 4.3.5), so zeigt sich, daß selbst 10-35 Jahre nach der vorletzten Impfung eine Auffrischimpfung genügte, um ein gleich hohes Niveau an spezifischen Memory-B-Zellen und Antikörper-Titern zu erreichen wie bei Probanden, die zum vorletztenmal innerhalb von 10 Jahren geimpft worden waren.

Zusammenfassend läßt sich folgendes feststellen: Die Daten dieser Arbeit belegen, daß die Stärke einer sekundären Immunantwort komplexen Kontrollmechanismen unterliegt, um die Homöostase des Lymphozytenpools aufrechtzuerhalten. Die Population der spezifischer Memory-B-Zellen scheint dabei eine Phase der klonalen Expansion und, wie für T-Zellen im Tiermodell bereits gut beschrieben, eine Phase der klonalen Kontraktion zu durchlaufen. Die Stärke der klonalen Expansion und Kontraktion und damit die endgültige Frequenz an antigenspezifischen B-Zellen nach der Impfung scheint v.a. durch 2 Parameter beeinflußt zu werden; nämlich die prävakzinale Frequenz der antigenspezifischen B-Zellen und die Höhe des antigenspezifischen Antikörper-



Titers. Daher profitierten v.a. die Probanden von der Auffrischimpfung, die prävakzinal niedrige spezifische B-Zellfrequenzen und Antikörper-Titer hatten. Das sind v.a. die Probanden, die bislang nur eine Auffrischimpfung erhalten hatten oder deren letzte Impfung länger als 10 Jahre zurücklag.

Heutzutage berücksichtigen gängige Impfempfehlungen oft nur den Antikörper-Titer als Kriterium für Wiederauffrischimpfungen und als Indikator für das immunologische Gedächtnis. Es wäre wünschenswert, wenn moderne Impfstrategien sich in zunehmendem Maße auch an den Memory-B-Zellen als Parameter für Langzeitimmunität orientieren würden. Da die Menge an antigenspezifischen B-Zellen einen bestimmten Grenzwert offenbar nicht überschreitet, sollten auch die Empfehlungen für regelmäßige Auffrischimpfungen neu durchdacht werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel der Diphtherie- und Tetanusimpfung sowohl die Langzeitwirkung von Impfungen als auch die akuten Effekte einer erneuten Auffrischimpfung auf die antigenspezifischen Memory-B-Zellen und die Antikörper-Titer untersucht. Dazu wurden antigenspezifische Antitoxin-Spiegel mittels ELISA und Neutralisationstest sowie spezifische Memory-B-Zellen mit dem B-Zell-ELISPOT-Test bei 13 Probanden bestimmt.

Es zeigte sich, daß sowohl der Antikörper-Titer als auch die Memory-B-Zellen über lange Zeit nach der Impfung persistieren, ohne jedoch miteinander zu korrelieren. Das spricht dafür, daß der Antikörper-Titer nicht, wie bisher angenommen, durch kontinuierliche Stimulierung und Differenzierung von Memory-B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen aufrechterhalten wird. Die bislang nur in der Maus bewiesene Existenz langlebiger Plasmazellen wird damit auch für den Menschen wahrscheinlich. Weiterhin korrelierte die Anzahl bisheriger Auffrischimpfungen mit der Frequenz der spezifischen Memory-B-Zellen, nicht aber mit der Höhe des Antikörper-Titers. Damit konnte zum erstenmal gezeigt werden, daß die Langzeitimmunität nach Impfungen beim Menschen besser von den Memory-B-Zellen als von den Antikörper-Titern reflektiert wird.

Anhand der Untersuchung der Immunreaktion nach einer erneuten Diphtherie-Auffrischimpfung konnte gezeigt werden, daß die Boosterung der antigenspezifischen B-Zellen und des Antikörper-Titers einem gut kontrollierten Mechanismus der klonalen Expansion und Kontraktion unterliegt. Dabei bestand eine starke negative Korrelation zwischen der Anzahl der Boosterimmunisierungen und der Stärke der Expansion spezifischer Memory-B-Zellen bzw. Antikörper-Titer. Die Höhe der prävakzinalen spezifischen B-Zellfrequenzen und der Antikörper-Titer beeinflussten ebenfalls die Stärke der Immunantwort, so daß besonders solche Probanden von einer Auffrischimpfung profitierten, die vor der Impfung niedrige B-Zellfrequenzen bzw. Antikörper-Titer hatten.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals die Bedeutung von Memory-B-Zellen für die postvakzinale Langzeitimmunität beim Menschen aufgezeigt werden. Dieser Parameter sollte in Zukunft als zusätzliches Kriterium für die Beurteilung des Immunschutzes und des Zeitpunktes für Reimmunisierungen mit herangezogen werden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Abramson, S., Miller, R.G., Phillips, R.A., 1977.

The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems.

J. Exp. Med. 145: 1567.

Ada, G.L., 1990.

The immunological principles of vaccination.

Lancet 335: 523-526.

Ahmed, R., Gray, D., 1996.

Immunological memory and protective immunity: understanding their relation.

Science 272: 54-60.

Andersson, K., Wrammert, J., Leanderson, T., 1998.

Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation?

Immunol. Rev. 162: 173-182.

Antia, R., Pilyugin, S.S., Ahmed, R., 1998.

Models of immune memory: On the role of cross-reactive stimulation, competition, and homeostasis in maintaining immune memory.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14926-14931.

Arpin, C., Dechanet, J., van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1995.

Generation of memory B cells and plasma cells in vitro.

Science 268(5211): 720-722.

Arpin, C., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1997.

Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing.

J. Exp. Med. 186(6): 931-940.

Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1994.

Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells.

J. Immunol. 153(8): 3386-3397.

Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M., 1997.

Neutralizing anti-viral B-cell responses.

Ann. Rev. Immunol. 15: 235-270.

Bachmann, M.F., Kalinke, U., Althage, A., Freer, G., Burkhart, C., Roost, H.-P., Aguet, M., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1997.

The roles of antibody concentration and avidity in anti-viral protection.  
*Science* 276: 2024-2027.

Bachmann, M.F., 1998.

The role of germinal centers for antiviral B cell responses.  
*Immunol. Res.* 17 (3): 329-344.

Bachmann, M.F., Kopf, M., 1999.

The role of B-cells in acute und chronic infections.  
*Curr. Opin. Immunol.* 11: 332-339.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., Saeland, S., 1994.

The CD40 antigen and its ligand.  
*Annu. Rev. Immunol.* 12: 881-922.

Benner, R., Hijmans, W., Haaijman, J.J., 1981.

The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation.  
*Cin. Exp. Immunol.* 46(1): 1-8.

Berek, C., 1992.

The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center.  
*Immunol. Rev.* 126: 5.

Bigl, S., Drechsler, R., 1997.

Bestimmung von Diphtherieantitoxin im Serum - ein Methodenvergleich.  
*Mikrobiologie* 7: 93-95.

Blandino, G., Strano, S., 1997.

BCL-2: the pendulum of the cell fate.  
*J. Exp. Clin. Cancer Res.* 16(1): 3-10.

Böcher, W.O., Herzog-Hauff, S., Herr, W., Heermann, K., Gerken, G., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Löhr, H.F., 1996.

Regulation of neutralizing anti-hepatitis B surface (Hbs) antibody response in vitro in Hbs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

*Clin. Exp. Immunol.* 105: 52-58.

Bovia, F., Nabili-Tehrani, A.C., Werner-Favre, C., Barnet, M., Kindler, V., Zubler, R.H., 1998.

Quiescent memory B cells in human peripheral blood co-express bcl-2 and bcl-x anti-apoptotic proteins at high levels.  
Eur. J. Immunol. 28: 4418-4423.

Busch, D., Pilip, I.M., Vijh, S., Pamer, E.G., 1998.

Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection.  
Immunity, 8: 353-362.

Butcher, E.C., Picker, L.J., 1996.

Lymphocyte homing and homeostasis.  
Science 272: 60-66.

Callard, R.E., Herbert, J., Smith, S.H., Armitage, R.J., Costelloe, K.E., 1995.

CD40 cross-linking inhibits specific antibody production by human B cells.  
Int. Immunol. 7(11): 1809-1815.

Camp, R.L., Kraus, T.A., Birkeland, M.L., Pure, E., 1991.

High levels of CD44 expression distinguish virgin from antigen-primed B cells.  
J. Exp. Med. 173: 763-766.

Cerutti, A., Zan, H., Schaffer, A., Bergsagel, L., Harindranath, N., Max, E.E., Casali, M., 1998.

CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line.  
J. Immunol. 160(5): 2145-2157.

Choe, J., Kim, H.S., Armitage, R.J., Choi, Y.S., 1997.

The functional role of B cell antigen receptor stimulation and IL-4 in the generation of human memory B cells from germinal center B cells.  
J. Immunol. 159(8): 3757-3766.

Choe, J., Choi, Y.S., 1998.

IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells.  
Eur. J. Immunol. 28(2): 508-515.

Cohen, D., Green, M.S., Katzenelson, E., Slepon, R., Bercovier, H., Wiener, M., 1994.

Long-term persistence of anti-diphtheria toxin antibodies among adults in Israel. Implications for vaccine policy.  
Eur. J. Epidemiol. 10(3): 267-270.

- Czerkinsky, C., Nilsson, L.-A., Nygren, H., Ouchterlony, Ö., Tarkowski, A., 1983.  
A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells.  
J. Immunol. Methods 65: 109-121.
- Czerkinsky, C., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Nilsson, L.-A., Ouchterlony, Ö., 1988.  
A novel two colour ELISPOT assay.  
J. Immunol. Methods 115: 31-37.
- Davidson, H.W., Reid, P.A., Lanzavecchia A., Watts, C., 1991.  
Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes.  
Cell 67: 105-116.
- DeFranco, A.L., 1992.  
Tyrosine phosphorylation and the mechanism of signal transduction by the B-lymphocyte antigen receptor.  
Eur. J. Biochem. 210: 381-388.
- DeFranco, A.L., 1993.  
B lymphocyte activation.  
Aus: Paul, W.E. (Herausgeber). Fundamental Immunology, third edition, Raven Press, New York, chapter 14: 513-516.
- Dubois, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fayette, J., Briere, F., Banchereau, J., Caux, C., 1998.  
Critical role of IL12 in dendritic cell-induced differentiation of naive lymphocytes.  
J. Immunol. 161(5): 2223-2231.
- Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., Spencer, J., 1995.  
Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells.  
J. Exp. Med. 182(2): 559-566.
- Fievet, N., Chougnet, C., Dubois, B., Deloron, P., 1993.  
Quantification of antibody-secreting lymphocytes that react with Pf155/RESA from Plasmodium falciparum: an ELISPOT assay for field studies.  
Clin. Exp. Immunol. 91: 63-67.
- Fishman, M.A., Perelson, A.S., 1995.  
Lymphocyte memory and affinity selection.  
J. Theor. Biol. 173: 241-262.
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., Cossarizza, A., 1995.  
The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians.  
Immunol. Today 16(1): 12-16.

- Freitas, A.A., Rocha, B.B., 1993.  
Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition.  
*Immunol. Today* 14(1): 25-29.
- Garrone, P., Neidhardt, E.M., Garcia, E., Galibert, L., Van Kooten, C., Banchereau, J., 1995.  
Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes.  
*J. Exp. Med.* 182: 1265-1273.
- Gottlieb, S., McLaughlin, F.X., Levine, L., Latham, W.C., Edsall, G., 1964.  
Long-term immunity to tetanus - a statistical evaluation and its clinical implications.  
*Am. J. Pub. Health* 54: 961-971.
- Gray, D., Skarvall, H., 1988.  
B cell memory is short-lived in the absence of antigen.  
*Nature* 336: 70-73.
- Gray, D., 1993  
Immunological memory.  
*Annu. Rev. Immunol.* 11: 49-77.
- Gray, D., Siepmann, K., van Essen, D., Poudrier, J., Wykes, M., Jainandunsing, S., Bergthorsdottir, S., Dullforce, P., 1996.  
B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells.  
*Immunol. Rev.* 150: 45-61.
- Grouard, G., deBouteiller, O., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1995.  
Human follicular dendritic cells enhance cytokine-dependent growth and differentiation of CD40-activated B cells.  
*J. Immunol.* 155(7): 3345-3352.
- Hasselhorn, H.M., Nübling, M., Tiller, F.W., Hofmann, F., 1997.  
Diphtherie-Auffrischimpfung bei Erwachsenen.  
*Dtsch. med. Wschr.* 122: 281-286.
- Ho, F., Lortan, J.E., MacLennan, I., Khan, M., 1986.  
Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations.  
*Eur. J. Immunol.* 16: 1297-1301.
- Hofker, M.H., Walter, M.A., Cox, D.W., 1989.  
Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5567-5571.

- Hu, B.T., Lee, S.C., Marin, E., Ryan, D.H., Insel, R.A., 1997.  
Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro.  
J. Immunol. 159(3): 1068-1071.
- Insel, R.A., Varade, W.S., Marin, E., 1994.  
Human splenic IgM immunoglobulin transcripts are mutated at high frequency.  
Mol. Immunol. 31(5): 383-392.
- Jacob, J., Kelsoe, G., 1992.  
In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for the periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers.  
J. Exp. Med. 176: 679.
- Ju, S.-T., Panka, D.J., Cul, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z., Marshak-Rothenstein, A., 1995.  
Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation.  
Nature 373: 444-448.
- Kindler, V., Zubler, R.H., 1997.  
Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10 and IL-3.  
J. Immunol. 159(5): 2085-2090.
- Kjeldsen, K., Simonsen, O., Heron, I., 1985.  
Immunity against diphtheria 25-30 years after primary vaccination in childhood.  
Lancet 1: 900-902.
- Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., 1994.  
Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age.  
J. Exp. Med. 180: 1383-1393.
- Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., 1997.  
Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans.  
Blood 89(4): 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R., 1998.  
Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated (memory) B cells.  
J. Exp. Med. 188(9): 1679-1689.



- Klinman, N.R., 1997.  
The cellular origins of memory B cells.  
Semin. Immunol. 9(4): 241-247.
- Kosco, M.H., Pflugfelder, E., Gray, D., 1992.  
Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in-vitro.  
J. Immunol. 148: 2331.
- Kremmidiotis, G., Zola, H., 1995.  
Changes in CD44 expression during B cell differentiation in the human tonsil.  
Cell. Immunol. 161: 147-157.
- Lagresle, C., Bella, C., Daniel, P.T., Krammer, P.H., Defrance, T., 1995.  
Regulation of germinal center B cell differentiation. Role of the human APO-1/Fas (CD95) molecule.  
J. Immunol. 154(11): 5746-5756.
- Levy, M., Vieira, P., Coutinho, A., Freitas, A., 1987.  
The majority of „natural“ immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes.  
Eur. J. Immunol. 17: 849-854.
- Leyendeckers, H., Odendahl, M., Löhndorf, A., Irsch, J., Spangfort, M., Miltenyi, S., Hunzelmann, N., Assenmacher, M., Radbruch, A., Schmitz, J., 1999.  
Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG.  
Eur. J. Immunol. 29: 1406-1417.
- Linton, P.J., Decker, D.J., Klinman, N.R., 1989.  
Primary antibody forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulations.  
Cell 59: 1049.
- Liu, Y.J., Cairns, J.A., Holder, M.J., Abbot, S.D., Jansen, K.U., Bonnefoy, J.Y., Gordon, J., MacLennan, I.C., 1991.  
Rekombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis.  
Eur. J. Immunol. 21: 1107.
- Liu, Y.J., Banchereau, J., 1996.  
The paths and molecular controls of peripheral B-cell development.  
Immunologist 4: 55-66.
- Liu, Y.J., Grouard, G., deBouteiller, O., Banchereau, J., 1996.  
Follicular dendritic cells and germinal centers.  
Int. Rev. Cytol. 166: 139-179.

Liu, Y.J., Arpin, C., 1997.  
Germinal center development.  
*Immunol. Rev.* 156: 111-126.

Liu, Y.J., deBouteiller, O., Fugier-Vivier, I., 1997.  
Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers.  
*Curr. Opin. Immunol.* 9: 256-262.

Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Smith, C.I.E., Hammarstrom, L., Severinson, E., 1989.  
Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells.  
*Eur. J. Immunol.* 19: 1311-1315.

Mackall, C.L., Hakim, F.T., Gress, R.E., 1997.  
T-cell regeneration: all repertoires are not created equal.  
*Immunol. Today* 18(5): 245-251.

MacLennan, I.C., Liu, Y.J., Johnson, G.D., 1992.  
Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses.  
*Immunol. Rev.* 126: 143-161.

MacLennan, I.C., 1994.  
Germinal centers.  
*Annu. Rev. Immunol.* 12: 117-139.

Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A., Tew, J.G., 1980.  
The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity.  
*Immunol. Rev.* 53: 29.

Manser, T., Tumas-Brundage, K.M., Casson, L.P., Giusti, A.M., Hande, S., Notidis, E., Vora, K.A., 1998.  
The roles of antibody variable region hypermutation and selection in the development of the memory B-cell compartment.  
*Immunol. Rev.* 162: 183-196.

Manz, R.A., Thiel, A., Radbruch, A., 1997.  
Lifetime of plasma cells in the bone marrow.  
*Nature* 388:133-134.

Manz, R.A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., Radbruch, A., 1998.  
Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen.  
*Int. Immunol.* 10(11): 1703-1711.

Margolis, H.S., 1993.  
Prevention of acute and chronic liver disease through immunization: hepatitis B and beyond.  
*J. Infect. Dis.* 168: 9-14.

Migot, F., Chougnet, C., Henzel, D., Dubois, B., Jambou, R., Fievet, N., Deloron, P., 1995.

Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a Plasmodium falciparum outbreak in Madagascar.

Clin. Exp. Immunol. 102: 529-534.

Mitrucker, H.W., Raupach, B., Kohler, A., Kaufmann, S.H., 2000.

Cutting edge: role of B-lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection.

J. Immunol. 164: 1648-1652.

Miyamura et al., 1974.

Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using VERO cells.

J. Biol. Standardization 2: 189-201.

Morell, A., Terry, W.D., Waldmann, T.A., 1970.

Metabolic properties of IgG subclasses in man.

J. Clin. Invest. 49: 673-680.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., Zinkernagel, R.M., 1993.

Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells.

Nature 362: 758-761.

Munoz, J.L., Insel, R.A., 1987.

In vitro human antibody production to the Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide.

J. Immunol. 139: 2026-2031.

Nagata, S., Golstein, P., 1995.

The Fas death factor.

Science 267: 1449-1456.

Naumann, P., Hagedorn, H.J., Paatz, R., 1983.

Diphtherie-Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung.

Dtsch. med. Wschr. 108: 1090-1096.

Noelle, R.J., Daum, J., Bartlett, W.C., McCann, J., Shepherd, D.M., 1991.

Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 T helper cells and lymphokines.

J. Immunol. 146: 1118-1124.

- Nossal, G.J.V., Makela, O., 1962.  
Autoradiographic studies on the immune response: I. the kinetics of plasma cell proliferation.  
J. Exp. Med. 115: 209-230.
- Nunez, G., Hockenbery, D., McDonnell, T.J., Sorensen, C.M., Korsmeyer, S.J., 1991.  
Bcl-2 maintains B cell memory.  
Nature 353: 71-73.
- Nunez, C., Nishimoto, N., Gartland, G.L., Billips, L.G., Burrows, P.D., Kubagawa, H., Cooper, M.D., 1996.  
B cells are generated throughout life in humans.  
J. Immunol. 156(2): 866-872.
- Osmond, D.G., 1990.  
B cell development in the bone marrow.  
Semin. Immunol. 2(3): 173-180.
- Paramithiotis, E., Cooper, M.D., 1997.  
Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 208-212.
- Parker, D.C., 1993.  
T-cell-dependent B cell activation.  
Annu. Rev. Immunol. 11: 331-360.
- Paul, W.E., 1993.  
The immune system.  
Aus: Paul, W.E. (Herausgeber). Fundamental Immunology, third edition, Raven Press, New York, chapter 1: 2.
- Phillips, R.A., Miller, R.G., 1974.  
Marrow environment not required for differentiation of B lymphocytes.  
Nature 251: 444-446.
- Picker, L.J., Siegelman, M.H., 1993.  
Lymphoid tissues and organs.  
Aus: Paul, W.E. (Herausgeber). Fundamental Immunology, third edition, Raven Press, New York, chapter 6: 176.
- Rajewsky, K., 1996.  
Clonal selection and learning in the antibody system.  
Nature 381: 751-758.

Rolink, A.G., Brocker, T., Bluethmann, H., Kosco-Vilbois, M.H., Andersson, J., Melchers, F., 1999.

Mutations affecting either generation or survival of cells influence the pool-size of mature B-cells.

Immunity 10: 619-628.

Rathmell, J.C., Goodnow, C.C., 1998.

The in vivo balance between B cell clonal expansion and elimination is regulated by CD95 both on B cells and in their micro-environment.

Immunol. Cell. Biol. 76(5): 387-394.

Russell, J.H., Wang, R., 1993.

Autoimmune gld mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells.

Eur. J. Immunol. 23(9): 2379-2382.

Scheibel, I., Bentzon, M.W., Christensen, P.E., Biering, A., 1966.

Duration of immunity to diphtheria and tetanus after active immunization.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 67: 380-392.

Schittek, B., Rajewsky, K., 1990.

Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors.

Nature 346: 749-751.

Schooley, J.C., 1961.

Autoradiographic observations of plasma cell formation.

J. Immunol. 86: 331-337.

Schwedler, U., Jack, H-M., Wabl, M., 1990.

Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement.

Nature 345: 452-455.

Sedgwick, J.D., Holt, P.G., 1983.

A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells.

J. Immunol. Methods 57: 301-309.

Siekevitz, M., Kocks, C., Rajewsky, K., Dildrop, R., 1987.

Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses.

Cell 48: 757.

Simonsen, O., Kjeldsen, K., Heron, I., 1984.

Immunity against tetanus and effect of revaccination 25-30 years after primary vaccination.

Lancet: 1240-1242.

- Slifka, M.K., Matloubian, M., Ahmed, R., 1995.  
Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection.  
*J. Virol.* 69(3): 1895-1902.
- Slifka, M.K., Ahmed, R., 1996.  
Limiting dilution analysis of virus-specific memory B cells by an ELISPOT assay.  
*J. Immunol. Methods* 199: 37-46.
- Slifka, M.K., Ahmed, R., 1998.  
Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production.  
*Curr. Opin. Immunol.* 10(3): 252-258.
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., Ahmed, R., 1998.  
Humoral immunity due to long-lived plasma cells.  
*Immunity* 8: 363-372.
- Smith, K.G.C., Weiss, U., Rajewsky, K., Nossal, G.J.V., Tarlinton, D.M., 1994.  
Bcl-2 increases memory B cell recruitment but does not perturb selection in germinal centers.  
*Immunity* 1: 803-813.
- Smith, K.G.C., Nossal, G.J.V., Tarlinton, M., 1995.  
Fas is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(11): 628-632.
- Sprent, J., 1993.  
Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes.  
*Curr. Opin. Immunol.* 5(3): 433-438.
- Sprent, J., 1994.  
T and B memory cells.  
*Cell* 76: 315-322.
- Sprent, J., Tough, D.F., 1994.  
Lymphocyte life-span and memory.  
*Science* 265: 1395-1400.
- Steinhoff, U., Müller, U., Schertler, A., Hengartner, H., Aguet, M., Zinkernagel, R.M., 1995.  
Antiviral protection by VSV-specific antibodies in interferon  $\alpha/\beta$ -receptor deficient mice.  
*J. Virol.* 64: 2153-2158.

- Stevens, R.H., Saxon, A., 1978.  
Immunoregulation in humans. Control of antitetanus antibody production after booster immunization.  
*J. Clin. Invest.* 62: 1154.
- Stevens, R.H., Macy, E., Morrow, C., Saxon, A., 1979.  
Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus antibody producing B cells following in vivo booster immunization.  
*J. Immunol.* 122: 2498.
- Szkal, A.K., Kosco, M.H., Tew, J.G., 1989.  
Microanatomy of lymphoid tissue during the induction and maintenance of humoral immune responses: structure function relationships.  
*Annu. Rev. Immunol.* 7: 91-111.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., Reed, J.C., 1995.  
Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity.  
*Cell* 80(2): 279-284.
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., deVries, J.E., 1998.  
Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27.  
*J. Exp. Med.* 188(9): 1691-1703.
- Terstappen, L.W.M.M., Johnsen, S., Segers-Nolten, M.J., Loken, M.R., 1990.  
Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry.  
*Blood* 76: 1739.
- Tew, J., Mandel, T.E., Burgess, A.W., 1979.  
Retention of intact HSA for prolonged periods in the popliteal lymph nodes of specifically immunized mice.  
*Cell. Immunol.* 45: 207.
- Tew, J.G., DiLosa, R.M., Burton, G.F., Kosco, M.H., Kupp, L.I., Masuda, A., Szkal, A.K., 1992.  
Germinal centers and antibody production in the bone marrow.  
*Immunol. Rev.* 126: 99-112.
- Tierens, A., Delabie, J., Michiels, L., Vandenberghe, P., De-Wolf-Peeters, C., 1999.  
Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion.  
*Blood* 93(1): 226-234.

- Tilzey, A.J., 1995.  
Hepatitis B vaccine boosting: the debate continues.  
*Lancet* 345: 1000-1001.
- Tonegawa, S., 1983.  
Somatic generation of antibody diversity.  
*Nature* 302(5909): 575-581.
- Tripp, R.A., Lathi, J.M., Doherty, P.C., 1995.  
Laser light suicide of proliferating virus-specific CD8+ T cells in an in vivo response.  
*J. Immunol.* 155(8): 3719-3721.
- Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H.L., Pieters, J., 1994.  
Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment.  
*Nature* 369: 120-126.
- Uckun, F.M., 1990.  
Regulation of human B-cell ontogeny.  
*Blood* 76: 1908-1923.
- van Es, J.H., Meyling, F.H.J.G., Logtenberg, T., 1992.  
High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B cell repertoire.  
*Eur. J. Immunol.* 22: 2761.
- Vieira, P., Rajewsky, K., 1988.  
The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice.  
*Eur. J. Immunol.* 18: 313-316.
- Vieira, P., Rajewsky, K., 1990.  
Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help.  
*Int. Immunol.* 2(6): 487-494.
- Watanabe, D., Suda, T., Hashimoto, H., Nagata, S., 1995(a).  
Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders.  
*EMBO J.* 14(1): 12-18.
- Watanabe, D., Suda, T., Nagata, S., 1995(b).  
Expression of Fas in B cells of the mouse germinal center and Fas-dependent killing of activated B cells.  
*Int. Immunol.* 7(12): 1949-1956.
- West, D.J., Calandra, G.B., 1996.  
Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination.  
*Vaccine* 14(11):1019-1027.



Wismans, P.J., van Hattum, J., de Gast, G.C., Endeman, H.J., Poel, J., Stolk, B., Maikoe, T., 1989(a).

The spot-ELISA: a sensitive in vitro method to study the immune response to hepatitis B surface antigen.

Clin. Exp. Immunol. 78: 75-78.

Wismans, P.J., van Hattum, J., Mudde, G.C., Endeman H.J., Poel, J., de Gast, G.C., 1989(b).

Is booster injection with hepatitis B vaccine necessary in healthy responders? A study of the immune response.

J. Hepat. 8: 236-240.

Wismans, P.J., van Hattum, J., de Gast, G.C., Bouter, K.P., Diepersloot, R.J.A., Maikoe, T., Mudde, G.C., 1991.

A prospective study of in vitro anti-HBs producing B cells (Spot-ELISA) following primary and supplementary vaccination with a recombinant hepatitis B vaccine in insulin dependent diabetic patients and matched controls.

J. Med. Virol. 35: 216-222.

Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kündig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., Hengartner, H., 1996.

On immunological memory.

Annu. Rev. Immunol. 14: 333-367.

Zinkernagel, R.M., 1997.

Protective antibody responses against viruses.

Biol. Chem. 378: 725-729.

## 8. ANHANG

### 8.1. Materialien

#### 8.1.1. Antikörper

##### 8.1.1.1. unkonjugierte Antikörper

Antikörper	Hersteller
Ziege-anti-Human IgA+IgG+IgM	Dianova
Ziege-anti-Human IgM	Dianova
Ziege-anti-Human IgG	Calbiochem

##### 8.1.1.2. konjugierte Antikörper

Antikörper	Hersteller
alkalische Phosphatase-Ziege-anti-Human IgA+IgG+IgM	Dianova
alkalische Phosphatase-Ziege-anti-Human IgM	Calbiochem
alkalische Phosphatase-Ziege-anti-Human IgG	Dianova
FITC-anti-CD19	Dako
PE-anti-CD3	Dako

##### 8.1.2. Chemikalien und Reagentien

Reagenz	Hersteller
Agarose (niedriger Schmelzpunkt)	Sigma
Amino-Methyl-Propanol (AMP)	Sigma
Ampuwa	Fresenius
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Ethanol 70%	Baker
Ficoll-Paque	Pharmacia
Glutamin (200 mmol)	Sigma

Glycerin (87%)	Merck
Heparin	Novo Nordisc
Hepes	ICN Biomedicals
Isopropanol	Apotheke der Univ. Wzbg.
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Boehringer
Natriumchlorid (isoton)	Fresenius
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin/Streptomycin (10.000 IU/ml)	Gibco
RPMI 1640	Sigma
Salzsäure, rauchend/nicht-rauchend	Merck
Stickstoff, flüssig	Univ. Würzburg
Tris	Sigma
Triton X-100	Serva
Trypanblau	Sigma-Aldrich

### 8.1.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Webeco
Brutschrank	Heraeus
Durchflußzytometer (FACS)	Becton-Dickinson
Einfrierbox	Nalgene
Eismaschine	Scotsman
Gefrierschrank	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop	Nikon, Zeiss
Multipipette	Eppendorf
pH-Meter	WTW
Pipetten, einstellbar	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra-Biosciences
Plattenzentrifuge	Heraeus

Rüttler	Renner
Sterilwerkbank	Flow Laboratories
Stickstofftank	Cryoson
Vortexer	Scientific Industries
Waagen	Chyo Corporation
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Hettich

#### 8.1.4. Glas- und Plastikwaren

Glas-/Plastikartikel	Hersteller
Combitips	Eppendorf
Einfrierröhrchen (1,8 ml, 4,5 ml)	Nunc
Einmalhandschuhe	Safeskin
Glaspipetten	Witeg
Meßzylinder	Fortuna, Schott
Pasteurpipetten	Fortuna
Petrischalen (quadratisch, 25 Felder)	Dunn/Sterilin
Pipettenspitzen	Gilson
Plastikpipetten	Falcon
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf
Rundbodenplatten (96 Felder)	Greiner
Sterilfilter (45 µm)	Schleicher und Schuell
Zählkammer (Neubauer)	Marienfeld
Zellkulturflaschen	Greiner, Renner
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Falcon, Greiner

### 8.1.5. Medien und Puffer

#### komplettes Medium

---

500 ml RPMI 1640  
50 ml fötales Kälberserum (inaktiviert)  
10 ml Glutamin  
5 ml Hepes Puffer  
5 ml Penicillin/Streptomycin

#### PBS (phosphate buffered saline)

---

85,00 g NaCl  
0,20 g KCl  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,00 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,67 g Ca<sub>2</sub>Cl  
1,00 g MgCl<sub>2</sub>  
0,10 g Rinderserumalbumin  
(auf 1 l H<sub>2</sub>O)

#### PBS + (für FACS-Färbungen)

---

PBS  
0,02% Natriumazid  
0,50% Rinderserumalbumin

#### Substratpuffer

---

95,80 ml Amino-Methyl-Propanol (AMP)  
150,00 mg MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
100,00 µl Triton X  
900,00 ml H<sub>2</sub>O  
mit rauchender Salzsäure auf pH 10,25 einstellen

### 8.1.6. Mitogene, Seren, Zytokine

Präparat	Hersteller
fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
humanes Serum	
Immunglobulin-Präparat (Alphaglobin)	Alpha-Chemicals
Lymphocult-T-HP (Interleukin 2)	Biotest
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Staphylococcus aureus cells (Cowan I)	Calbiochem

### 8.1.7. Toxoide

Toxoid	Hersteller
Diphtherie-Toxoid (4300 LF/ml)	Chiron Behring
Tetanus-Toxoid (3800 LF/ml)	Chiron Behring
(beide Antigene in Konservierungsstofffreiem PBS)	

## 8.2. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Amino-Methyl-Propanol
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Boosterimpf.	Boosterimpfung
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of differentiation
D bzw. DT	Diphtherietoxoid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immuno spot assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
HBs	Hepatitis-B-virus-surface-antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HSA	Heat stable antigen
I.E./I.U.	Internationale Einheiten/International Units
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin(e)
LF	Limes flocculationis
m	männlich
MHC	Major histocompatibility complex
MW	Mittelwert
NT	Neutralisationstest
PALS	Periarterioläre lymphatische Scheide
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
p. v.	post vaccinationem
prae vacc.	prae vaccinationem
SAC	Staphylococcus Aureus Stamm Cowan I
sez.	sezernierend(e)
SSC	Side scatter
T bzw. TT	Tetanustoxoid
Tab.	Tabelle
TGF $\beta$	Tumorgrowthfactor $\beta$
w	weiblich

## **DANKSAGUNGEN**

Mein herzlicher Dank gilt zu allererst Herrn Professor Dr. H.W. Kreth für die Überlassung des Themas, die fachliche und menschliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit und die vielen wertvollen Anregungen.

Weiterhin möchte ich besonders Herrn Dr. R. Nanan danken, der sich immer prompt aller Probleme angenommen hat und die Arbeit in hervorragender Weise betreut hat.

Bei Frau Professor Dr. A. Schimpl bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Frosch am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und bei Herrn PD Dr. med. habil. S. Bigl an der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen für die Bestimmung der Antitoxin-Titer der Probandenseren.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Bröker bei der Firma Chiron Behring/Marburg für die Überlassung der Toxoide und die wichtigen Anregungen zum Thema meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich dem Team des Immunologischen Labores, hier insbesondere Frau B. Ottensmeier und Frau S. Seidenspinner, danken, die mir geholfen haben, mich in das neue Gebiet einzuarbeiten, und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke auch Frau Dr. D. Schliephake, vormals am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, die mich mit der Methode des ELISPOT-Testes vertraut gemacht hat, und von der ich viele wertvolle Tips erhalten habe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank v.a. auch all den Probanden, die mir für Blutspenden und die Impfung zur Verfügung standen, und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## LEBENS LAUF

**Name:** Daniela Heinrich

**geboren:** 22. April 1974 in Warstein

**Eltern:** Ulrich Heinrich, Programmierer  
Lita-Angela Heinrich, Realschullehrerin

**Geschwister:** Verena Gass, geb. Heinrich, Realschullehrerin

**Schulbildung:** 1980-1984 Grundschule in Rüthen  
1984-1993 Städtisches Gymnasium Rüthen, Abschluß  
Abitur, Note 1,0

**Hochschulausbildung:** WS 1993: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Universität Würzburg  
September 1995: Ärztliche Vorprüfung  
August 1996: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Oktober 1996: Beginn des experimentellen Teils der  
Promotionsarbeit im Immunologischen Labor der  
Universitäts-Kinderklinik  
März 1999: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
März-Oktober 1999: Fertigstellung der Promotionsarbeit  
Oktober 1999-September 2000: Praktisches Jahr im  
Kantonsspital Uri, Schweiz, in Kliniken der University of  
Toronto, Canada, in der Missionsärztlichen Klinik,  
Würzburg und der Universitäts-Kinderklinik Würzburg  
November 2000: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Abschluß des Studiums mit der Gesamtnote 1,0  
Februar 2001: Beginn der Tätigkeit als Ärztin im  
Praktikum an der Universitäts-Kinderklinik in Würzburg

Würzburg im Februar 2002

*Daniela Heinrich*