

Matthias Ruff

Dr. med.

Phänotypisierung und Apoptoseverhalten gewebständiger B-Lymphozyten unter besonderer Berücksichtigung extrafollikulärer B-Zellen

Geboren am 23. März 1963 in Pforzheim

Reifeprüfung am 12. Mai 1982 in Neuenbürg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1984/85 bis WS 1990/91

Physikum am 11. April 1986 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Mosbach

Staatsexamen am 8. Mai 1991 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. P. Möller

In dieser Studie sind tonsilläre B-Lymphozytenpopulationen phänotypisiert und deren Apoptoseverhalten untersucht worden. Hierbei erweist sich CD44 in der Immunfluoreszenz als ein sehr gutes B-Zell-Unterscheidungsantigen: Zentroblasten der basalen Zone des folliculären Keimzentrums mit dem serologischen Phänotyp $\text{IgD}^- \text{CD38}^+ \text{CD77}^+$ sind CD44^- . Die Zentrozytenpopulation der apikalen Keimzentrumszone ($\text{IgD}^- \text{CD38}^+ \text{CD77}^-$) ist $\text{CD44}^{(+)}$. Mantelzonen-B-Lymphozyten (IgD^+) und extrafollikuläre B-Zellen ($\text{IgD}^- \text{CD38}^-$) exprimieren CD44 stark.

Gereinigte tonsilläre B-Lymphozyten sind durch eine Kombination magnetischer und durchflußzytometrischer Separationsmethoden entsprechend ihrer Oberflächenexpression von IgD, CD44 und CD77 differenziert und nach Kurzzeit-Zellkultur mittels In-Situ-Nick-Translation und Agarosegelelektrophoreseuntersuchungen genomischer DNA-Fragmentation auf Sensibilität für Spontanapoptose in vitro analysiert worden: 70% der Zentroblasten und Zentrozyten des folliculären Keimzentrums sterben in Kultur durch Apoptose. Die Hälfte der Mantelzonen-B-Lymphozyten weist Zeichen des programmierten Zelltodes auf. Extrafollikuläre B-Lymphozyten sind dagegen extrem resistent gegen Spontanapoptose in vitro. Immunfluoreszenzfärbungen kurzzeitkultivierter tonsillärer B-Lymphozyten mit Propidiumjodid als Indikator für abgestorbene Zellen bestätigen die Ergebnisse der Apoptosenachweismethoden. Die B-Zell-Apoptose in situ ist mit Hilfe der TUNEL-Methode darstellbar. Die hohe Spontanapoptose der Keimzentrums-B-Zell-Subpopulationen sowie die extreme Apoptoseresistenz der extrafollikulären B-Lymphozyten in vitro finden ihr Äquivalent im tonsillären Gewebe. Die relative hohe Apoptoserate der naiven IgD^+ -B-Zellen in Kultur korreliert jedoch nicht mit der niedrigen

Apoptosenzahl der Mantelzonen-B-Lymphozyten in situ und läßt auf eine Abhängigkeit zumindest einer Mantelzonensubpopulation von Apoptose verhindernden Signalen der natürlichen Umgebung im Lymphfollikel schließen. Die Autarkie und Langlebigkeit der extrafollikulären B-Lymphozyten in vitro und in situ spricht für die Gedächtniszellfunktion, welche dieser B-Lymphozytenpopulation zugeschrieben wird.

Durch Gegenüberstellung der verschiedenen Erscheinungsformen in peripheren lymphatischen Organen sind drei Arten von extrafollikulären B-Lymphozyten mit jeweils unterschiedlichem Adhäsionsrezeptorprofil differenzierbar: eine kleine (lymphoide), eine mittelgroße (zentrozytoide) und eine große (monozytoide) Variante. Die lymphoide extrafollikuläre B-Zelle ist CD11c⁻ und stark CD62L-positiv. Zentrozytoide extrafollikuläre Zellen sind CD11c⁻ und exprimieren CD62L (L-Selectin) auf mittlerem Niveau. Monozytoide B-Zellen verfügen über eine mittelstarke CD11c- und eine schwache L-Selectin-Expression. Die blastäre Morphologie weist auf eine Stimulation der monozytoiden B-Zelle hin. Daher ist die Hypothese einer aktivierungsassoziierten kontinuierlichen Umwandlung der kleinen lymphoiden EF-B-Zelle zu dem großen monozytoiden B-Lymphozyten postulierbar, verbunden mit der Herabregulierung des an Venolenendothel bindenden Moleküls CD62L und parallel der Induktion eines alternativen Adhäsionsmoleküls, des β 2-Integrins CD11c/CD18. Tonsilläre B-Zell-Isolate sind in Kurzzeit-Zellkultur verschiedenen Aktivierungsprotokollen unterworfen worden. Inkubation mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) und zu einem geringeren Ausmaß Aktivierung mit *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) und Interleukin-4 überführt sowohl B-Lymphozyten hoher physikalischer Dichte (Mantelzonenzellen und lymphoide extrafollikuläre B-Lymphozyten) als auch B-Zellen niedriger Dichte (Zentroblasten und Zentrozyten des Keimzentrums) in das Differenzierungsstadium der großen, monozytoiden extrafollikulären B-Zelle. Extrafollikuläre B-Lymphozyten sind also zytokininduzierter Veränderung in der Morphologie sowie im Adhäsionsrezeptorprofil unterworfen. Da PMA ein künstlicher Zellaktivator ist, bleibt die physiologische Signalfolge, welche den Phänotyp der großen, monozytoiden extrafollikulären B-Zelle herbeiführt, unbekannt.

CD95 (APO-1) ist ein Oberflächenrezeptor, der nach Ligation Apoptose vermitteln kann. Die Verteilung von CD95 und CD27, zwei Mitgliedern der NGF/TNF-Rezeptor-Familie, auf tonsillären B-Lymphozyten ist immunhistologisch und durch Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen analysiert und mit dem Apoptoseverhalten der B-Zell-Untergruppen verglichen worden. Die Korrelation zwischen hoher CD95-Oberflächenexpression und ausgeprägter Apoptosesensibilität beider Keimzentrums-B-Zell-Populationen in vitro und in situ befürwortet die Hypothese einer Prägung der Zentroblasten und Zentrozyten für den programmierten Zelltod bereits in vivo durch Aktivierung des CD95-Rezeptors. Die CD95-Expression tonsillärer B-Lymphozyten wird in vitro durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ sowie durch SAC in Kombination mit Interleukin-2 gesteigert. Im Keimzentrum des Lymphfollikels könnten daher Anti-

genkontakt und Zytokineinfluß die CD95-Expression der Keimzentrums-B-Lymphozyten erhöhen und die Bindung des CD95-Liganden, exprimiert durch CD4⁺ T-Zellen, am CD95-Rezeptor die Selektion der für Antigen niedrigaffinen B-Lymphozyten durch Apoptose auslösen. Das CD27-Antigen wird im folliculären Keimzentrum nur durch Zentrozyten exprimiert. Auffallend ist die reziproke Verteilung von CD27 und CD77 im Keimzentrum. CD27 ist daher neben CD77 ein sehr gutes Unterscheidungsantigen zwischen Zentroblasten (CD77⁺ CD27⁻) und Zentrozyten (CD77⁻ CD27⁺). Eine Involvierung des Rezeptors bei der B-Zell-Apoptose ist wegen der fehlenden Expression der Zentroblasten unwahrscheinlich. CD27 könnte aber kostimulierende Signale für CD27⁺ Zentrozyten vermitteln und dadurch an der B-Zell-Differenzierung im Keimzentrum teilhaben. Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der CD27-Oberflächenexpression auf B-CLL-Zellen durch Zytokine sind in dieser Arbeit auf tonsillären B-Lymphozyten nicht beobachtet worden. Weder Inkubation mit TNF- α und γ -Interferon noch Aktivierung mit SAC in Anwesenheit von Interleukin-2 oder Interleukin-4 führt in vitro zu einer Modulation der CD27-Oberflächendichte, von den eingesetzten Stimulanzen bewirkt allein PMA eine Reduktion der CD27-Expression auf tonsillären B-Lymphozyten.