

**Aus dem Institut für Anatomie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Jürgen Westermann**

---

Die Bedeutung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors und  
Lymphotoxin-beta-Rezeptors bei der Entstehung  
lymphatischen Gewebes im adulten Organismus:  
Eine quantitative Analyse der Milzstruktur bei der Maus

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

Karola Klaperski

aus Wuppertal

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Claudia Schmidtke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.03.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

*Der Gebildete treibt die  
Genauigkeit nicht weiter  
als es der Natur entspricht.*

*(Aristoteles,  
griechischer Philosoph)*

**Meiner Familie**

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1. Tiere und Tierhaltung .....	12
2.2. Eingriffe .....	12
2.2.1. Organtransplantation .....	12
2.2.2. Stimulationsversuch mit SRBC .....	13
2.2.3. Entnahme der Milzen .....	13
2.3. Färbungen .....	14
2.3.1. APAAP-Methode .....	14
2.3.2. Avidin-Biotin-Methode .....	14
2.3.3. Ablauf des Färbevorgangs .....	16
2.4. Auswertung der Milzschnitte .....	19
2.5. Darstellung .....	20
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
3.1. Quantitative Bestimmung der Kompartimente in der Wildtypmaus .....	21
3.2. Quantitative Analyse der Milzkompartimente der TNFR- und LT $\beta$ R- Knockout-Maus .....	31
3.3. Die avaskuläre Milztransplantation .....	36
3.3.1 Kinetik .....	36
3.3.2 Quantitative Analyse der Regenerate .....	40
3.4. Die Funktion des TNFR und LT $\beta$ R bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus .....	44
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>50</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>64</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
<b>7 Danksagung</b> .....	<b>85</b>
<b>8 Lebenslauf</b> .....	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
BLC	engl. <i>B lymphocyte chemoattractant</i>
CCL	C-C Chemokin-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CXCL	C-X-C Chemokin-Ligand
CXCR	C-X-C Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i> )
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>
FDC	Follikulär Dendritische Zellen
FO	Follikel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KE	Keimzentrum
KG	Körpergewicht
LIGHT	engl. <i>Homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM on T cells</i>
LT $\alpha$	Lymphotoxin-alpha
LT $\beta$	Lymphotoxin-beta
LT $\beta$ R	Lymphotoxin-beta-Rezeptor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mM	Millimolar
MMM	metallophile Marginalzonenmakrophagen
MZ	Marginalzone
MZM	Marginalzonenmakrophagen
NK	natürliche Killerzellen
PALS	Periarteriöle Lymphozytenscheide
PBS	Phosphat bufferd saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PNA	engl. <i>Peanut agglutinin</i>
RP	rote Pulpa
SLC	engl. <i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
SRBC	Schaferythrozyten (engl. <i>sheep red blood cells</i> )
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	engl. <i>tumor growth factor</i>
TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
WP	weiße Pulpa
WT	Wildtyp

## 1 Einleitung

Das Immunsystem bildet ein komplexes System zur Abwehr schädlicher Mikroorganismen. Es erkennt und entfernt mit Hilfe spezialisierter Zellen Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Das Immunsystem setzt sich aus zwei Hauptkomponenten, dem angeborenen (unspezifischen) und dem erworbenen (spezifischen) Immunsystem zusammen, die eng miteinander vernetzt sind (23, 24).

Zur angeborenen Immunantwort gehören physikalische, mechanische und chemische Abwehrmechanismen, aber auch spezialisierte Zellen wie Makrophagen, Granulozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen (NK). Die Rezeptoren dieser Zellen sind in ihrer Variation limitiert und auf Strukturen fremder Mikroorganismen mit repetitiven Mustern abgestimmt. Die unspezifische Immunantwort erfolgt schnell, läuft aber immer im gleichen Schema ab, unabhängig davon, wie oft der Körper mit dem Mikroorganismus in Kontakt gekommen ist (24, 70).

Die Bestandteile des erworbenen Immunsystems sind die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. Beide Zelltypen bilden durch somatische Rekombination ihrer Rezeptorgene eine Vielfalt an antigenerkennenden Rezeptoren. Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem entwickeln T- und B-Zellen nach erstmaligem Kontakt mit einem fremden Antigen ein zelluläres, immunologisches Gedächtnis. Bei erneuter Exposition mit demselben Antigen erfolgt eine schnellere und effektivere Abwehr (23). Knochenmark und Thymus stellen die primär lymphatischen Organe dar. T-Zellen entstehen im Knochenmark reifen dann im Thymus zu funktionsfähigen Zellen (23, 24). Im Knochenmark entstehen und reifen B-Lymphozyten. Der Begriff „sekundär lymphatische Organe“ umfasst Lymphknoten, Peyersche Platten und die Milz. Sie bieten ein geeignetes Umfeld zur Initiierung, zum Ablauf und zur Kontrolle der Immunantworten. Als besondere Eigenschaft weisen sekundär lymphatische Organe eine spezielle histologische Struktur auf, die eine Separierung der T- und B-Zellen in verschiedene Areale beinhaltet (42, 69).

Neben primär und sekundär lymphatischen Organen existiert der Ausdruck des „tertiär lymphatischen Gewebes“ (122). Mit diesem Ausdruck wird ein Gewebe beschrieben, das bei pathologischen Prozessen, wie chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen, im adulten Organismus entsteht (10, 61, 91). Tertiär lymphatisches Gewebe zeichnet sich durch einen Aufbau aus, der dem histologischen Bild sekundär lymphatischer Organe gleicht (41, 122). Es findet auch hier eine

Separierung der Lymphozyten in T- und B-Areale statt. Je mehr Ähnlichkeit das ektope lymphatische Gewebe zu sekundär lymphatischem Gewebe aufweist, desto schwerer ist das beobachtete Krankheitsbild (122). Während viele Faktoren der Ontogenese sekundär lymphatischer Organe bereits identifiziert werden konnten (32, 68), sind über die Entstehung neuer lymphatischer Gewebe im adulten Organismus wenige Details bekannt. An einigen Studien konnten bereits Parallelen der Entstehung sekundär lymphatischer Organe und tertiär lymphatischen Gewebes gezeigt werden (5, 40). Um neues lymphatisches Gewebe entstehen zu lassen, wurde in früheren Studien häufig aktiv in Regulationsmechanismen eingegriffen (28, 55, 56). Initiale Faktoren, die für die Entstehung tertiär lymphatischen Gewebes notwendig sind, konnten unter diesen Bedingungen nicht bestimmt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle einiger bereits bekannter Regulatoren der Ontogenese lymphatischer Organe bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus zu untersuchen. Mit Hilfe der avaskulären Milztransplantation wird die problematische künstliche Induktion lymphatischen Gewebes umgangen. Seit langem ist bekannt, dass nach vorhergehender Entfernung der ontogenetisch angelegten Milz bei der Transplantation von Milzgewebe ein Regenerat entsteht (79). Die Transplantation erfolgt ohne operativen Anschluss an Blutgefäße, wodurch es zunächst zu einer fast vollständigen Nekrose des eingesetzten Gewebes kommt. Nach Abbau dieser Nekrose entsteht an gleicher Stelle ein Milzregenerat. Dieses beinhaltet die strukturellen Eigenschaften lymphatischen Gewebes (112). Da die Entstehung dieses Regenerats in einem reifen Organismus stattfindet, ohne dass weitere Manipulationen vorgenommen werden, soll dieses Modell in der vorliegenden Arbeit als Modell zur Entstehung tertiär lymphatischen Gewebes überprüft und angewandt werden.

### **Die Milz**

Die Milz erhält als einziges sekundär lymphatisches Organ die Antigene direkt aus dem Blut. Sie zeichnet sich durch eine ausgereifte histologische Struktur aus, die eng mit den Funktionen des Organs verknüpft ist (93, 110). Die Verteilung der Zellen innerhalb der Milz stellt das Hauptkriterium für die Beurteilung lymphatischen Gewebes in dieser Arbeit dar. Im Folgenden werden daher Aufbau und Funktionen der Milz genauer erläutert (Abbildung 1):

Bereits bei der makroskopischen Betrachtung des Milzschnitts ist anhand der Farbe die Unterteilung des Gewebes in eine rote und eine weiße Pulpa möglich (94). Die rote Pulpa (RP) bildet vornehmlich den Ort der Blutfilterung (11). Gealterte oder veränderte Erythrozyten werden an der Passage durch die Milz behindert und durch Makrophagen in der roten Pulpa abgebaut. Eine kleinere Aufgabe hat die rote Pulpa bei der Unterstützung unspezifischer (30) und spezifischer Abwehrmechanismen (59, 113).

Die weiße Pulpa (WP) ist hauptsächlich an der Immunfunktion der Milz beteiligt und lässt sich mikroskopisch in Kompartimente unterteilen. Kompartimente sind charakterisiert durch die Zusammenlagerung bestimmter lymphatischer und nicht-lymphatischer Zellpopulation (111), die von einem Gerüst retikulärer extrazellulärer Matrix unterstützt werden (6). Die weiße Pulpa setzt sich aus der periarteriolären lymphatischen Scheide (PALS), den Primär- und Sekundärfollikeln zusammen. Nach außen ist sie durch die Marginalzone (MZ) zur roten Pulpa begrenzt.

Die PALS umgibt die Zentralarterien und repräsentiert das Areal, in dem vor allem T-Lymphozyten vorkommen (112). Dendritische Zellen myeloider Herkunft wandern nach Antigenkontakt in die PALS ein (101). Dort bilden sie als interdigitierende dendritische Zellen (DC) mit ihren Zellausläufern ein enges Netzwerk (52). Ihre Antigenpräsentation gilt als stärkster Aktivator der T-Zell-Reaktion (42). Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen (TH) migrieren daraufhin in die äußere PALS und in die B-Zell-Region, um mit antigen-erfahrenen B-Zellen in Kontakt zu treten (2).

Die Follikel (FO) sind das Kompartiment, in dem vor allem B-Zellen vorkommen (69). Primärfollikel enthalten naive, ruhende B-Zellen. Im Zentrum findet man ein Netzwerk follikulär dendritischer Zellen (FDC) (105). FDC stellen aufgrund ihrer fibroblastenähnlichen Morphologie vermutlich eine spezialisierte Form mesenchymal entstandener Stromazellen dar, wobei die hämatopoetische Herkunft noch nicht ganz ausgeschlossen werden konnte (20). Die Aufgabe der FDC ist es, Antigen-Antikörper-Komplexe auf ihrer Oberfläche einzufangen und diese den Zellen im Follikel zu präsentieren. Kommt eine B-Zelle mit einem passenden Antigen in Kontakt, beginnt ihre Orientierung in Richtung T-Zell-Areal, um dort von T-Helfer-Zellen aktiviert zu werden (14). Nach dem Kontakt mit T-Zellen findet eine Rückorientierung der B-Zellen in den Follikel statt, der dann zu einem Sekundärfollikel wird (66). Ein Sekundärfollikel besteht aus dem Keimzentrum (KE) im Innern und der Corona, die den nach außen verdrängten Primärfollikel repräsentiert (58). B-Zellen durchlaufen hier Zyklen

massiver Zellteilung mit genetischer Rekombination. Die Selektion der Zellklone mit besonders affinen B-Zell-Rezeptoren führt zur Bildung langlebiger B-Gedächtniszellen (86). Alternativ zur Keimzentrenbildung wandeln sich einige B-Zellen direkt zu Plasmazellen um und wandern in die rote Pulpa aus.

Die Marginalzone bildet die Eintrittspforte des Blutes zur weißen Pulpa (112). Hier findet ein direkter Kontakt zwischen Antigenen und antigenverarbeitenden Zellen statt (69). Zwei verschiedene Makrophagenarten, Marginalzonenmakrophagen (MZM) außen und die metallophilen Marginalzonenmakrophagen (MMM) innen (48) begrenzen die Marginalzone. Zwischen den Makrophagen liegt eine spezielle B-Zell-Subpopulation (54). Diese Zellen sind an den Oberflächenmarkern  $IgM^{high}$ ,  $IgD^{low}$ ,  $CD23^{low}$  gegenüber den follikulären B-Zellen mit der Oberfläche  $IgM^{low}$ ,  $IgD^{high}$ ,  $CD23^{low}$  differenzierbar (85). Die besonders langlebigen und ortständigen Marginalzonen-B-Zellen führen eine schnelle T-unabhängige Immunantwort aus (63). Dendritische Zellen und B-Zellen der Marginalzone tragen zur Antigenpräsentation und B-Zell-Aktivierung in den Follikeln bei (63).

**Marginalzone:**

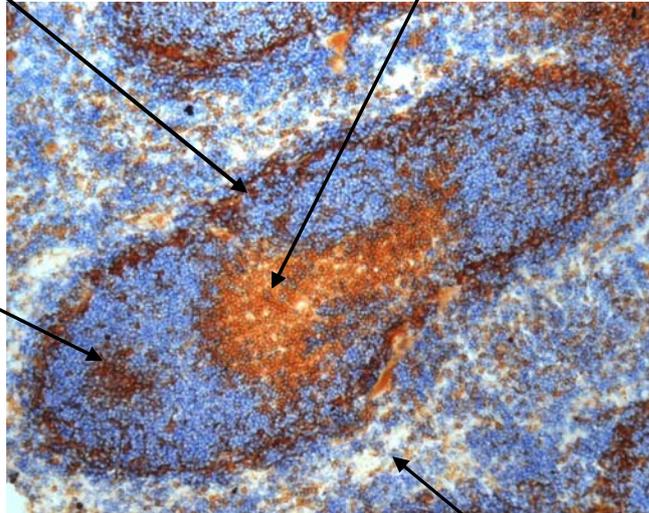
Die Marginalzone beinhaltet B-Zellen, Marginalzonenmakrophagen und metallophile Marginalzonenmakrophagen. Hier liegt die Eintrittsstelle der Zellen und der Antigene aus dem Blut.

**T-Areal/PALS:**

In der PALS befinden sich vornehmlich T-Zellen, dendritische Zellen und vereinzelte B-Zellen. Die PALS ist um die Zentralarteriole lokalisiert. Dendritische Zellen präsentieren Antigene, die von T-Zellen erkannt werden.

**B-Areal/Follikel:**

Die Follikel beinhalten B-Zellen, FDC und wenige T-Zellen. FDC präsentieren Antigene, die von B-Zellen erkannt werden. Sekundärfollikel können im Zentrum der Follikel entstehen und verdrängen dabei die Zellen des Primärfollikels nach außen.



**Weißer Pulpa:**

Die weiße Pulpa besteht aus den Kompartimenten PALS, Follikel und der Marginalzone.

**Rote Pulpa:**

In der roten Pulpa befinden sich Makrophagen und alle Blutbestandteile, die die Milz passieren. Gealterte Erythrozyten werden an ihrer Passage behindert und von Makrophagen abgebaut.

**Abbildung 1: Funktionelle Anatomie der Milz**

Milzschnitt mit Färbung der T-Zellen (orange-braun, anti-TCR $\beta$ ), B-Zellen (blau, anti-B220), metallophilen Makrophagen (dunkelbraun mit Zellausläufern, anti-MOMA1) und Zellen der Keimzentren (dunkelbraun, klar begrenzt, PNA-Anlagerung). Die Kompartimente, vorherrschende Zelltypen und die Funktionen der Kompartimente wurden beschrieben. PALS = periarterioläre Scheide; DC = dendritische Zellen; FDC = follikulär dendritische Zellen. (Abbildung modifiziert nach 21)

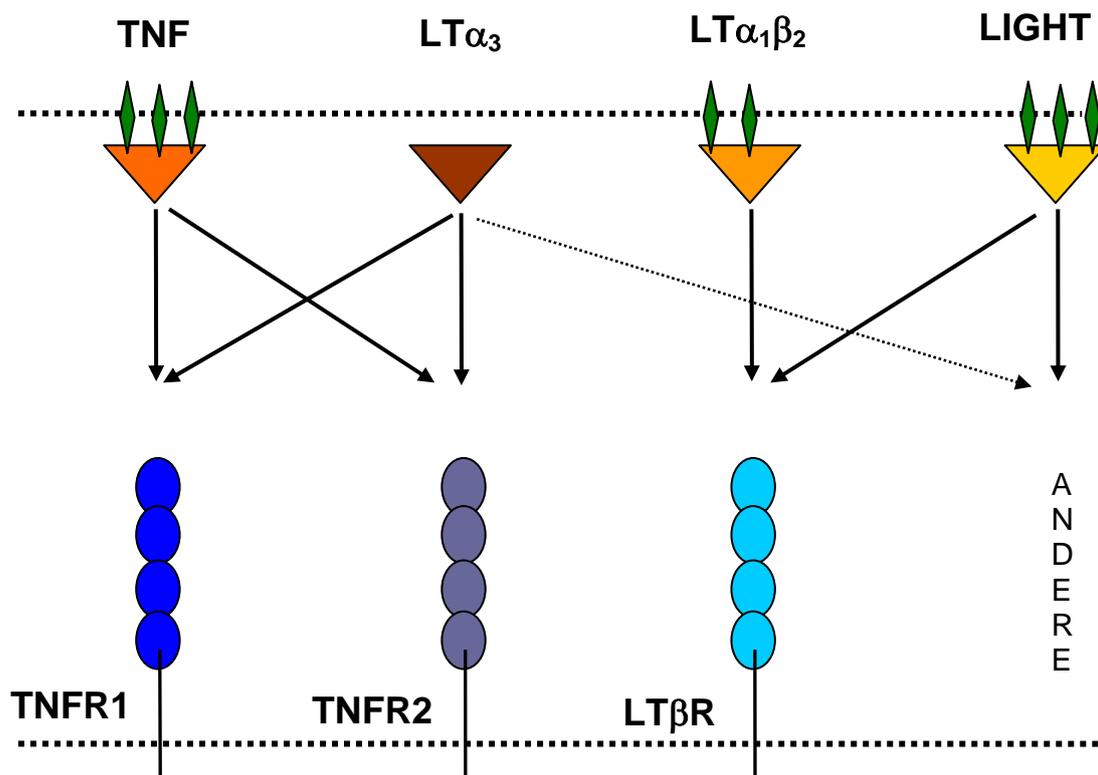
## **Regulationsmechanismen**

Entstehung und Erhalt der Kompartimente beruhen auf komplexen Kommunikationsnetzwerken verschiedener Zelltypen. Besonders bedeutend für die Entstehung lymphatischer Gewebe, ihre Organisation und die Regulation der Immunantwort sind die Zytokine der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie (34, 53, 96). Über 40 Mitglieder wurden bisher entdeckt. Ihre Moleküleigenschaften und intrazellulären Signalkaskaden werden detailliert erforscht (38, 118).

Das Liganden-Rezeptor-System um den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1/2) und Lymphotoxin-beta-Rezeptor (LT $\beta$ R) sind die elementaren Mitglieder der Superfamilie (16, 95). Da sich unter TNFR1 und 2 der TNFR1 als der relevante Rezeptor herausgestellt hat, wird dieser im Folgenden allgemein als TNFR bezeichnet. Bei wichtigen Abgrenzungen findet die spezielle Abgrenzung des TNFR2 statt. Den TNFR findet man in löslicher Form und ubiquitär auf Zelloberflächen. Durch Konkurrenz der löslichen Form mit den transmembranösen Rezeptoren können Zell-Zell-Interaktionen verhindert werden (114). Als Liganden des TNFR sind bisher der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Lymphotoxin-alpha (LT $\alpha$ ) identifiziert. TNF kommt membrangebunden auf Makrophagen, NK-Zellen, aktivierten T- und B-Lymphozyten, aber auch löslich im Blut vor (38, 114). LT $\alpha$  kommt als Homotrimer LT $\alpha_3$  frei im Blut vor, wenn es von seiner Bindungsstelle an aktivierten T-, B- oder NK-Zellen abgesetzt wird (114).

LT $\beta$ R ist auf Stromazellen (vor allem des lymphatischen Systems), auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen entdeckt worden (8, 9, 102). Heterotrimere aus Lymphotoxin-beta (LT $\beta$ ) und Lymphotoxin-alpha bilden hier die Liganden. Die beiden Heterotrimere LT $\alpha_1\beta_2$ , als vorherrschende Variante, und LT $\alpha_2\beta_1$  findet man meist auf aktivierten lymphoiden Zellen in membrangebundener Form, wobei die LT $\beta$ -Komponente den transmembranen Anker bildet (9). Weiterhin wurde LIGHT (homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM on T cells) als Ligand identifiziert (65). LIGHT-Produktion wird durch Aktivierung von T-Zellen, Monozyten und natürlichen Killerzellen induziert (118).

Affinitätsuntersuchungen ergaben folgendes Liganden-Rezeptor-Bindungsschema (Abbildung 2):



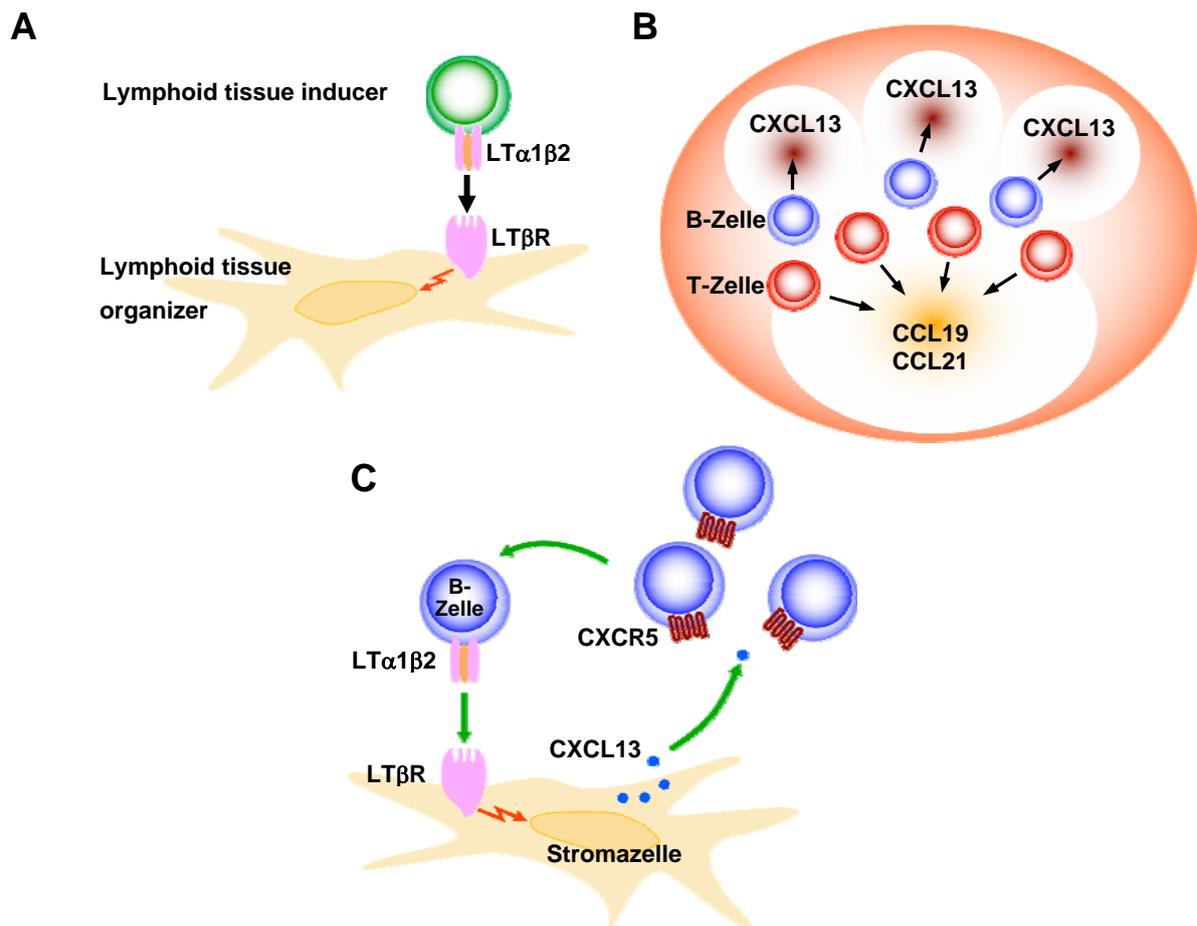
**Abbildung 2: Bindungsschema einiger Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie**

Die Liganden (*oben*) LT/TNF/LIGHT kommen als membrangebundene oder lösliche Form im Blut vor. Durchgehende Pfeillinien entsprechen einer hohen Affinität zu den Rezeptoren (*unten*). Gestrichelte Verbindungen weisen auf Bindungen mit geringerer Affinität hin. Unter „ANDERE“ werden weitere Rezeptoren der TNF-Superfamilie zusammengefasst, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

(Bild modifiziert aus 117)

Beide TNF-Rezeptoren binden mit hoher Affinität TNF und  $LT\alpha_3$ .  $LT\beta R$  bindet  $LT\alpha_1\beta_2$  und LIGHT. LIGHT und auch  $LT\alpha_3$  werden wiederum von weiteren Rezeptoren der gleichen Superfamilie gebunden. Der seltener von T-Zellen exprimierte Ligand  $LT\alpha_2\beta_1$  bindet an TNFR1 und  $LT\beta R$  (114, 117).

Ontogenese und weiterer Erhalt lymphatischer Strukturen werden nicht direkt über Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie reguliert, sondern durch die Chemokinexpression (73, 99). Chemokine bilden eine Gruppe kleiner Moleküle mit struktureller Ähnlichkeit, die durch Konzentrationsunterschiede im Gewebe das Wanderungsverhalten von Lymphozyten und dendritischen Zellen steuern (126) (Abbildung 3). Lymphoide Vorläuferzellen (sog. „lymphoid inducer cells“) induzieren über den  $LT\beta R$  die Sekretion von Chemokinen in Vorläuferstromazellen (sog. „lymphoid tissue organizer“) (22, 33), wodurch die initiale Migration lymphoider Zellen in Lymphknoten und Peyersche Platten stattfindet (67, 125). Es wird vermutet, dass dieselben lymphoiden Vorläuferzellen auch an der Entwicklung der Milz beteiligt sind (114). Während der Ontogenese, aber auch im adulten Organismus, werden T-Zellen von den Chemokinen CCL19 und CCL21 (früher SLC; secondary lymphoid tissue chemokine) in die PALS geleitet (126). B-Zellen, die den Rezeptor CXCR5 tragen, wandern durch den Einfluss des dort sezernierten CXCL13 (früher BLC; B lymphocyte chemoattractant) in die Follikel. Die Einwanderung der B-Zellen führt über einen positiven Rückkopplungsmechanismus durch  $LT\beta R$  zu einer Steigerung der CXCL13-Expression der Stromazellen (3). Zu Plasmablasten umgewandelte B-Zellen steigern ihre CXCR4 Expression, während sie CXCR5 reduzieren. Der Ligand CXCL12, vornehmlich in der roten Pulpa zu finden, bewirkt dann eine Umorientierung der B-Zellen in die rote Pulpa der Milz oder die Einwanderung in das Knochenmark (37).



**Abbildung 3: Bildung der Kompartimente in lymphatischen Geweben**

A) Initialisierung von lymphatischem Gewebe durch die Bindung von  $LT\beta$  auf „lymphoid tissue inducer cells“ an  $LT\beta R$  auf „lymphoid tissue organizer cells“, die daraufhin zur Chemokinproduktion angeregt werden. B) Nach Ligation des  $LT\beta R$  wandern T- und B-Zellen in die verschiedenen Kompartimente, da Chemokine von den jeweiligen Stromazellen produziert werden. C) Die durch das Chemokin CXCL13 angelockten B-Zellen bewirken über einen positiven Rückkopplungsmechanismus am  $LT\beta R$  die Steigerung der Chemokinproduktion. (Abbildung aus 76)

Die Applikation blockierender Antikörper oder genetische Deletion eines Rezeptors oder Liganden der TNF-Superfamilie führen zu Defekten innerhalb sekundär lymphatischer Organe und zur Einschränkung der Abwehrfunktion (50, 109). Dabei ergeben sich Unterschiede in der Schwere des Defekts innerhalb der sekundär lymphatischen Organe. Die Anlage der Lymphknoten und der Peyerschen Platten während der Ontogenese ist LT $\beta$ R- und TNFR-abhängig (47, 87, 75). In LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> Tieren sind weder Lymphknoten noch Peyersche Platten vorhanden (33). Im Falle des LT $\alpha$ <sup>-/-</sup>- oder LT $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieres sind LK nur rudimentär oder nicht in allen Körperregionen zu finden (1, 31). Ein vollständiges Fehlen aller Lymphknoten kann auch durch eine Kombination von Antikörpern gegen LT $\beta$  und anti-TNF oder anti-TNFR erreicht werden (84). Im Unterschied zu Lymphknoten ist die Anlage der Milz nicht LT $\beta$ R-abhängig, sondern im 'orphan homeobox11'-Gen (Hox11) verankert (88). Hox11<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen außer der fehlenden Milz keine weiteren Auffälligkeiten in sekundär lymphatischen Organen, Thymus und Knochenmark (88). In LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> ist die Milz vorhanden, zeigt aber eine veränderte Kompartimentstruktur (33, 109). Dokumentiert wurden Abweichungen im histologischen Bild beim TNFR<sup>-/-</sup> (31, 51), TNF<sup>-/-</sup> (15, 80), LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> (33), LT $\alpha$ <sup>-/-</sup> (31) und LT $\beta$ <sup>-/-</sup> (1, 46). Keine Veränderungen der Milz wurden bei TNFR2<sup>-/-</sup> und LIGHT<sup>-/-</sup> festgestellt (51, 92). Einschränkungen bei der Bekämpfung von Mikroorganismen kommen aber auch hier vor (45, 92). Während für den Wildtyp bereits quantitative Daten zur Kompartimentstruktur histologisch erhoben werden konnten, liegen zur Veränderung der genetisch modifizierten Tiere bisher nur qualitative Beschreibungen vor. In dieser Arbeit soll daher der quantitative Aspekt als neues Beurteilungskriterium eine besondere Bedeutung erhalten. Die Rolle regulatoriver Moleküle unterscheidet sich von der Ontogenese im Vergleich zum adulten Organismus: Für eine intakte Milzstruktur während der Ontogenese sind Signale über den TNFR und LT $\beta$ R notwendig. Im adulten Organismus wird zum Erhalt der Milzstruktur dagegen nur ein ständiges Signal über den LT $\beta$ R benötigt, während sich bei Blockade des TNFR nur minimale, reversible Veränderungen zeigen (57).

Die eindeutige Abhängigkeit sekundär lymphatischer Strukturen von Mitgliedern der TNF-Superfamilie während der Ontogenese und im adulten Organismus ergibt die Hypothese, dass auch die Entstehung ektopen lymphatischen Gewebes von diesen Regulationsmechanismen abhängt. Experimentell wurden diese Abhängigkeiten bisher nicht ausreichend für tertiär lymphatisches Gewebe überprüft. Die avaskuläre Milztransplantation soll in dieser Arbeit als neues Modell zur Entstehung ektopen

lymphatischen Gewebes etabliert werden und es sollen weitere Information über Regulationsfaktoren der tertiär lymphatischen Gewebe erlangt werden.

Folgende drei Fragestellungen sollen dazu in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Wie verhalten sich die bisher qualitativ beschriebenen Veränderungen der TNFR<sup>-/-</sup> und LTβR<sup>-/-</sup> in einer quantitativen Analyse?

Hierzu wurden die Kompartimente immunhistologisch gefärbter Milzschnitte der TNFR-Knockouts und LTβR-Knockouts quantitativ mit den Kompartimenten der Wildtyp-Maus (WT) verglichen.

2. Bietet die avaskuläre Milztransplantation eine Möglichkeit, die Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus zu untersuchen?

Zu dieser Frage wurden Milztransplantate mit Kontrollmilzen quantitativ histologisch und funktionell verglichen.

3. Welche Rollen spielen TNFR und LTβR bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus im Vergleich zu sekundär lymphatischen Organen?

Milzen von Knockout-Tieren wurden mit entsprechenden Autotransplantaten quantitativ histologisch verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Tiere und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden Mäuse der Stämme C57BL/6NCrIBR, C57BL/6Ly5.1, Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Knockout (TNFR<sup>-/-</sup>) (83) und Lymphotoxin-beta-Rezeptor-Knockout (LTβR<sup>-/-</sup>) (33) verwendet. Alle Versuchstiere entstammen je 5 Zuchtpaaren, die im Fall des Wildtyps und des LTβR<sup>-/-</sup> von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die TNFR<sup>-/-</sup>-Tiere wurden von Professor Klaus Pfeffer aus Düsseldorf zur Verfügung gestellt und in unserer Tierhaltung weiter gezüchtet. Die Haltung erfolgte nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von 6 Tieren pro Käfig unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den zentralen Tierställen der Universität zu Lübeck. Lochmarkierungen der Ohren garantierten die eindeutige Identifikation. Die Standardkäfige (42,5 x 26,6 x 15,5 cm) bestanden aus Polycarbonat mit einem Abdeckgitter aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Der Boden der Käfige war mit Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) ausgelegt, die wöchentlich gewechselt wurden. Wasser und Trockenfutter (altromin1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) standen den Tieren jederzeit zur Verfügung. Die voll klimatisierten Stallräume ermöglichten eine konstante Umgebungstemperatur von 23 ± 1°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 60 ± 5 %. Eine automatische Schaltung garantierte einen künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden, wobei die Hellphase (6 Uhr bis 18 Uhr) die reguläre Arbeitszeit einschloss. Eine Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche liegt vor (V252-72241.122-1 (24-3/02)).

### 2.2. Eingriffe

#### 2.2.1. Organtransplantation

Die Transplantationen und endgültigen Milzentnahmen erfolgten unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen in speziell für operative Eingriffe vorgesehenen Räumen der Tierhaltung. Folgten Eingriffe an verschiedenen Tieren aufeinander, wurde das OP-Besteck mit 70%igem Ethanol gereinigt. Zwischen verschiedenen Operationstagen erfolgte die Sterilisierung im Autoklaven. Für die Kurznarkose wurde eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (50mg/kg KG), Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg KG) und Atropinsulfat (25 µg/kg KG) in steriler Kochsalzlösung (0,9 %) intraperitoneal

injiziert. Innerhalb weniger Minuten waren die Versuchstiere vollständig narkotisiert. Nach Desinfektion der Bauchhaut mit 70%igem Ethanol erfolgte die Operation über einen Bauchschnitt. Haut, Muskulatur und Peritoneum wurden nacheinander unterhalb des Sternums in der Medianlinie eingeschnitten. Durch Zug am Magen wurde die Milz nach vorne verlagert. Unter Sicht konnten so das Ligamentum gastrosplenicum durchtrennt und zuführende Gefäße elektrisch koaguliert werden. Nach Möglichkeit diente das entnommene Organ auch als Transplantat. Andernfalls wurde die Milz eines anderen Tieres verwendet. Bevor die Milzimplantation erfolgte, wurde sie mehrfach geteilt und in einer Petrischale mit steriler Kochsalzlösung zwischengelagert. Zwei Viertel der Milz wurden mit einer Pinzette im Empfängertier zwischen Ligamentum gastrosplenicum und Magenwand platziert. Nach Lagekontrolle, Reposition aller Organe und Befeuchtung der Peritonealhöhle mit steriler Kochsalzlösung wurde die Bauchhöhle wieder verschlossen. Mit resorbierbaren Polyglykolsäurefäden wurden Bauchmuskulatur und Haut zweischichtig fortlaufend vernäht. Sprühpflaster wurde als Schutz auf die Wunde gegeben. Die Tiere konnten zurück in den Käfig gelegt und ihr Erwachen abgewartet werden.

### **2.2.2. Stimulationsversuch mit SRBC**

Die Immunkompetenz der transplantierten Milz wurde durch Injektion gereinigter Schaferythrozyten (SRBC) überprüft. Diese stellen große, partikuläre Antigene dar, die nach Injektion in die Milz gelangen. Eine T-Zell-abhängige Immunantwort, die nachfolgende Bildung von Keimzentren in den B-Arealen und Antikörperproduktion der B-Zellen kann bei funktionsfähiger Immunantwort beobachtet werden (110). Zur Vorbereitung der Lösung wurde 50%ige Hammel-Vollblut-Suspension (Hammelblut in Alsever-Puffer, 50 %, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) in steriler 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und die Zellzahl auf  $5 \times 10^9$  Zellen pro ml eingestellt. Zehn Tage vor endgültiger Entnahme der Milz wurden  $10^9$  Erythrozyten in 200  $\mu$ l Kochsalzlösung unter Immobilisation des Tieres in die Schwanzvene injiziert. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge reine Kochsalzlösung. Die Auswertung der Stimulierung wurde später am histologischen Präparat überprüft.

### **2.2.3. Entnahme der Milzen**

Zur endgültigen Organentnahme wurden die Kontroll- und Versuchstiere durch Genickbruch geopfert. Im weit eröffneten Bauchraum konnte man nun die Milz leicht

auffinden und vom umliegenden Gewebe lösen. Das Präparat wurde für die Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  schockgefroren.

### 2.3. Färbungen

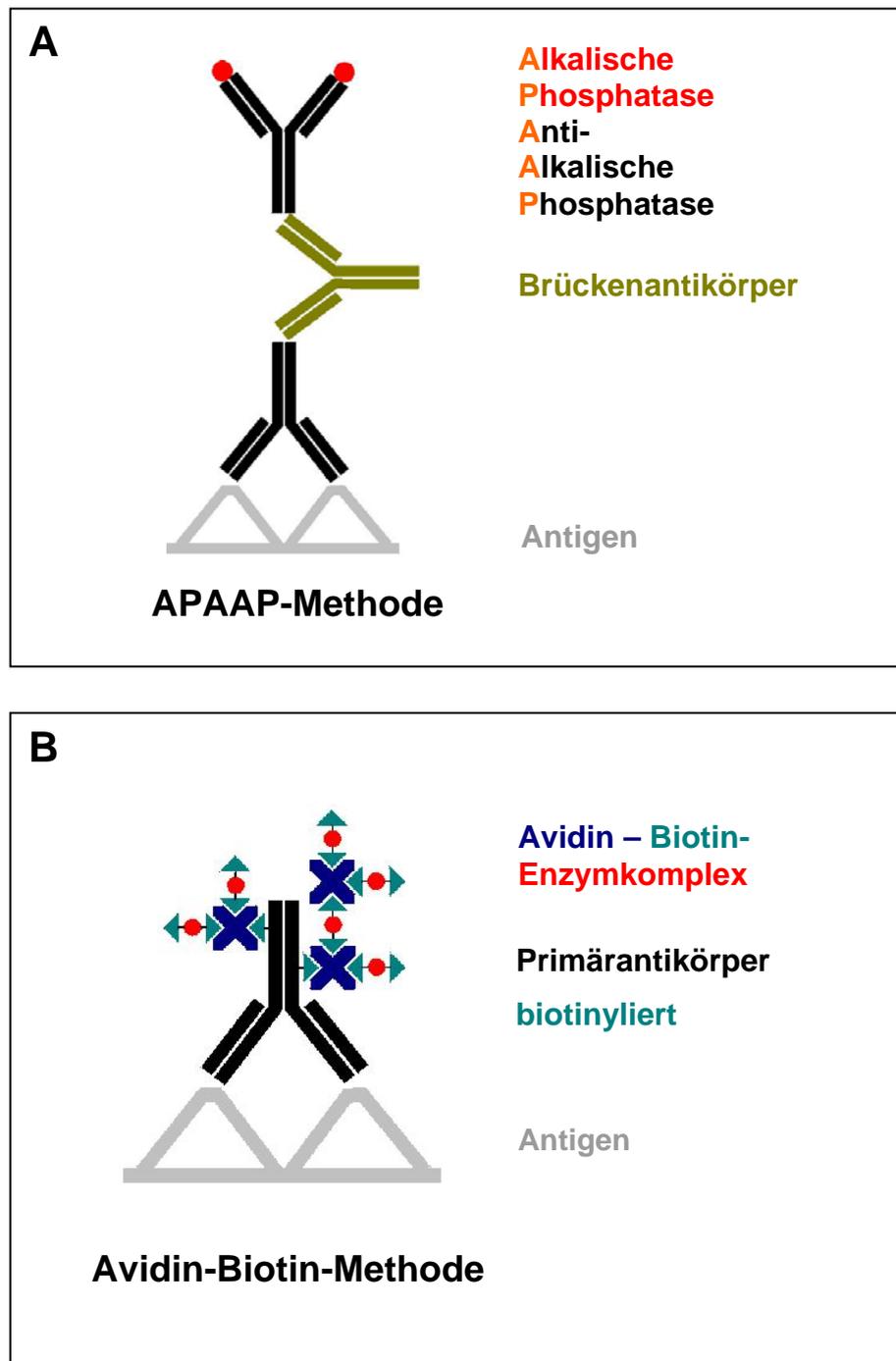
Die histologische Untersuchung der Milzpräparate bildet das zentrale Element dieser Arbeit. Aus diesem Grund sollen hier die Prinzipien der verwendeten Färbemethoden erläutert werden.

#### 2.3.1. APAAP-Methode

APAAP bildet die Abkürzung von **A**lkalische **P**hosphatase **A**nti-**A**lkalische **P**hosphatase und stellt eine Methode mit drei Antikörperlösungen dar (Abbildung 4 A). Der Primärantikörper ist gegen das gesuchte Antigen des Präparats gerichtet. Ein Brückenantigen oder Sekundärantigen ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet. Der zweite Antikörper liegt im Überschuss vor, damit genau eine Bindungsstelle mit einem Primärantikörper reagieren kann. Der Tertiärantikörper entspricht einem Enzym-Immunglobulinkomplex aus alkalischer Phosphatase und anti-alkalischer Phosphatase. Er entstammt der gleichen Spezies wie der Primärantikörper, wobei er sich nun an die zweite, noch freie Bindungsstelle des Brückenantikörpers lagern kann. Zwei Enzyme sind pro Immunglobulin vorhanden. Ein geeignetes Substrat, zum Beispiel Fast Red oder Fast Blue, führt über eine Enzym-Substrat-Reaktion mit der alkalischen Phosphatase zur farblichen Darstellung der gesuchten Struktur.

#### 2.3.2. Avidin-Biotin-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode beruht auf der Fähigkeit des Hühnereiweißbestandteils Avidin, vier starke Bindungen mit Biotin einzugehen (Abbildung 4 B). Ein Antikörper, der an der einen Seite mit einem Biotinmolekül verbunden ist, erkennt das gesuchte Antigen im Präparat. Als weitere Reagenz wird ein Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase eingesetzt, der an den biotinylierten Antikörper bindet. Die Reaktion der Peroxidase mit Diaminobenzidin führt durch oxidative Polymerisierung zum Niederschlag eines sichtbaren, bräunlichen Produkts.



**Abbildung 4: Prinzipien verwendeter Färbemethoden**

**A)** Darstellung der APAAP-Methode, bei der drei verschiedene Antikörper gebraucht werden. Ein Primärantikörper bindet die gesuchte Struktur auf dem Präparat. Ein Brückenantikörper wird benötigt, um den Primärantikörper mit einem weiteren Antikörper zu verbinden. Letzterer ist gegen die alkalische Phosphatase gerichtet, die durch eine Enzymreaktion zur Farbgebung führt.

**B)** Darstellung der Avidin-Biotin-Methode. Ein biotinylierter Antikörper erkennt das Antigen. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bindet das Biotin am Antikörper.

### 2.3.3. Ablauf des Färbevorgangs

#### Immunhistologie

Die Fixierung der entnommenen Milzstücke erfolgte im Einbettmedium bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Am Serienschnittmikrotom wurden  $12\text{ }\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte hergestellt und zwei Stunden luftgetrocknet. Danach konnten die Präparate direkt weiterverarbeitet oder in Alufolie gewickelt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden mehrere Lösungen angesetzt:

PBS-Stammlösung:	Phosphat <b>B</b> uffered <b>S</b> aline aus 90 g NaCl; 2,704 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 28,794 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in zwei Litern Aqua dest. gelöst; pH = 7,4
PBS-Gebrauchslösung	200 ml PBS-Stammlösung in 800 ml Aqua dest.
TBS-Stammlösung	242,28 g Trisaminomethan (Serva GmbH, Heidelberg) und 344,40 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt) in vier Litern Aqua dest. angesetzt, pH = 7,6
Tween-20-Stammlösung	5 % Tween®20 (Serva GmbH, Heidelberg) in Aqua dest. gelöst
TBS-Tween-Gebrauchslösung	900 ml Aqua dest., 100 ml TBS-Stammlösung und 10 ml 5 % Tween-20-Stammlösung
APAAP-Substrat	20 mg Naphtol-AS MX Phosphat (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim), 2 ml N,N-Dimethylformamide (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim), 98 ml 0,1m Tris-Puffer pH = 8,2 und 100 $\mu\text{l}$ 1M Levamisole (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim)

Vor Beginn des Färbevorgangs erfolgte die Fixierung der gefrorenen Schnitte für 10 Minuten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Methanol – Aceton 1:1 Gemisch (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Danach wurden die Schnitte zwei Mal für 5 Minuten in PBS-Gebrauchslösung gespült und es wurde eine erneute Fixierung in 4%igem PFA

(Paraformaldehyd, Merck KGaA, Darmstadt) bei  $-4^{\circ}\text{C}$  für 45 Minuten durchgeführt. Die darauf folgende Spülung und alle weiteren Spülvorgänge wurden mit TBS-Tween-Lösung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte jeweils in einer dunklen feuchten Kammer. Grundlage der Auswertung bildete die detaillierte Analyse der einzelnen Kompartimente. Es bestand daher die Notwendigkeit, sowohl Präparate anzufertigen, auf denen nur einzelne Zellarten gefärbt waren, als auch Färbungen zu kombinieren. Details zu den Primärantikörpern sind zur besseren Übersicht in Tabelle 1 aufgelistet. Folgende Präparate wurden erstellt:

- 1) Makrophagen wurden in einer Einzelfärbung mit dem biotinylierten Antikörper gegen F4/80 (1:500) markiert und nach der Avidin-Biotin-Methode gefärbt.
- 2) Auf einigen Schnitten wurde CD45R/B220 (1:100) als Marker der B-Zellen verwendet. Dazu wurde die APAAP-Methode verwendet.
- 3) Der Nachweis der T-Zellen erfolgte über den T-Zell-Rezeptor durch anti-TCR $\beta$  (1:100) nach der Avidin-Biotin-Methode. Kombiniert wurde dieses durch die Darstellung der follikulär dendritischen Zellen (FDC) mit anti-FDC-M1 (1:100) durch die APAAP-Methode.
- 4) Die Mehrfachfärbung erfolgte durch eine kombinierte Darstellung metallophiler Makrophagen der Marginalzone mit einem biotinylierten Antikörper gegen MOMA-1 (1:500) und den Keimzentren mit PNA (1:50) nach der Avidin-Biotin-Methode. Bei PNA handelt es sich um ein Lectin, Peanut agglutinin, das aus der Erdnuss gewonnen wird und selektiv B-Zellen im Zentrum des Sekundärfollikels markiert (89). Weiterhin wurden CD45R/B220-positive B-Zellen und TCR-tragende T-Zellen nach oben genannten Prinzipien dargestellt.
- 5) Die Präparate für die Negativkontrolle durchliefen jeweils dieselbe Behandlung, jedoch mit Verzicht auf die Beigabe sämtlicher Primärantikörper.

Soweit die APAAP-Methode verwendet wurde, begann der Färbevorgang mit der Inkubation des Primärantikörpers aus der Ratte (gegen B220 oder FDC) für 60 Minuten. Nach einem Spüldurchgang erfolgte eine 30minütige Inkubation mit dem Brückenantikörper (1:50, Ratte-Ig Fraktion aus Kaninchen, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) gegen den ersten Antikörper in 5%igem Mausserum (Caltag Laboratories,

Burlingame, USA). Anschließend wurde der Enzym-Immunkomplex Ratte-APAAP (1:50, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für weitere 30 Minuten auf das Präparat gegeben. Nach Wiederholung der letzten beiden Inkubationsschritte für jeweils 15 Minuten und zweimaligem Spülen konnte die Darstellung der Komplexe mit Fast Blue BB (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) beendet oder, falls in diesem Präparat erwünscht, die Avidin-Biotin-Methode eingeschoben werden.

Die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper (anti-TCR $\beta$ ) oder der Substratmischung (anti-TCR $\beta$ , MOMA-1, PNA) erfolgte für 1 Stunde in 20%igem normalen Rattenserum (Caltag Laboratories, Burlingame, USA). Nach einem weiteren Spülvorgang wurde der Extra-Avidin-Peroxidase-Komplex (1:100, EXTRAVIDIN®-Peroxidase, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) für 30 Minuten auf die Präparate gebracht. Als Nachweisreagenz diente Diaminobenzidin (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), welches 5 Minuten Einwirkzeit benötigte. Erst nach Abschluss der Avidin-Biotin-Methode erfolgte bei diesen Präparaten die Färbung des APAAP-Substrats mit Fast Blue. Bei der F4/80-Färbung erfolgte nur die Färbung mit einem biotinylierten Antikörper nach oben beschriebenem Schema. Nach Abschluss des Färbevorgangs wurden alle Präparate mit einem wässrigen Eindeckmittel (AQUATEX®, Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt.

**Tabelle 1:** Listung verwendeter Primär-Antikörper der Immunhistologie

Antigen	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
F4/80	Cl:A3-1	Ratte IgG2b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
CD45R/B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg
TCR- $\beta$	H57-597	Hamster IgG2	BD Biosciences, Heidelberg
FDC-M1	FDC-M1	Ratte IgG2c	BD Biosciences, Heidelberg
MOMA-1	MOMA-1	Ratte IgG2a	BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz

### Fluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzuntersuchung verlief die Vorbereitung mit Fixierung in Methanol und Aceton (1:1) und Überführung in PBS wie im Abschnitt der Immunhistologie beschrieben. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte jeweils 60 Minuten in einer feuchten Kammer. Dargestellt wurden T-Zellen mit einem IgG-Primärantikörper aus der Ratte gegen CD3 (1:50). Der gebundene Primärantikörper konnte mit anti-Ratte Immunglobulin aus der Ziege detektiert werden, der wiederum mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (1:100, Molecular Probes, Eugene, OR) konjugiert war. Die B-Zellen wurden mit TRITC-Antikörpern gegen IgM aus der Ziege (1:100, Southern Biotechnology, Birmingham, USA) markiert und zeigten somit eine kontrastreiche rote Fluoreszenz. Die Negativkontrolle erfolgte über die alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper.

### 2.4. Auswertung der Milzschnitte

Die Messung der Milzschnitte erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200 / HAL100 Mikroskop (Zeiss, Jena). Mit dem Programm Palm@Robo V2.2.2 (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried), das normalerweise der Mikrodissektion dient, konnten Areale am Monitor markiert werden, deren Flächen in  $\mu\text{m}$  durch das Programm ermittelt wurden. Die Färbung mit dem Antikörper gegen F4/80 diente dem Überblick darüber, ob eine Trennung in rote und weiße Pulpa überhaupt möglich ist. Die anderen Präparate wurden zur Berechnung der Kompartimente herangezogen. Es wurde stets die Fläche des ganzen Milzschnitts erfasst. Die Messung der Kompartimente (T-Areal, B-Areal, Marginalzone, Keimzentren) erfolgte dann ebenfalls am ganzen Schnitt unter stärkerer Vergrößerung. Die Fläche der Kompartimente wurde als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche der Milz bestimmt. Die Subtraktion der weißen Pulpa-Fläche vom ganzen Schnitt ergab den Wert der roten Pulpa. Abgezogen wurden einige Gebiete, die keinem der Kompartimente zugeordnet werden konnten, wobei es sich um unspezifisch angefärbte bindegewebige Strukturen, Gefäßanschnitte oder Kapselanteile handelte. Das Vorkommen von FDC wurde qualitativ erfasst und die Lokalisation notiert.

### 2.5. Darstellung

#### Fotos

Die Aufnahme der immunhistologischen Fotos erfolgte mit der Zeiss AxioCam HR am Zeiss Axiophot unter Benutzung des Programms AxioVision 3.1 (Zeiss, Jena). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen entstanden mit dem Zeiss LSM 510UV Meta konfokal Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Jena). Zur weiteren Verarbeitung der Bilder diente das Programm Adobe PhotoShop Version 8.0.1.

#### Grafiken und Statistik

Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Versuchsgruppen erfolgten unter Benutzung des Mann-Whitney U-Tests. Als statistisch signifikant galten Werte  $p < 0,05$  (\*).

Die Statistik erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS® 12.0G für Windows (Version 12.0.1, SPSS Inc.). Grafiken wurden mit SigmaPlot® 2001 für Windows (Version 7.0, SPSS Inc.) hergestellt.

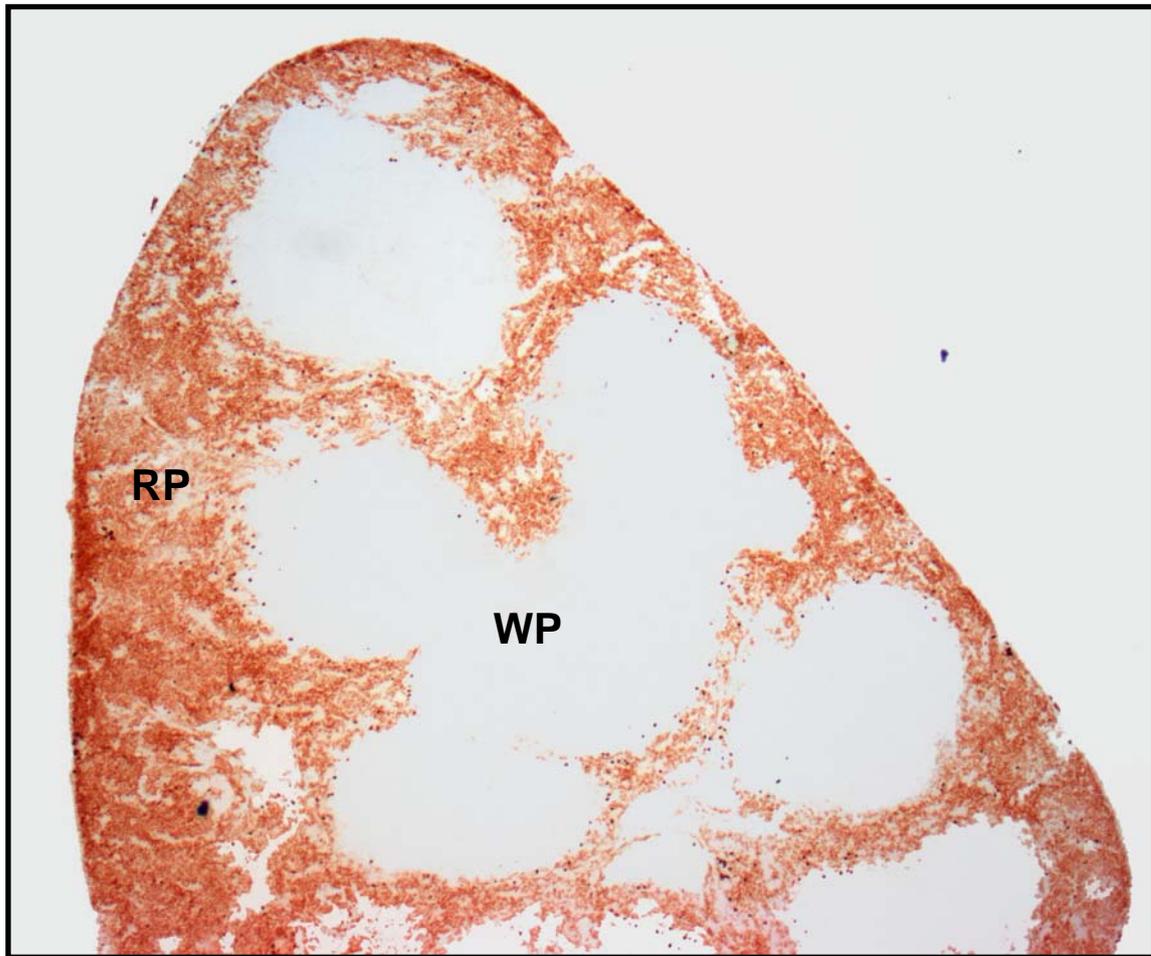
## 3 Ergebnisse

### 3.1. Quantitative Analyse der Milzkompartimente in der Wildtypmaus

Die Histologie der Milz sollte im Detail untersucht und quantitativ erfasst werden. Um festzustellen, ob die angewandten Färbemethoden zur ausreichenden Beurteilung aller Kompartimente genügen, wurde zunächst die Milz des Wildtyps in verschiedenen Färbungen betrachtet.

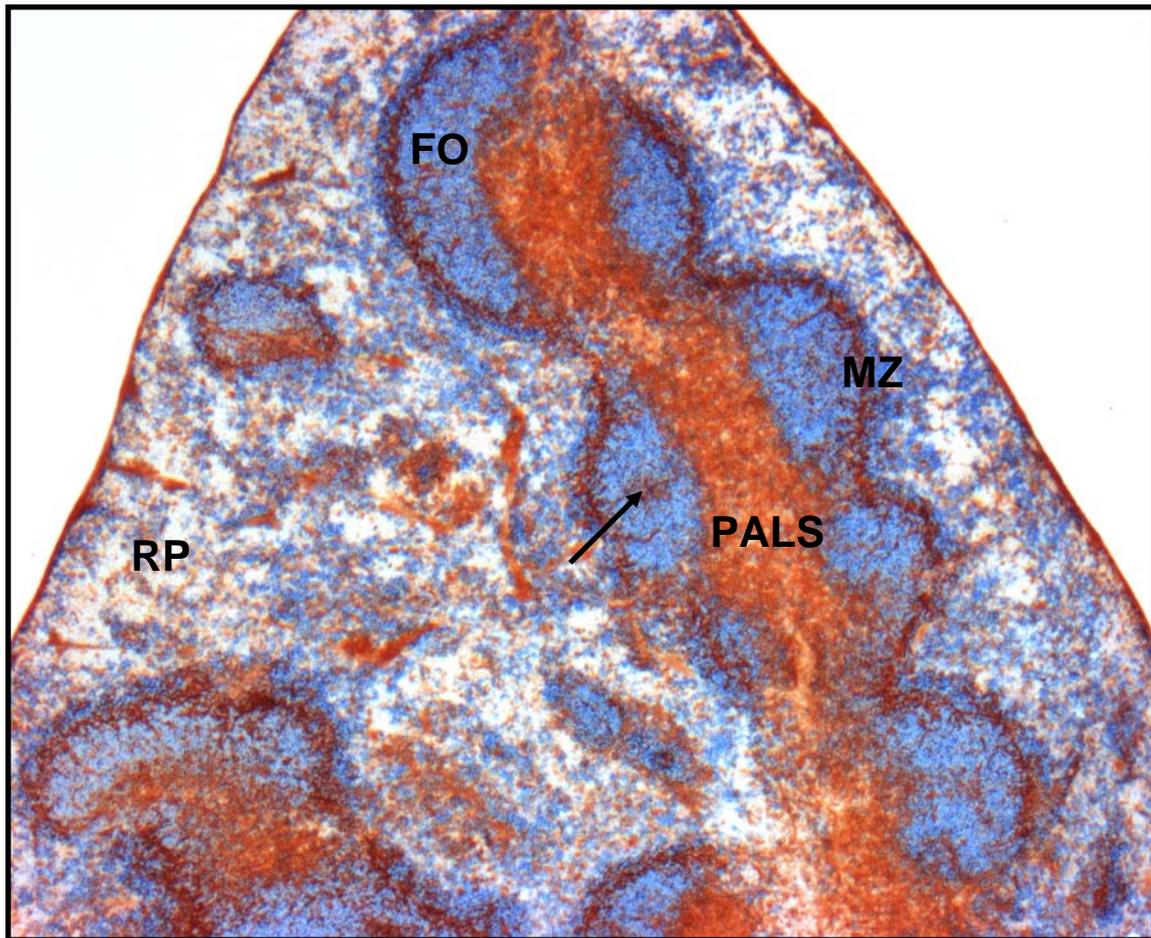
Es zeigte sich, dass alle erwarteten Strukturen gut erkennbar dargestellt werden konnten. Eine klare Trennung der roten und der weißen Pulpa wurde durch die Darstellung der Makrophagen innerhalb der roten Pulpa erreicht. Die Makrophagen bildeten durch ihre rotbraune Färbung eindeutig fassbare Areale, die sich von den nicht gefärbten Arealen der weißen Pulpa hervorhoben (Abbildung 5). Die weiße Pulpa befand sich gleichmäßig im gesamten Milzschnitt und reichte nicht direkt an die Milzkapsel heran. Auf weiteren Präparaten ließen sich T-Zellen, B-Zellen, Keimzentren und die Marginalzone mikroskopisch differenzieren (Abbildung 6). Die Ordnung untereinander entsprach dem erwarteten Bild. Die T-Zellen fanden sich, der periarteriolar lymphatischen Scheide entsprechend, im Zentrum der weißen Pulpa zusammen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ). An die PALS lagerten sich die aus B-Lymphozyten (dargestellt durch anti-B220) bestehenden Primär- und Sekundärfollikel. Letztere waren durch die Zusammenlagerung PNA-positiver Zellen als Keimzentren gut zu erkennen. Außen wurde die weiße Pulpa durch die Marginalzone (MZ) zur roten Pulpa abgegrenzt. Metallophile Makrophagen ergaben als Streifen die innere Begrenzung der Marginalzone (dargestellt durch anti-MOMA1). Das histologische Bild der Marginalzone zeichnete sich dazu durch stark gefärbte B-Zellen ab. Die Marginalzone reichte teilweise bis an die PALS heran und wurde ansonsten von einem dünnen Streifen B-Zellen oder Follikeln von dieser getrennt. Die rote Pulpa war gekennzeichnet durch eine Mischung einzeln und in kleinen Gruppen liegender T- und B-Zellen. Die Milzkapsel war unspezifisch braun gefärbt. Die gleiche Farbe trugen bindegewebige Stränge, die von der Milzkapsel in das Parenchym zogen, und Anschnitte kleiner und großer Blutgefäße. Bei der Analyse aufeinander folgender Schnitte, auf denen einzelne B-Zellen (dargestellt durch anti-B220) und folgend T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ) dargestellt wurden, erkannte man weitere Details. Die dunklere Färbung der B-Zellen im Bereich der Marginalzone wurde durch die Einzelfärbung stärker betont (Abbildung 7 A). In beiden Schnitten war das „Negativ“

der nicht gefärbten Zellen erkennbar. In der Mitte des B-Areals befanden sich „Lücken“, die dem Areal der PALS auf dem folgenden Schnitt entsprachen (Abbildung 7 B). Umgekehrt erkannte man „leere“ Strukturen zwischen der PALS und der vermuteten roten Pulpa, und zwar dort, wo sich auf dem vorangehenden Schnitt Follikel und Marginalzone darstellten. Einzeln liegende Zellen fanden sich auch in diesen Negativarealen. Follikulär dendritische Zellen zeigten eine netzförmige hellblaue Färbung. FDC sammelten sich im Bereich der B-Zellen.



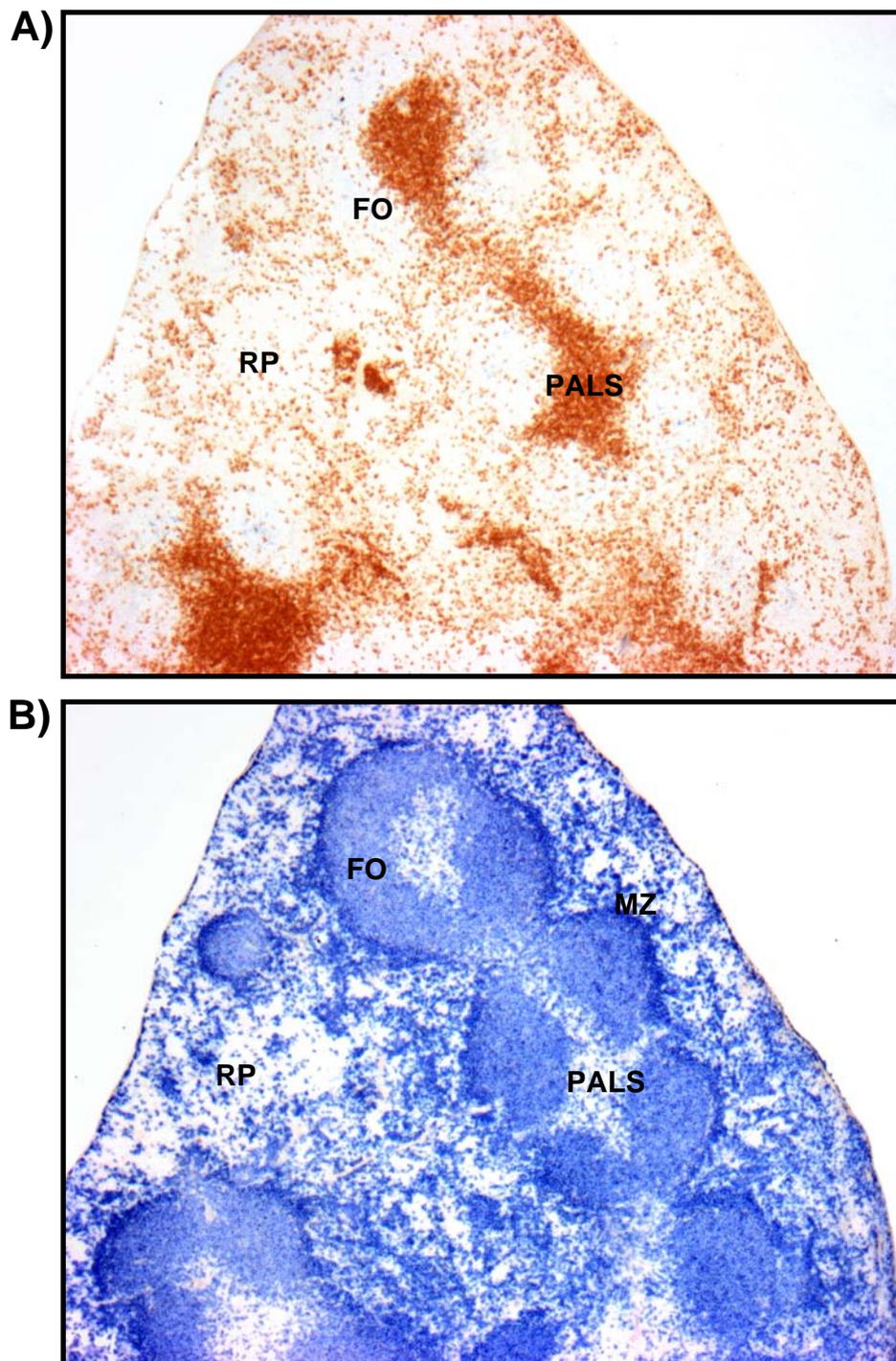
**Abbildung 5: Darstellung der Makrophagen in der roten Pulpa**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt einer Wildtypmilz; rotbraun: Makrophagen (dargestellt durch anti-F4/80); RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa; ursprünglich 25fache Vergrößerung.



**Abbildung 6: Darstellung der Kompartimente der Wildtypmilz**

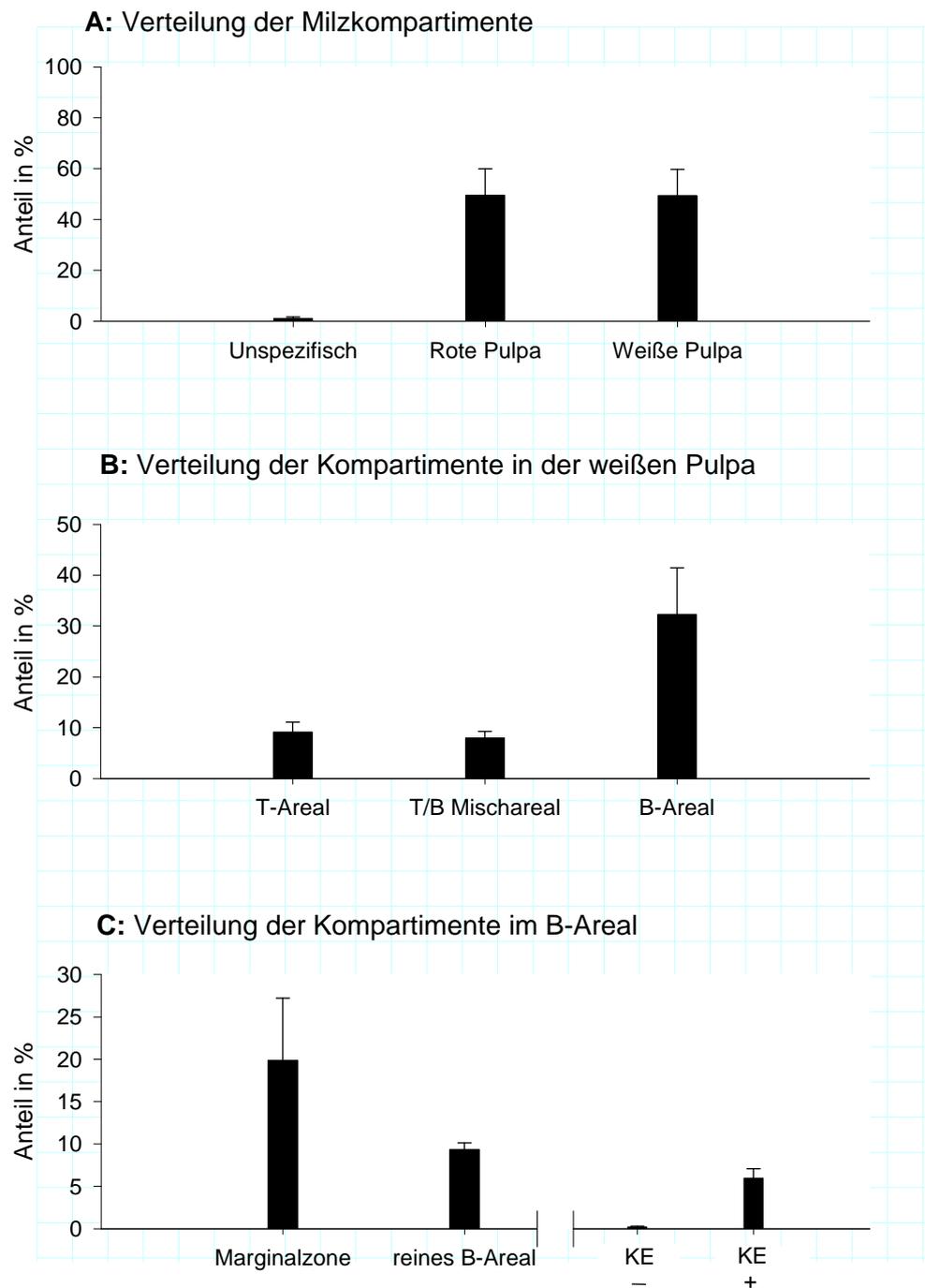
Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt einer Wildtypmilz; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220), dunkelbraun, unscharf begrenzt: Makrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1), dunkelbraun, scharf begrenzt: Keimzentrum (PNA-Anlagerung); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, FO = Follikel, MZ = Marginalzone, Pfeil = Keimzentrum; ursprünglich 40fache Vergrößerung.



**Abbildung 7: Darstellung der Kompartimente der Wildtypmilz in aufeinander folgenden Schnitten**

**A) und B)** Aufeinander folgende immunhistologisch gefärbte Kryostatschnitte einer Wildtypmilz; dunkelbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau = B-Zellen (dargestellt durch anti-B220); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, FO = Follikel, MZ = Marginalzone; ursprünglich 40fache Vergrößerung.

Die quantitative Auswertung der Milz erfolgte computerunterstützt an sechs Wildtypmäusen, wobei die Flächen der Kompartimente erfasst wurden. Die Ergebnisse sind in Diagrammform in Abbildung 8 illustriert. Rote und weiße Pulpa sind in einem 50 : 50 Verhältnis in der normalen Wildtypmilz zu finden (Abbildung 8 A). Ausgehend von 50% weißer Pulpa am gesamten Milzschnitt erfolgte die Trennung weiterhin in 30 % B-Areal, 10 % T-Areal und in ein Areal von 10 %, in dem sowohl B- als auch T-Lymphozyten vorkommen (Abbildung 8 B). Das B-Areal stellt folglich den größten Anteil der weißen Pulpa dar. Das T-Areal, der PALS entsprechend, nimmt im Vergleich nur ein Drittel der Fläche in Anspruch. Die Unterteilung des B-Areals erfolgte weiterhin in 20 % Marginalzone und 10 % reines B-Areal (Abbildung 8 C). Als innere Begrenzung der Marginalzone wurde der Streifen metallophiler Makrophagen definiert. Als äußere Grenze der Marginalzone wurde der deutlich blau gefärbte B-Zell-Saum eingefasst. Das reine B-Areal entspricht in dieser Arbeit allen Arealen, in denen keine T-Zell-Ansammlungen, keine metallophilen Makrophagen und keine Keimzentren angefärbt wurden. In der Wildtypmilz entspricht dies folglich den Primärfollikeln und der Corona der Sekundärfollikel. Vor Stimulation mit Schaferythrozyten finden sich fast keine Keimzentren (KE). 10 Tage nach SRBC-Injektion sind auch Sekundärfollikel histologisch erkennbar. Eine Immunantwort kann folglich ausgelöst werden und ist quantitativ erfassbar. Bindegewebige Strukturen wie Blutgefäße und Trabekel nahmen 1% der gesamten Milzfläche ein.



**Abbildung 8: Quantitative Darstellung der Kompartimente der Wildtypmilz**

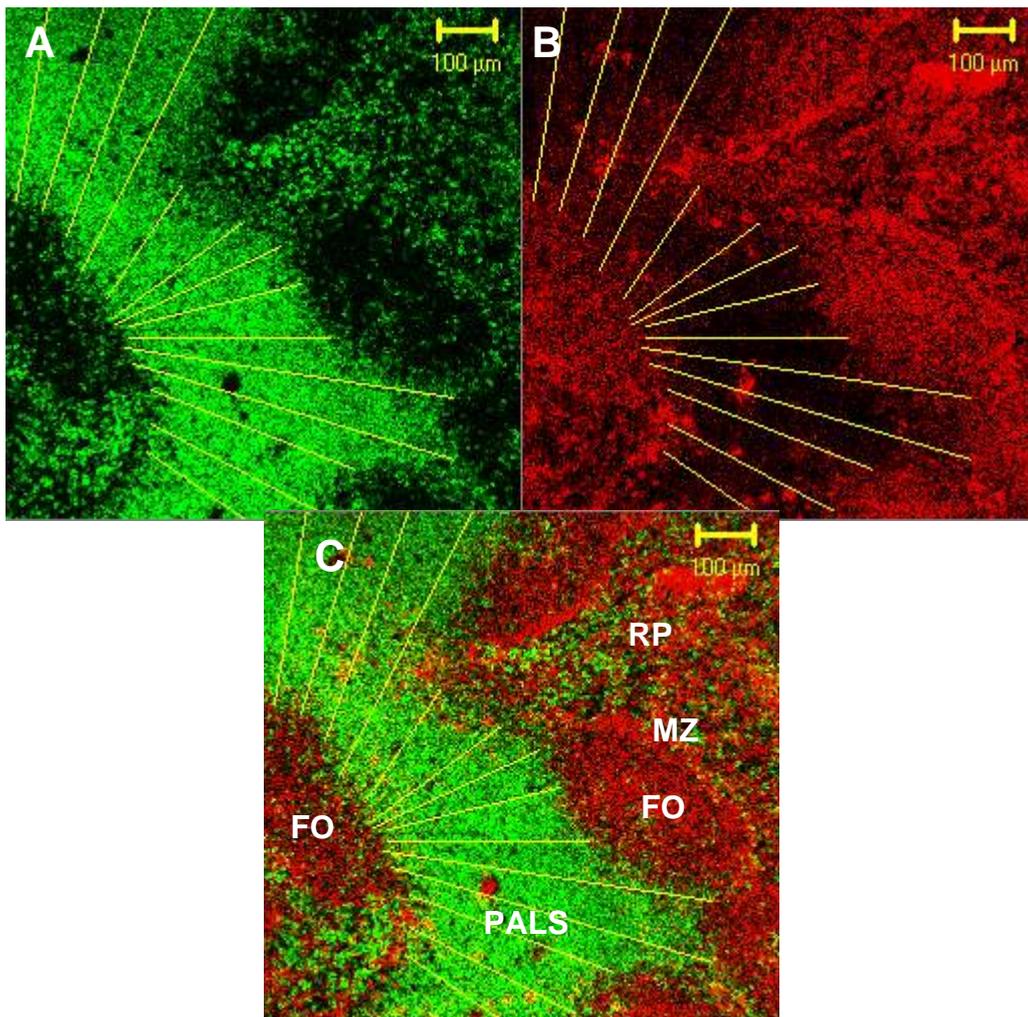
Dargestellt ist die Verteilung der Milzkompartimente beim Wildtyp. Die Flächenangaben wurden jeweils als Anteil des gesamten Milzschnitts angegeben; (A) Verteilung innerhalb der gesamten Milz; (B) Kompartimente innerhalb der weißen Pulpa; (C) Kompartimentanteile innerhalb des B-Areals; Fallzahl n=6 (mit Ausnahme der Keimzentren in C mit 3 stimulierten und 3 unstimulierten Tieren); KE = Keimzentrum; - = unstimuliert, + = 10 Tage vor Entnahme mit Schaferythrozyten stimuliert.

Durch Flächenbestimmungen in Präparaten, auf denen jeweils eine Zellart dargestellt war, ergab sich eine Mischzone, in der T- und B-Lymphozyten gleichzeitig vorkommen. Die Flächen des T-Areals waren stets größer als die freien Flächen innerhalb des B-Areals auf folgenden Milzschnitten, obwohl die T-Areale als PALS bei regelrechtem Aufbau dort ihren Platz finden. Die Differenz zwischen den freien Flächen innerhalb des B-Areals und den Flächen des gesamten T-Areals ergaben den Wert der Mischzone.

Die Anordnung der Kompartimente untereinander eröffnet zwei Möglichkeiten der genaueren Lokalisation einer Mischzone von T- und B-Zellen. Beide Zellarten treffen an der Schnittstelle PALS – Marginalzone und PALS – Follikel aufeinander. Eine genauere Beschreibung der Mischzone war mit der angewandten Methode nicht möglich, da sich bei gleichzeitiger Färbung beider Zellarten die Mischzone nicht deutlich vom T- oder B-Areal abhob. Um die Frage der genauen Lokalisation zu klären, erwies sich die Darstellung der T- und B-Lymphozyten mit fluoreszierenden Antikörpern als günstig. Mit dieser Methode waren sowohl grün fluoreszierende T-Zellen (Abbildung 9 A und 10 A) als auch rot fluoreszierende B-Zellen (Abbildung 9 B und 10 B) selektiv darstellbar. Weiterhin war die Überlagerung der beiden Fluoreszenzmuster mit dieser Methode möglich (Abbildung 9 C und 10 C). Auf dem Übersichtsbild mit geringer Vergrößerung erkannte man die PALS als dichte Zusammenlagerungen grün gefärbter T-Zellen. Follikel stellten sich im Anschluss an die PALS B-Zell-reich und T-Zell-arm dar. Die weiße Pulpa wurde durch die Marginalzone begrenzt, deren B-Zellen stärker rot fluoreszierten als die B-Zellen innerhalb der Follikel. Die rote Pulpa zeichnete sich durch verstreut liegende T- und B-Lymphozyten ab.

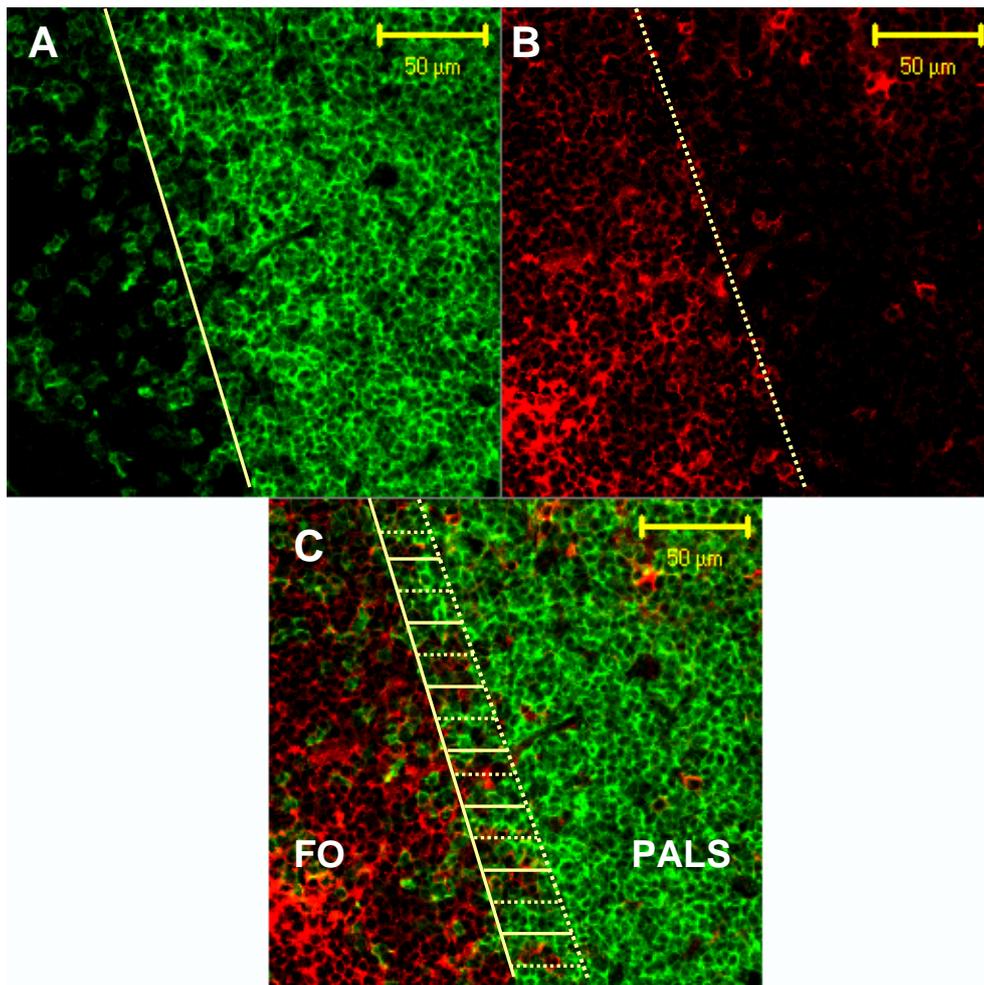
Die Betrachtung der Schnitte ergab in beiden Arealen, in denen T- und B-Zellen aufeinander treffen, eine Mischzone, in der beide Zellarten in vergleichbarer Anzahl vorkommen. Überlagerungen gab es demnach sowohl an der Schnittstelle der PALS zur Marginalzone als auch im Übergang der PALS zum Follikel.

Die Beobachtung zeigt weiterhin eine Prominenz der Mischzone im Bereich der PALS-Follikel-Schnittstelle, da dieser Bereich in der natürlichen Anordnung der Kompartimente ein größeres Areal einnimmt.



**Abbildung 9: Darstellung von T- und B-Lymphozyten bei der Wildtypmilz**

Dargestellt ist die Immunfluoreszenz von T- und B-Zellen bei der Wildtypmilz. Jedes der Bilder stellt exakt den gleichen Ausschnitt dar. Zur Verdeutlichung der Mischzone wurden gelbe Hilfslinien eingefügt, die in jedem Bild an der gleichen Stelle des Schnitts liegen. Die Hilfslinien wurden vollständig im Bereich des T-Areals platziert und auf die anderen Bilder übertragen. A) Dargestellt sind T-Zellen in der Immunfluoreszenz; B) Dargestellt sind B-Zellen in der Immunfluoreszenz; C) Überlagerung der Fluoreszenzmuster; grün: T-Zellen (dargestellt durch anti-CD3), rot: B-Zellen (dargestellt durch anti-IgM); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, FO = Follikel, MZ = Marginalzone; Größenverhältnisse oben rechts im Bild.



**Abbildung 10: Darstellung des Übergangs PALS zu Follikel**

Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt der Immunfluoreszenz von T- und B-Zellen bei der Wildtypmilz. Jedes der Bilder stellt exakt den gleichen Ausschnitt dar. Die Hilfslinien 1 und 2 liegen an den Stellen, an denen die angezeigte Zellart von der dichten Anordnung in eine weniger dichte Verteilung wechselt. Diese Grenzen aus A und B wurden in C übertragen. Die Mischzone liegt in dem schraffierten Bereich zwischen den Grenzen. A) Dargestellt sind T-Zellen in der Immunfluoreszenz; B) Dargestellt sind B-Zellen in der Immunfluoreszenz; C) Überlagerung der Fluoreszenzmuster; grün: T-Zellen (dargestellt durch anti-CD3), rot: B-Zellen (dargestellt durch anti-IgM); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, FO = Follikel; Größenverhältnisse oben rechts im Bild.

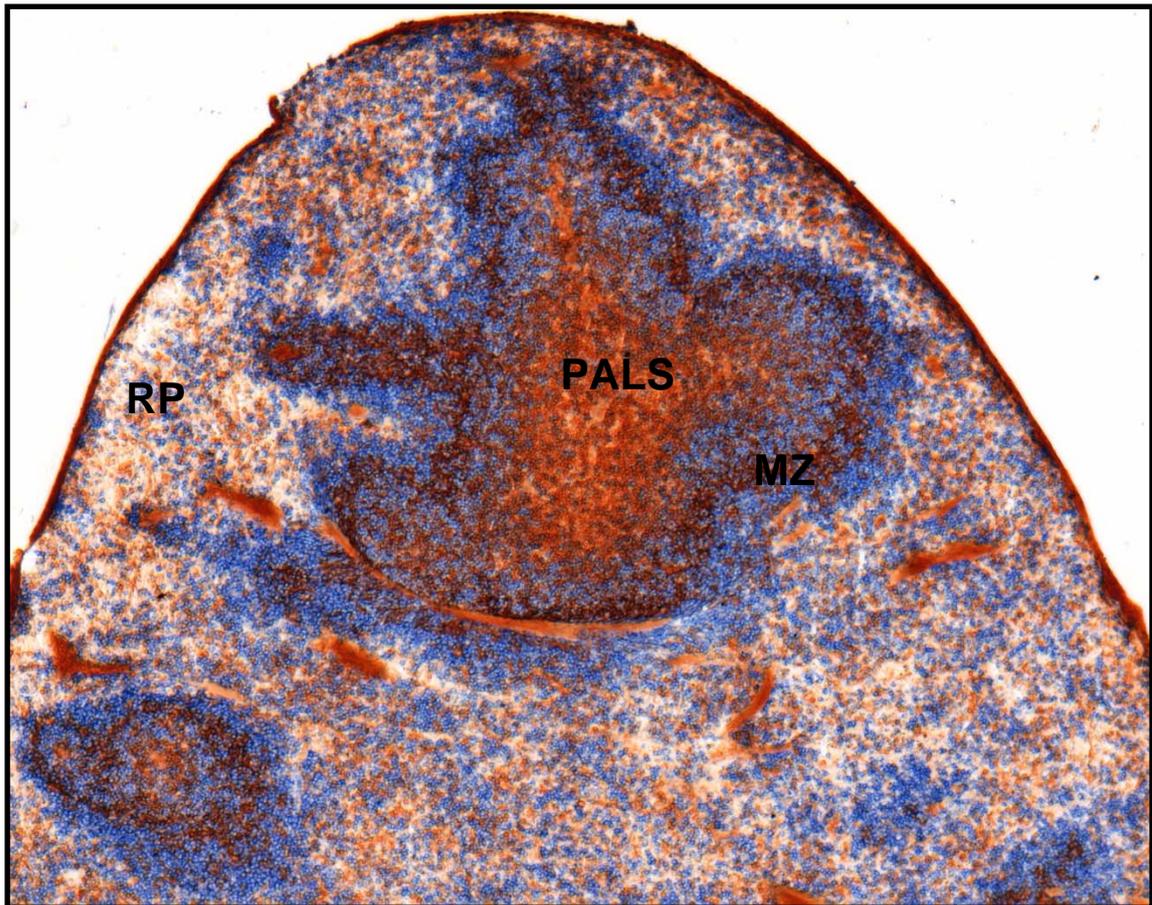
### 3.2. Quantitative Analyse der Kompartimente der TNFR- und LT $\beta$ R-Knockout-Maus

Bevor die Funktionen des TNFR und LT $\beta$ R bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus untersucht werden konnten, wurden als Vergleichsgrundlage die histologischen Bilder der ontogenetisch entstandenen Knockout-Milzen betrachtet. Der Vergleich der Milzen von TNFR- und LT $\beta$ R-Knockouts mit der Wildtypmilz mit einer quantitativen Analyse sollte Aufschluss über das Ausmaß der Defekte bei Rezeptorverlust während der Ontogenese geben.

Das Bild einer TNFR<sup>-/-</sup>-Milz ähnelte dem normalen Aufbau der Wildtypmilz (Abbildung 11). Rote und weiße Pulpa waren eindeutig differenzierbar. Die T-Zellen waren als PALS zusammengelagert und lagen im Zentrum der weißen Pulpa. Die PALS wurde von B-Zellen umgeben. Diese lagen nicht, wie im Wildtyp, in rundlichen Strukturen, sondern als schmaler oder breiter Gürtel um die normal konfigurierte PALS. Sie bildeten damit ein B-Areal, welches unabhängig von der Mischzone und Marginalzone in der TNFR<sup>-/-</sup>-Milz zu finden ist. Die Marginalzone, bestehend aus metallophilen Makrophagen und intensiver markierten B-Zellen, schloss die weiße Pulpa nach außen ab. Auffällig war die Dominanz der Marginalzone, die sich vor allem durch die B-Zellen im Vergleich zum Wildtyp verbreitert darstellte. Nach Injektion von Schaferythrozyten waren keine Sekundärfollikel sichtbar. Eine Immunantwort war in der TNFR<sup>-/-</sup>-Milz histologisch nicht darstellbar. Weiterhin waren keine FDC vorhanden. Auch in der quantitativen Analyse des Gewebes zeigten sich nur geringe Abweichungen der ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz im Vergleich zum Wildtyporganismus (Abbildung 13). Die weiße Pulpa zeigte mit einem Anteil von über 40 % keinen signifikanten Unterschied zur Wildtypmilz. Die rote Pulpa war spiegelbildlich im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant erhöht (Abbildung 13 A). Die weitere Unterteilung der weißen Pulpa verlief, mit dem Wildtyp vergleichbar, in ein T-Areal mit 5 %, eine Mischzone mit 10 % und ein dominantes B-Areal mit 30 % (Abbildung 13 B). Die leichte Verminderung an weißer Pulpa entsteht durch eine signifikante Abnahme des T-Areals und eine leichte Reduzierung des B-Areals, während sich die Mischzone sehr konstant zeigt. Ein reines B-Areal von 5 % konnte trotz Aufhebung der rundlichen, follikulären Strukturen gemessen werden. Das auch im Wildtyp größte Areal der Marginalzone nahm in der Flächenbestimmung beim TNFR-Knockout zu (Abbildung 13 C). Eine Keimzentrenbildung fand nicht statt.

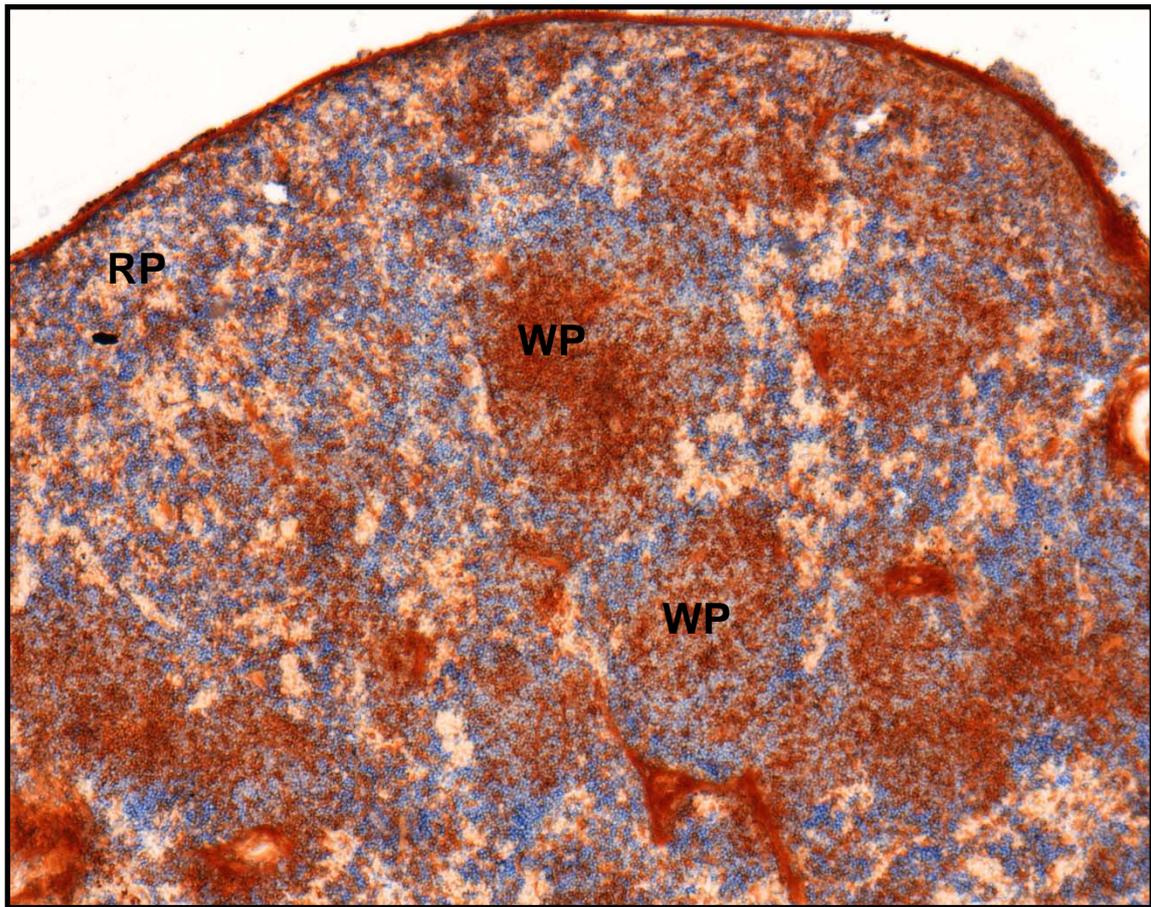
In der TNFR<sup>-/-</sup>-Maus entstand in der Ontogenese eine Milz, die einen ähnlichen Aufbau wie die Wildtypmilz aufweist. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und metallophile Marginalzonenmakrophagen bildeten eine weiße Pulpa mit differenzierbaren Kompartimenten.

Der Aufbau der ontogenetisch entstandenen Milz aus einem LTβR-defizienten Organismus war auf den ersten Blick deutlich gestört (Abbildung 12). Es ließen sich zwar noch Areale differenzieren, die als rote und weiße Pulpa bezeichnet werden konnten, Kompartimente der weißen Pulpa war dagegen nicht zu erkennen. Die fleckförmig vorhandene weiße Pulpa bestand aus einer Mischung von T-Zellen und B-Zellen. Obwohl sich die T-Zellen eher zum Zentrum dieser Areale wandten, konnte nicht von einer klar differenzierbaren PALS gesprochen werden, da im gesamten Gebiet auch B-Zellen zu finden waren. B-Zellen füllten dementsprechend das ganze Areal der weißen Pulpa aus. Eine folliculäre Anordnung war nicht vorhanden. Ebenso fielen keine Ansammlungen dunkler gefärbter B-Zellen auf, die beim Wildtyp in der Marginalzone zu finden waren. Es kamen keine metallophilen Marginalzonenmakrophagen in der LTβR-Knockout-Milz vor. Auch nach dem Stimulationsversuch mit Schaferythrozyten konnten keine Sekundärfollikel gefunden werden. Es zeigten sich keine FDC in den Schnitten. Die rote Pulpa stellte sich normal dar. Es fanden sich hier sowohl T- als auch B-Zellen in locker verstreuter Anordnung. Die quantitative Untersuchung der LTβR<sup>-/-</sup>-Milz bestätigte die Ergebnisse der histologischen Betrachtung (Abbildung 13). Die rezeptordefiziente Milz wich in allen Kompartimenten signifikant von den Befunden der Wildtypmilz ab. Die Milzen zeigten einen signifikanten Verlust der weißen Pulpa auf nur 30 % am gesamten Milzschnitt (Abbildung 13 A). Bei der weiteren Unterteilung der weißen Pulpa zeigte sich, dass die weiße Pulpa nicht nur vermindert, sondern auch in ihrem Aufbau verändert war. Ein T-Areal war nicht mehr zu erkennen. Das Mischareal stellte mit 20 % das dominante Areal dar. Das B-Areal, das in der Wildtypmilz mit 30 % dominierte, war in der LTβR<sup>-/-</sup>-Milz auf 10 % gefallen (Abbildung 13 B). Eine Marginalzone und Keimzentren waren in der LTβR<sup>-/-</sup>-Milz nicht vorhanden (Abbildung 13 C). Es zeigt sich, dass zwar bei Verlust des LTβR ontogenetisch eine Milz entstand, deren Aufbau aber im Vergleich zur Wildtypmilz massiv verändert war. Kompartimente waren innerhalb der weißen Pulpa nicht differenzierbar.



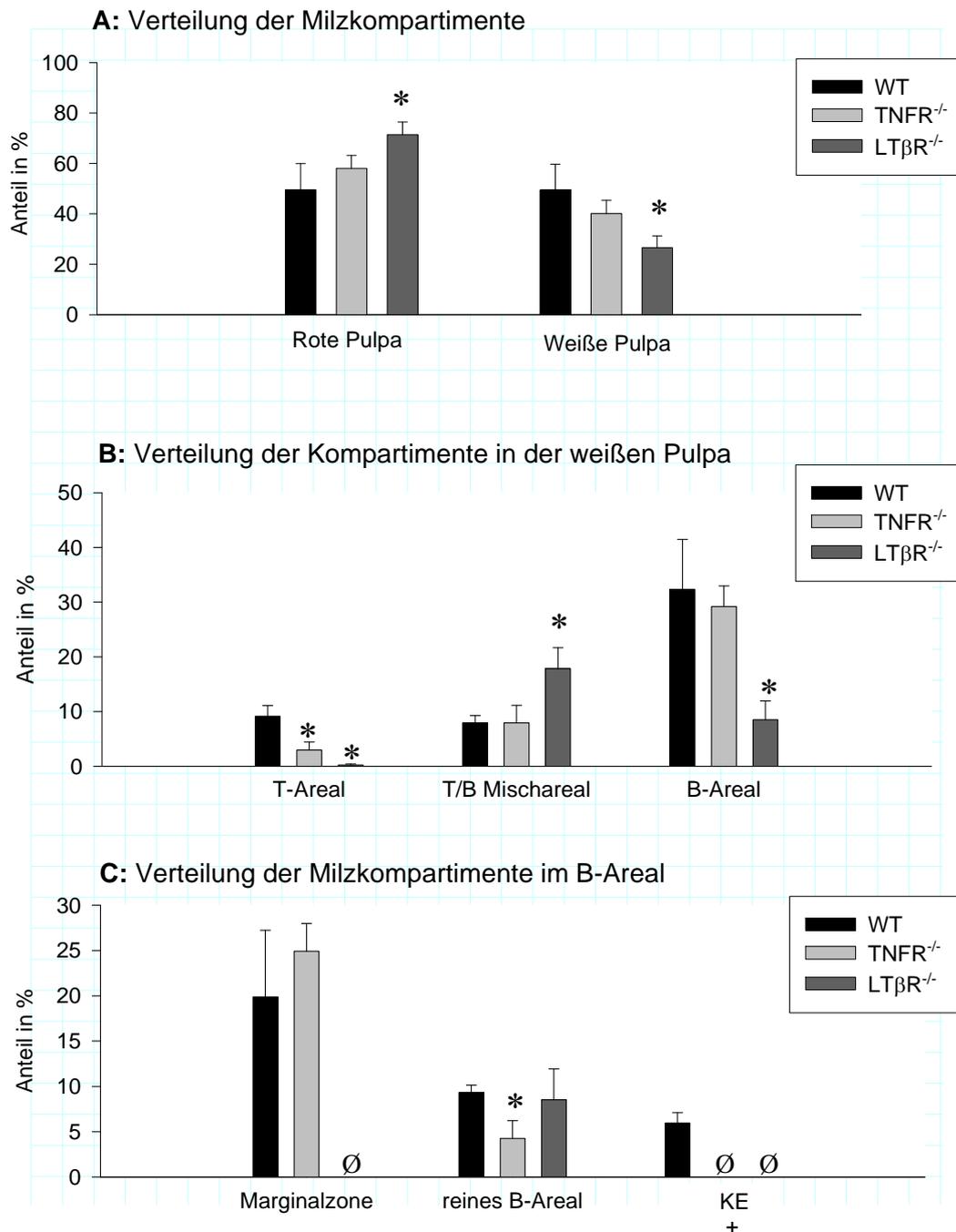
**Abbildung 11: Darstellung der Kompartimente der TNFR-Knockout-Milz**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt einer TNFR-Knockout-Milz; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220), dunkelbraun, unscharf begrenzt: Makrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, MZ = Marginalzone; ursprünglich 50fache Vergrößerung.



**Abbildung 12: Darstellung der Kompartimente der LT $\beta$ R-Knockout-Milz**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt einer LT $\beta$ R-Knockout-Milz; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220); RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa; ursprünglich 50fache Vergrößerung



**Abbildung 13: Quantitative Darstellung der TNFR- und LTβR-Knockout-Milz mit der Wildtypmilz**

Dargestellt ist die Verteilung der Milzkompartimente beim Wildtyp im Vergleich zu TNFR- und LTβR-Knockout-Mäusen. Die Flächenangaben wurden jeweils als Anteil des gesamten Milzschnitts angegeben. (A) Verteilung innerhalb der gesamten Milz; (B) Kompartimente innerhalb der weißen Pulpa; (C) Verteilung der Kompartimentanteile innerhalb des B-Areals; Fallzahl n=6 für jede Gruppe (mit Ausnahme der Keimzentren in C: Fallzahl n=3); WT = Wildtyp, KE = Keimzentrum; + = 10 Tage vor Entnahme mit SRBC stimuliert; \* = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test); signifikante Abweichungen beziehen sich auf den Vergleich mit dem Wildtyp; ∅ = nicht detektierbar

### 3.3. Die avaskuläre Milztransplantation

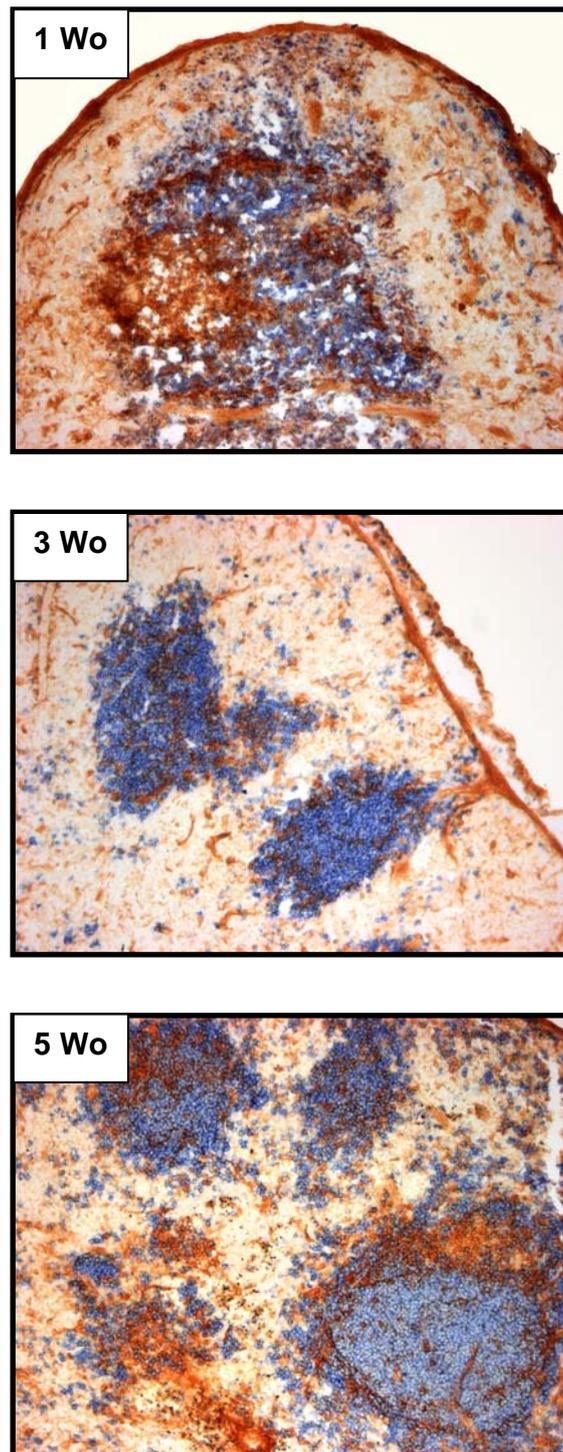
#### 3.3.1 Kinetik

Die avaskuläre Milztransplantation sollte als Modell zur Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus überprüft werden. Daher wurden Milzautotransplantationen des Wildtyps durchgeführt und die Struktur der Regenerate wurde mit der von unbehandelten Kontrollmilzen verglichen.

Die Untersuchung der Kinetik galt der Bestimmung des Zeitpunkts, an dem sich das Regenerat vollständig entwickelt hatte. Zur Analyse der Kinetik wurden die Regenerate 1, 3, 5 und 8 Wochen im Empfänger belassen und nach Entnahme quantitativ histologisch untersucht (Abbildungen 14 und 15). Nach einer Woche zeigte sich in der Mitte ein großes nekrotisches Areal, erkennbar an aufgehobenen Zellstrukturen, welches ungefähr die Hälfte des Milzschnitts ausmachte. Lebendiges, stromales Gewebe bildete den Rand der Milz, dessen Fläche nur zu einem Prozent aus Lymphozytenansammlungen bestand (Abbildung 16 A). In organisierten Arealen fanden sich zu diesem frühen Zeitpunkt nur B-Zellen (Abbildung 16 B). Nach drei Wochen war kein Nekroseareal mehr erkennbar. Erste metallophile Marginalzonenmakrophagen waren bereits sichtbar. Trotzdem war die Struktur in Follikel und Marginalzone noch nicht ausgereift. Die Lymphozytenansammlungen nahmen bereits ein Areal von 30 Prozent des Milzschnitts ein. Das Verhältnis der Areale, die von T-Zellen und B-Zellen eingenommen wurden, lag bei 15 zu 85. Nach 5 Wochen war die Kompartimentbildung weiter fortgeschritten, ohne dass sich der Anteil der WP am ganzen Milzschnitt veränderte. Das Verhältnis der Areale verschob sich leicht in Richtung T-Areal. Nach 8 Wochen hatte sich die Milz im Vergleich zum 5-Wochen-Zeitpunkt nur gering verändert. Die Kompartimente waren stärker ausgebildet. Der Anteil der weißen Pulpa und das Verhältnis der T- und B-Zell-Areale im Vergleich blieben konstant.

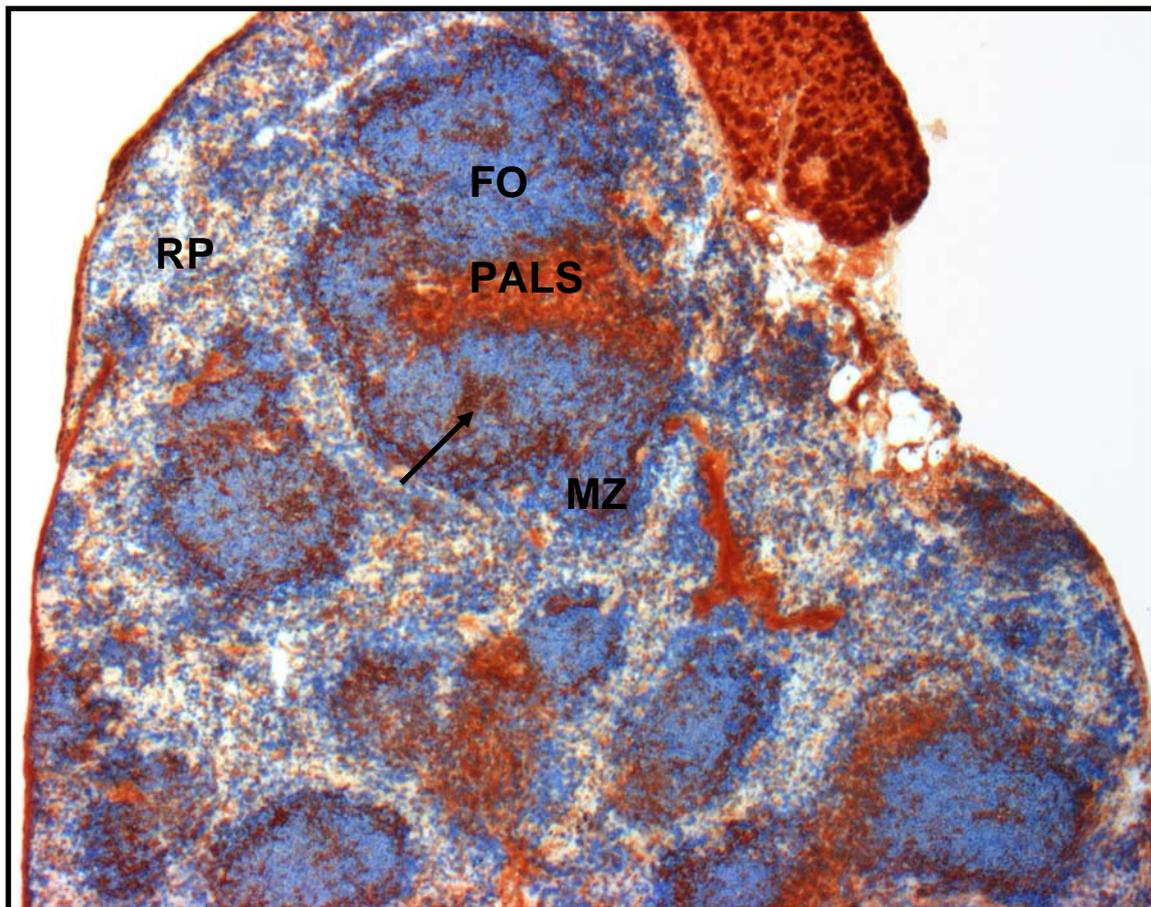
Zusammenfassend zeigte die Kinetik folgenden Verlauf:

- 1) Bereits nach 3 Wochen war der endgültige Anteil weißer Pulpa am gesamten Milzschnitt erreicht.
- 2) Nach 5 Wochen blieb das Verhältnis von T- und B-Arealen konstant.
- 3) Der Aufbau der Kompartimente war nach 8 Wochen abgeschlossen.



**Abbildung 14: Entwicklung der Milz im Verlauf der Regeneration**

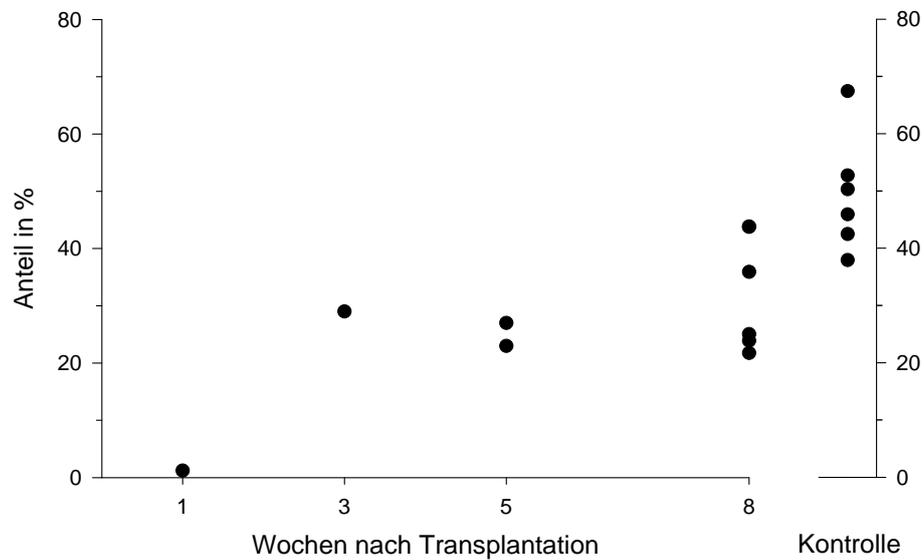
Immunhistologisch gefärbte Kryostatschnitte von Milztransplantaten 1, 3 und 5 Wochen nach Transplantation in splenektomierten WT-Tieren; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220), dunkelbraun: metallophile Makrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1); 1 Wo = 1 Woche, 3 Wo = 3 Wochen, 5 Wo = 5 Wochen; ursprünglich 100fache Vergrößerung



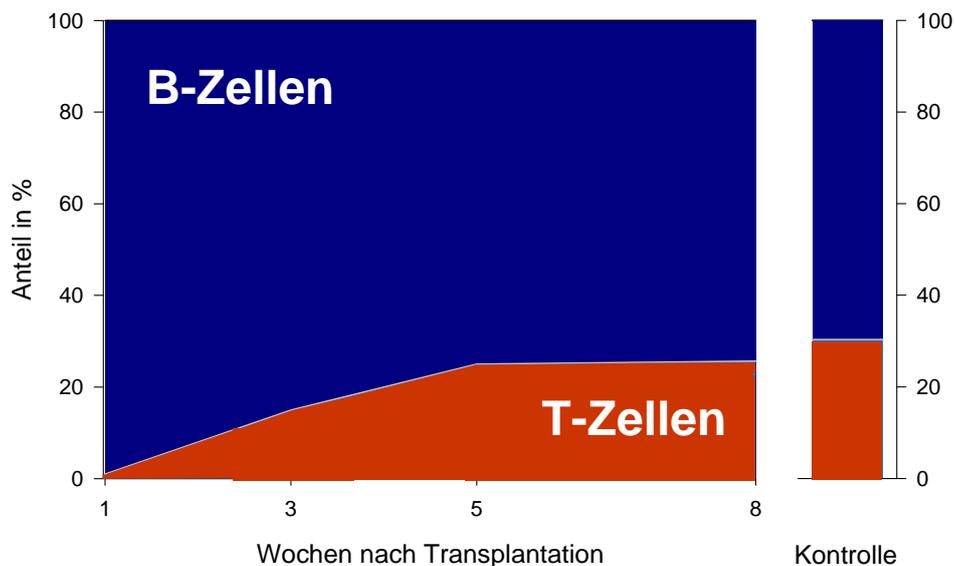
**Abbildung 15: Im Wildtyp-Regenerat sind alle Kompartimente vorhanden**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt eines Wildtyptransplantats 8 Wochen nach Transplantation in ein splenektomiertes WT-Tier; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220), dunkelbraun, unscharf begrenzt: Makrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1), dunkelbraun, scharf begrenzt: Keimzentrum (PNA-Anlagerung); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, FO = Follikel, MZ = Marginalzone; ursprünglich 40fache Vergrößerung.

**A: Anteil der weißen Pulpa am Milzschnitt**



**B: Anteil der Zellareale von der weißer Pulpa**



**Abbildung 16: Kinetik der Milztransplantation im Wildtyp**

**A)** Dargestellt ist der Anteil der weißen Pulpa am gesamten Milzschnitt nach 1, 3, 5 und 8 Wochen. Die Kontrolle bilden ontogenetisch entstandene Milzen des Wildtyps. Die jeweilige Fallzahl ( $n = 1$  bis 6) wird durch die Punktedarstellung deutlich; **B)** Dargestellt ist der Verlauf der Anteile von T- und B-Zell-Arealen. Die Daten wurden nach 1, 3, 5 und 8 Wochen erhoben. Fallzahlen und Kontrolle entsprechen den Angaben aus A).

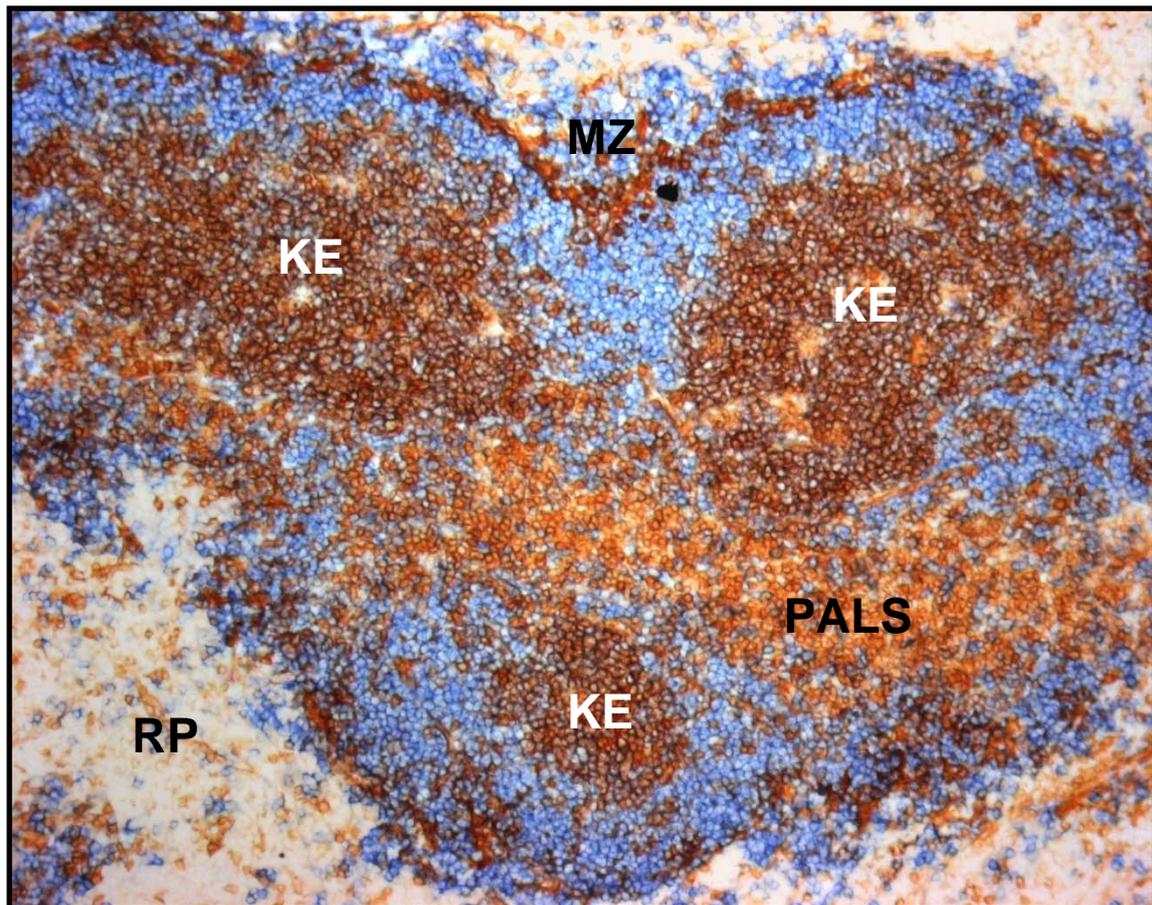
### 3.3.2 Quantitative Analyse der Regenerate

Nach acht Wochen wurden die Regenerate ebenso analysiert wie zuvor die ontogenetisch entstandenen Milzen der Wildtypmaus. Die immunhistologische Färbung zeigte, dass in jedem Regenerat rote und weiße Pulpa klar differenziert werden konnten. Alle Kompartimente waren in korrekter anatomischer Position im Regenerat vorhanden (Abbildung 15). T-Zellen bildeten als PALS das Zentrum der weißen Pulpa. B-Zellen lagerten sich in rundlichen Strukturen der PALS von außen an. Daneben bildeten B-Zellen und metallophile Marginalzonenmakrophagen die Grenze zur roten Pulpa. Nach Stimulation mit SRBC konnten Keimzentren nachgewiesen werden (Abbildung 17). Follikulär dendritische Zellen fanden sich im B-Areal. Geringe histologische Unterschiede zur Kontrollmilz waren die Tendenz, kleinere Areale der weißen Pulpa auszubilden, sowie einzelne Ansammlungen von Lymphozyten auf beiden Seiten der Kapsel. Diese Abweichungen störten in keinem Fall den Gesamteindruck eines gut regenerierten lymphatischen Gewebes. Es handelte sich bei den Regeneraten um Milzgewebe mit intakter Kompartimentstruktur und Funktion.

Auch die quantitative Analyse zeigte, dass sich die ontogenetisch entstandene Milz und das Regenerat des Wildtyps gleichen. Alle Kompartimente waren enthalten und zeigten keine größere Verschiebung zugunsten eines Kompartiments. Ein Unterschied, der sich in der Analyse der Kompartimente gleichmäßig durchzog, war eine Abnahme der weißen Pulpa (Abbildung 18 A). Sie erreichte beim Regenerat im Vergleich zur ontogenetischen Wildtypmilz einen signifikant kleineren Wert. Das Verhältnis roter zu weißer Pulpa war auf 65 zu 35 zugunsten der roten Pulpa angestiegen. Ging man weiter ins Detail, so war zu erkennen, dass sich der Verlust an weißer Pulpa gleichmäßig auf alle Komponenten auswirkte. T-Areal (6% Verlust), Mischzone (3% Verlust) und B-Areal (10% Verlust) nahmen bezogen auf den gesamten Milzschnitt ab, blieben aber bezogen auf den insgesamt geringeren Wert der weißen Pulpa untereinander fast konstant (Abbildung 18 B). Eine signifikante Abnahme fand sich beim T-Areal. Auch innerhalb des B-Areals setzte sich die gleichmäßige Abnahme fort. Sowohl Marginalzone als auch reines B-Areal zeigten einen Verlust, wobei allein der Verlust an reinem B-Areal signifikant war. Die Stimulation mit Schaferythrozyten ergab einen Anstieg der PNA-positiven

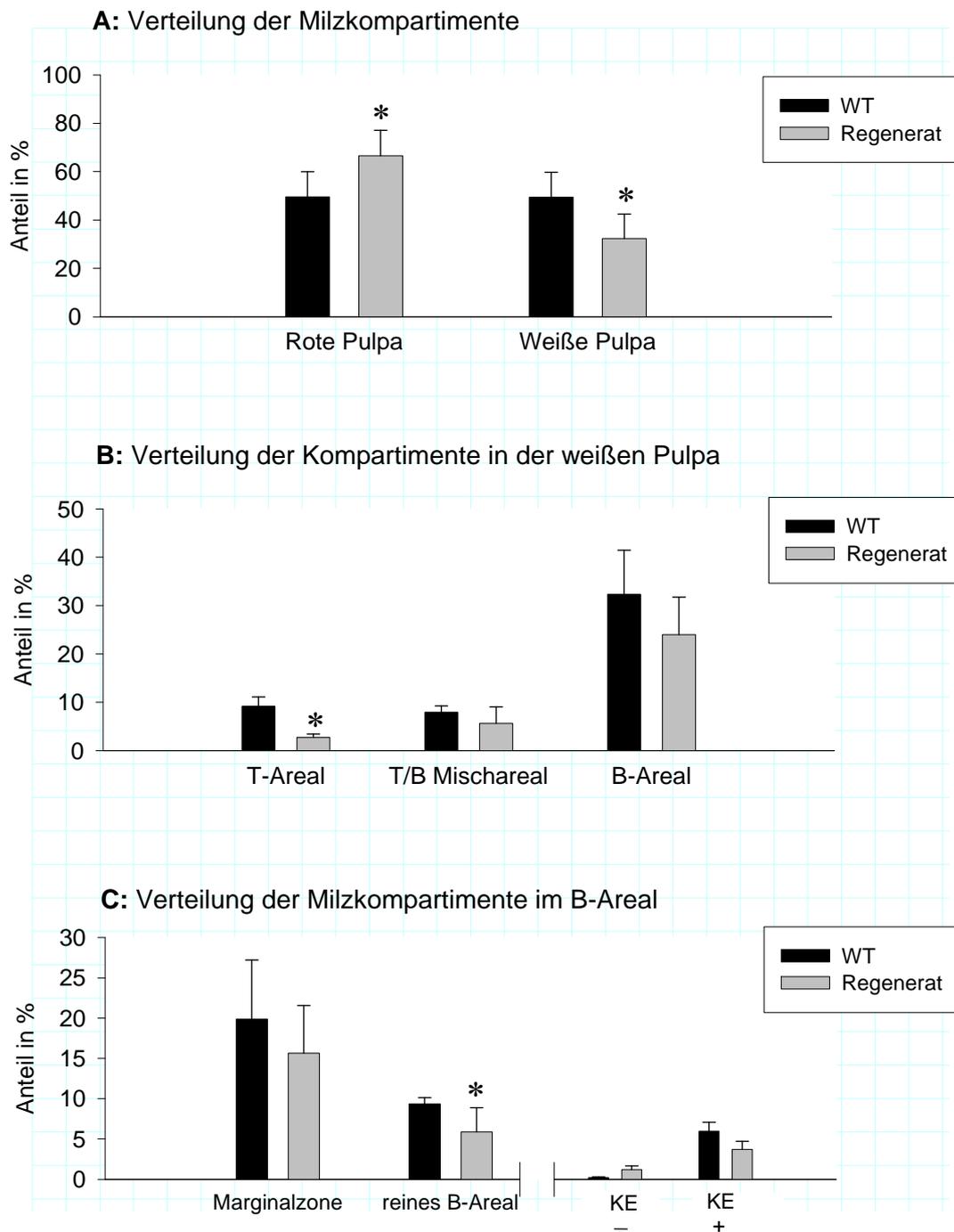
Keimzentren. Die Funktionalität des neuen Gewebes war dadurch bestätigt (Abbildung 18 C).

Es zeigt sich, dass trotz einiger quantitativer Abweichungen alle Kompartimente in korrekter anatomischer Position zu finden waren. Die quantitative Analyse ergab vergleichbare Verhältnisse der Kompartimente innerhalb der weißen Pulpa. Bei dem regenerierten Gewebe der Milztransplantation handelte es sich um funktionsfähiges lymphatisches Gewebe. Die avaskuläre Milztransplantation bildet ein gutes Modell zur Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus.



**Abbildung 17: Wildtyp-Regenerat nach Stimulation mit SRBC**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt eines Wildtyptransplantats 8 Wochen nach Transplantation und 10 Tage nach Injektion von SRBC; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220), dunkelbraun, unscharf begrenzt: Makrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1), dunkelbraun, scharf begrenzt: Keimzentrum (PNA-Anlagerung); RP = rote Pulpa, PALS = periarteriolar lymphatische Scheide, KE = Follikel mit Keimzentrum, MZ = Marginalzone, SRBC = Schaferythrozyten (sheep red blood cells); ursprünglich 100fache Vergrößerung



**Abbildung 18: Vergleichende quantitative Darstellung des Wildtyps mit seinem Autotransplantat**

Dargestellt ist die Verteilung der Milzkompartimente beim Wildtyp der Maus und im Regenerat im Bezug zum gesamten Milzschnitt. (A) Verteilung der Kompartimentflächen innerhalb der gesamten Milz; (B) Verteilung der Kompartimente innerhalb der weißen Pulpa; (C) Verteilung der Kompartimentanteile innerhalb des B-Areals; Fallzahl n=6 je Gruppe (mit Ausnahme der Keimzentren in C: Fallzahl n=3 für stimulierte und unstimulierte Tiere); WT = Wildtyp, KE = Keimzentrum; - = keine Stimulation, + = 10 Tage vor Entnahme mit SRBC stimuliert; \* = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test), signifikante Abweichungen ergeben sich gegenüber der Wildtypmilz.

### 3.4. Die Funktion des TNFR und LT $\beta$ R bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus

Am Autotransplantat der Wildtypmilz wurde gezeigt, dass die regenerierte Milz histologisch und funktionell mit der ursprünglich angelegten Milz vergleichbar war. Dieses Modell sollte nun hier verwendet werden, um die Aufgaben des TNFR und LT $\beta$ R bei der Genese lymphatischen Gewebes im adulten Organismus zu untersuchen.

Milzen eines TNFR-defizienten Spenders wurden in TNFR-defiziente Empfänger transplantiert. Die histologische Betrachtung der Regenerate zeigte massive Abweichungen der Kompartimente im Vergleich zum Wildtyp und auch im Vergleich zur ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz (Abbildung 19). Nur wenige Gebiete konnten als weiße Pulpa identifiziert werden. Diese Gebiete wiesen keine Kompartimentbildung auf. Sie stellten sich vielmehr als kleine Areale mit Lymphozytenansammlungen dar, die häufig direkt an die Milzkapsel anschlossen. In diesen Gebieten waren T-Zellen, B-Zellen und metallophile Makrophagen färberisch nachweisbar. T-Zellen fanden sich eher im Zentrum dieser Areale, B-Zellen füllten die gesamte Fläche der weißen Pulpa. Metallophile Makrophagen lagen meist ungeordnet in diesen Gebieten. An wenigen Stellen war die Bildung einer Marginalzone angedeutet erkennbar. Der Aufbau im Regenerat war im Vergleich zur ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz massiv gestört. Keimzentren bildeten sich, auch nach der Stimulation mit Schaferythrozyten, nicht. Follikulär dendritische Zellen waren in dem TNFR<sup>-/-</sup>-Regenerat nicht darstellbar. Die rote Pulpa wies eine Mischung locker liegender Lymphozyten auf.

Die vorhandenen Areale der weißen Pulpa waren in ihrer Menge massiv vermindert und lagen bei der Messung, im Bezug auf den ganzen Schnitt, unter 15 %. Da die weitere Unterteilung und quantitative Bestimmung der Kompartimente aufgrund der Strukturstörung nicht möglich war, wurde der Vergleich zur ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz tabellarisch verdeutlicht (Tabelle 2).

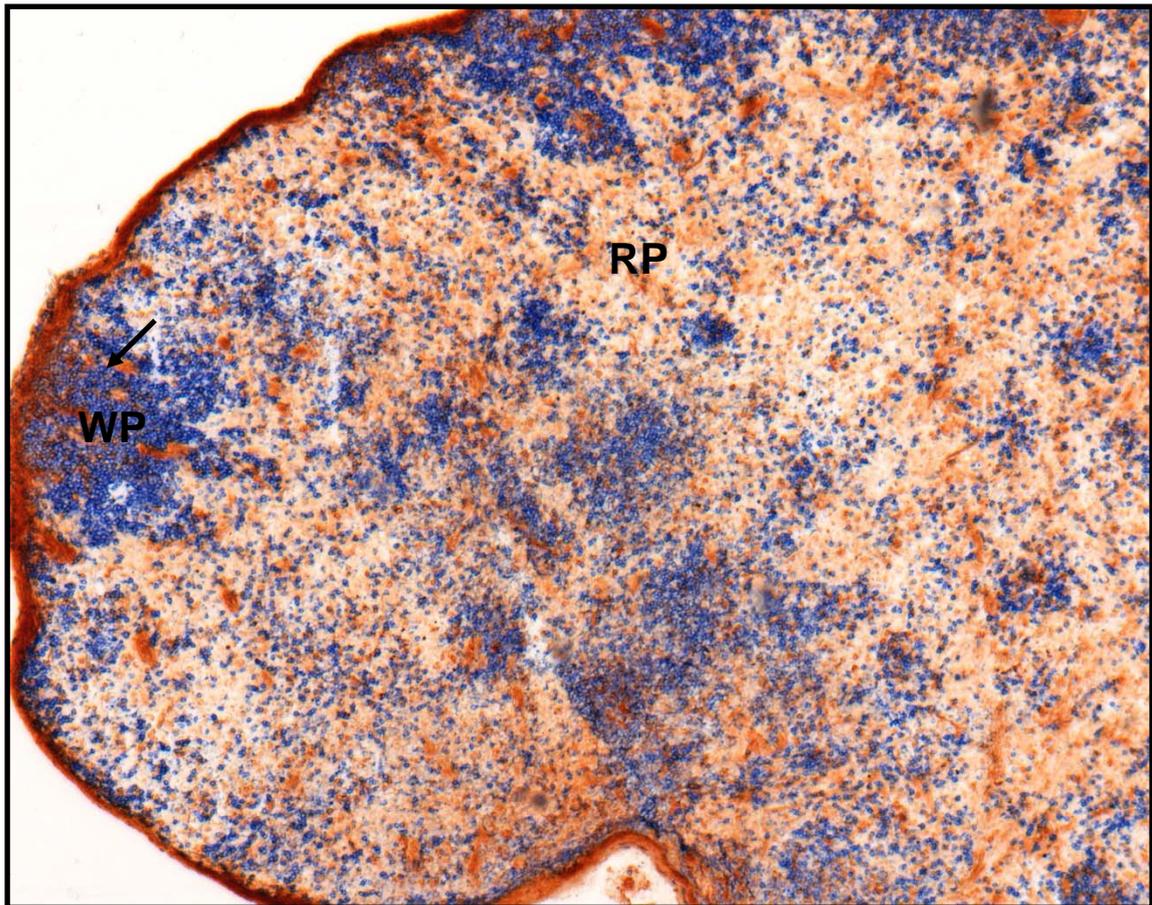
**Tabelle 2: Vergleich der Milzkompartimente in der TNFR<sup>-/-</sup>-Milz und im TNFR<sup>-/-</sup>-Regenerat**

	TNFR <sup>-/-</sup> -Milz	TNFR <sup>-/-</sup> -Regenerat
RP/WP abgrenzbar	+++	+
T-Areal	++	–
Mischzone	+	+
B-Areal	++	+
Marginalzone	++++	+

Die Merkmale der TNFR-defizienten Milz und der TNFR-defizienten Regenerate wurden semiquantitativ dargestellt. Die Einteilung erfolgte in Abstufungen von ++++ = sehr stark ausgeprägt bis + = vorhanden und – = nicht vorhanden; Fallzahl n = 6 für TNFR<sup>-/-</sup>-Milz und n= 3 für TNFR<sup>-/-</sup>-Regenerat; RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa.

Die Tabelle verdeutlicht noch einmal die massiven Abweichungen der in der Entwicklung entstandenen Milz im Vergleich mit dem Gewebe nach TNFR<sup>-/-</sup>-Transplantation. Die weiße Pulpa ist weniger deutlich von der roten Pulpa abgrenzbar. Das T-Areal ist im Regenerat nicht mehr zu finden. T-Zellen finden sich nur mit B-Zellen vermischt. Die Marginalzone, die in der ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz in ihrer Ausbildung dominierte, regenerierte kaum.

Während in der Ontogenese trotz fehlendem TNFR eine fast normale Milz entstehen konnte, ist zu erkennen, dass die Abwesenheit des TNFR im adulten Organismus massive Störungen im lymphatischen Gewebe zur Folge hat.



**Abbildung 19: Darstellung der Kompartimente des TNFR<sup>-/-</sup>-Regenerats**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt eines TNFR<sup>-/-</sup>-Regenerats 8 Wochen nach Transplantation in ein splenektomiertes TNFR<sup>-/-</sup>-Tier; hellbraun: T-Zellen (dargestellt durch anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (dargestellt durch anti-B220); solider Pfeil: metallophile Marginalzonenmakrophagen (dargestellt durch anti-MOMA1); RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa; ursprünglich 50fache Vergrößerung

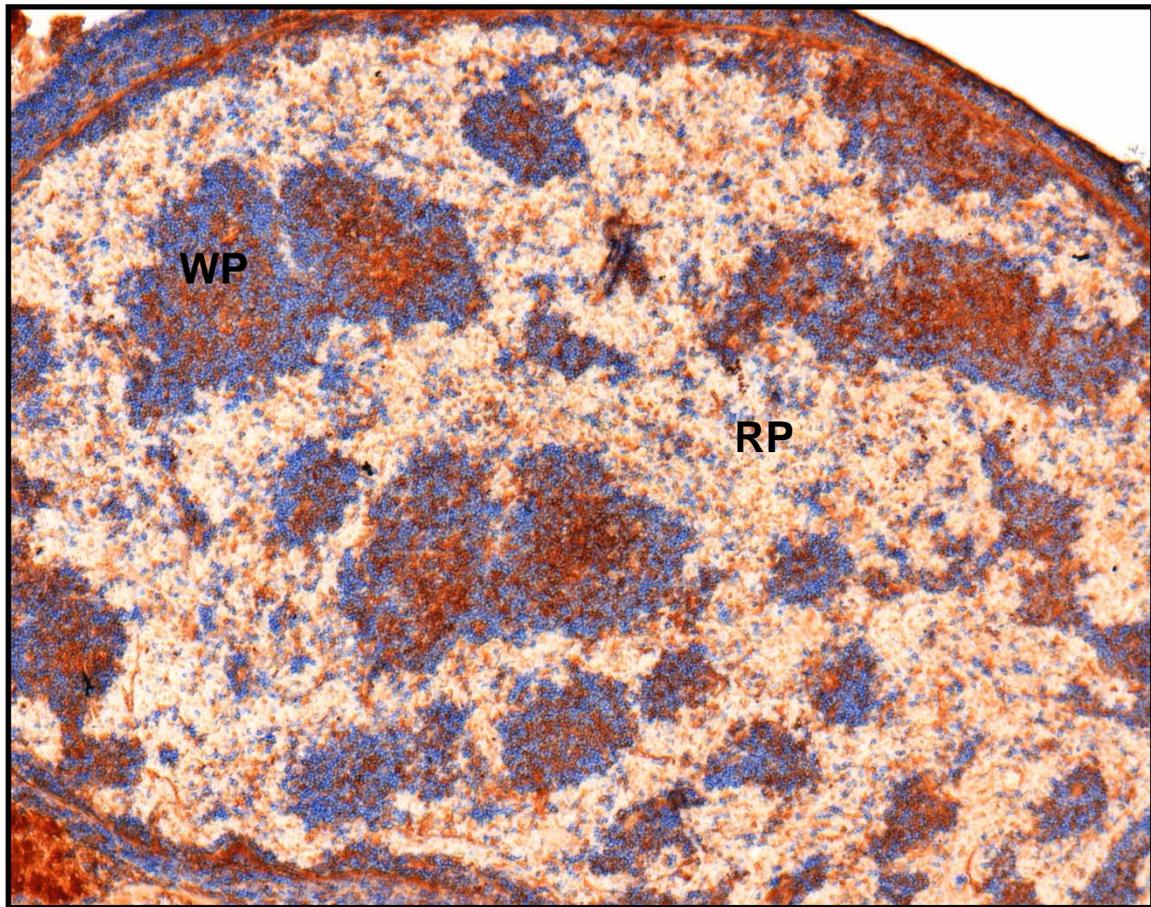
Für den Vergleich der Ontogenese mit der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Tier wurden für den  $LT\beta R^{-/-}$ -Organismus ebenso Autotransplantationen durchgeführt wie zuvor beim TNFR-Knockout-Tier. Beim Vergleich des Regenerats mit der ontogenetisch entstandenen Knockout-Milz zeigten sich die gleichen Strukturdefizite (Abbildung 20). Die weiße und die rote Pulpa waren voneinander getrennt darstellbar. Es ergab sich der Eindruck, dass die Separierung der Areale der weißen Pulpa im Regenerat zugenommen hatte. Das Gesamtareal war insgesamt konstant geblieben. B- und T-Lymphozyten lagen weiterhin gemischt vor, mit einem B-Areal, das sich weiter ausdehnte als die T-Areale. Wie im Vergleichsorgan waren keine Marginalzone, Primär- oder Sekundärfollikel und follikulär dendritische Zellen im Regenerat zu finden. Tabelle 3 verdeutlicht den gleichbleibenden Befund aller  $LT\beta R^{-/-}$ -Milzen.

Die Strukturdefizite sowohl während der Ontogenese als auch im adulten Organismus zeigen die Abhängigkeit dieser Vorgänge vom  $LT\beta R$ .

**Tabelle 3: Vergleich der Milzkompartimente bei der  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz und dem  $LT\beta R^{-/-}$ -Regenerat**

	$LT\beta R^{-/-}$ -Milz	$LT\beta R^{-/-}$ -Regenerat
RP/WP abgrenzbar	+	+
T-Areal	—	—
Mischzone	++	++
B-Areal	+	+
Marginalzone	—	—

Die Merkmale der  $LT\beta R$ -defizienten Milz und der  $LT\beta R$ -defizienten Regenerate wurden semiquantitativ dargestellt. Die Einteilung erfolgte mit Abstufungen von ++ = deutlich vorhanden, + = vorhanden und — = nicht vorhanden; Fallzahl n = 6 für  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz und n= 3 für  $LT\beta R^{-/-}$ -Regenerat; RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa.



**Abbildung 20: Darstellung der Kompartimente des  $LT\beta R^{-/-}$ -Regenerats**

Immunhistologisch gefärbter Kryostatschnitt eines  $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantats 8 Wochen nach Transplantation in ein splenektomiertes  $LT\beta R^{-/-}$ -Tier; hellbraun: T-Zellen (anti-TCR $\beta$ ), blau: B-Zellen (anti-B220); RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa; ursprünglich 50fache Vergrößerung

Die Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse zur Entstehung lymphatischen Gewebes ergibt für die Regulation über den TNF-Rezeptor, dass trotz seines Fehlens in der Ontogenese eine Milz entstehen kann, die wenig strukturelle Defizite im Vergleich zur Wildtypmilz aufweist. Im adulten Organismus dagegen konnte mit dem Modell der avaskulären Milztransplantation kein der Ontogenese gleichwertiges Regenerat erzielt werden.

Für den  $LT\beta R$  ergibt sich schon während der Ontogenese eine stärkere strukturelle Veränderung im Vergleich zur Wildtypmilz gegenüber TNFR-Defizienz. Unter Abwesenheit des  $LT\beta R$  kann ein Regenerat entstehen, das nicht von einer ontogenetisch entstandenen Milz des  $LT\beta R$ -Knockout-Tieres differenzierbar ist, wohl aber große Differenzen zur Struktur einer normalen Milz beinhaltet.

## 4 Diskussion

Histologischer Aufbau und Funktion sind in der Milz miteinander verknüpft (110, 112, 114). In vielen Arbeiten nimmt daher die histologische Betrachtung der Milzkompartimente eine bedeutende Rolle ein. Das lichtmikroskopische Bild gilt als Bewertungsmaßstab eines gesunden oder veränderten Organs (15, 57, 64, 109). In den meisten Fällen erfolgt die Analyse der Milz nach rein qualitativen Ansätzen. Quantitative Analysen bezüglich der Milzstruktur fehlen in der Literatur fast vollständig. Mit der in dieser Arbeit verfolgten quantitativen, computerunterstützten Analyse der Milzkompartimente wird ein neues objektivierbares Beurteilungskriterium geschaffen und bereits vorhandenes Wissen erweitert. Die Aussagekraft der Immunhistologie wird leicht unterschätzt, da neue technische Methoden wie die Durchflusszytometrie und PCR (polymerase chain reaction) zur Verfügung stehen, die genaue Angaben über Zellpopulationen und Zytokinmilieu eines Gewebe machen können (44). Wie das Beispiel der  $LT\beta R$ -Knockout-Milz zeigt, dürfen diese Methoden die histologische Beurteilung nicht ersetzen, sondern sie sollten ergänzend gebraucht werden. Wie in allen Arbeiten zur  $LT\beta R$ -Knockout-Milz stellten sich auch bei unserer Arbeit massive Veränderungen der Kompartimente in der Milz dar (76, 33). Der Vergleich zwischen Wildtypmilz und  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz in der Durchflusszytometrie zeigte, dass zwar natürliche Killerzellen und Marginalzonen-B-Zellen komplett fehlten, weiter aber keine Unterschiede bei anderen Lymphozytensubpopulationen bestanden (76). Auch die mit der PCR gemessene mRNA-Expression von Zytokinen (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-15) zeigte keine Unterschiede im Vergleich WT mit  $LT\beta R^{-/-}$  (76).

Am Wildtyp wurde eine Methode etabliert, mit der sich Milzkompartimente quantitativ erfassen lassen. Fehler, die auf eventuelle Unterschiede der Kompartimentverteilung innerhalb des Parenchyms beruhen, wurden vermieden, indem die Kompartimentflächen im gesamten Milzschnitt erfasst wurden. Es ergaben sich während der Versuche keine Anhaltspunkte für eine präferente Lage der weißen Pulpa oder anderer Kompartimente innerhalb der Milz.

Je nach Schnittebene konnte der B-Lymphozyten-Saum der Marginalzone ohne Makrophagen erscheinen. Dieses Areal wurde dann zum „reinen B-Areal“ gezählt, obwohl es zur Marginalzone gehörte. Solch ein systematischer Fehler kann nicht

ausgeschlossen werden. Die Grenze zwischen zwei Kompartimenten ist nicht immer klar definiert und beruht in einigen Fällen auf dem subjektiven Eindruck des Betrachters. Zufällige Fehler durch unterschiedliche Bewertungskriterien wurden vermieden, indem ein Beobachter alle Präparate beurteilte. Alle äußeren Bedingungen wie Färbung, Lichtverhältnisse, Vergrößerung der Präparate und Reihenfolge der Messung wurden konstant gehalten.

Die Kombination von histologisch quantitativen Werten und Berechnungen darf nicht unkritisch übergangen werden. Die Berechnung bildete aber, unter Beibehaltung der angewandten Methode, die einzige Möglichkeit, einen Wert für die Mischzone zu ermitteln. Eine Fehlerquelle der Arealgröße, die durch die Färbemethode zustande kommen könnte, bilden B220<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Zelltyp findet sich auch bei gesunden Mäusen im Darm, in der Regel aber nicht in der Milz (124). Zum Ausschluss eines Beitrags dieser Zellpopulation wurden T- und B-Zellen in der Immunfluoreszenz mit alternativen Antikörpern (anti-IgM; anti-CD3) markiert.

Mit dem neuen Ansatz der quantitativen Analyse konnten wir erstmalig eine Aussage über die Größe der Mischzone in der Wildtypmaus machen. Die Mischzone beschreibt ein Gebiet innerhalb der weißen Pulpa, in der T- und B-Lymphozyten gemeinsam vorkommen. Wir konnten zeigen, dass dieses Areal eine dem T-Areal und dem reinen B-Areal vergleichbare Fläche beinhaltet (Abbildung 7). Die Ausdehnung dieses Mischareals wurde bisher qualitativ unterschätzt. In der Literatur wurde lediglich bei verschiedenen Spezies auf eine Mischzone hingewiesen (35, 90, 100). Zudem bestand bisher keine einstimmige Meinung über den genauen Ort der Mischzone (36, 90, 110). Die von uns angewandte Fluoreszenzfärbung, bei der beide Zellarten auf dem gleichen Schnitt einzeln und gemeinsam dargestellt werden konnten, gehört zu den neuesten Methoden und ermöglichte uns eine nachvollziehbare Darstellung und Lokalisation der Mischzone. So konnte die Existenz zweier Mischzonen bestätigt werden (Abbildung 6). Erstens befand sich ein Mischareal an der Eintrittsstelle zur weißen Pulpa, besonders in dem Bereich, an dem die PALS an die Marginalzone reicht. Da die Marginalzone die Eintrittspforte aller Zellen aus dem Blut in die Milz bildet, kommt diese Mischzone am ehesten durch die Einwanderung der Lymphozyten zustande (69).

Weiterhin fand sich eine Überlappungszone am Übergang der PALS zu den Follikeln. Dieses Areal dient wahrscheinlich der gezielten Interaktion zwischen T- und B-Zellen

und ist damit äußerst bedeutend für die T-Zell-abhängige Immunreaktion. Nicht nur die Separation der Zellen in Kompartimente, sondern auch die Annäherung der Zelltypen unterliegt einem durch Chemokine kontrollierten Prozess. TH-Zellen der PALS und B-Zellen der Follikel ändern nach Antigenkontakt das Chemokinexpressionsmuster ihrer Oberfläche und orientieren sich zur Mischzone zwischen PALS und Follikel (99). Dort ist der kontrollierte Kontakt und die weitere Stimulation möglich (2, 14). Stimulierte B-Zellen können daraufhin proliferieren, Keimzentren bilden, einen Isotopenswitch durchlaufen und sich zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren (114).

Es stellt sich bei der Trennung der Zellen in einzelne Kompartimente die Frage, ob diese Ordnung insgesamt dazu dient, die Immunantwort gezielt zu bremsen, oder eine Immunreaktion stattfinden zu lassen. Die nähere Betrachtung der Mischzone könnte in der Beantwortung dieser generellen Frage weiterhelfen. Was passiert, wenn sich die Größe der Mischzone verändert? Zwei Theorien sind möglich:

- 1) Wird die Immunreaktion durch die Separation der Zellen in Kompartimente gebremst, so sollte eine vergrößerte Mischzone zu einer überschießenden Immunreaktion und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen führen.
- 2) Sollte die Immunreaktion aber durch die Trennung in Kompartimente zustande kommen, so wäre bei einer ausgeprägten Mischzone die Immunität vermindert und Autoimmunität würde seltener auftreten.

Verschiedene Knockout Varianten im TNF/LT-System erfüllen die Voraussetzung einer ausgeprägten Durchmischung von T- und B-Zellen. Eine zunehmende Störung der Separation findet sich aufsteigend beim  $B-LT\beta^{-/-}$ ,  $LT\beta^{-/-}$  und  $LT\beta R^{-/-}$  (109). Da die Störung der Kompartimentstruktur vor allem einen vermehrten Kontakt zwischen T- und B-Zellen ermöglicht, sind Effekte der Durchmischung besonders in der thymusabhängigen Immunantwort der B-Zellen zu erwarten und sollen im Folgenden verglichen werden.

Die Milz des  $B-LT\beta^{-/-}$  beinhaltet neben einer vergrößerten Mischzone verminderte B-Zell-Follikel aber eine differenzierbare PALS. FDC sind massiv vermindert und die Marginalzone ist schlecht ausgebildet (108). Die Stimulation mit SRBC, die beim WT eine thymusabhängige Immunantwort auslöst, ergab eine verminderte Keimzentrenbildung und einen deutlichen Abfall der IgG-Produktion im Vergleich zum Wildtyp (109).

Die Milz der  $LT\beta^{-/-}$ -Maus liefert ein Modell, in dem die Mischzone in ihrer Ausprägung zwischen der B- $LT\beta^{-/-}$ -Milz und der  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz liegt (109). Im B-Zell-Areal des  $LT\beta^{-/-}$  sind keine Follikel ausgebildet und es ist keine Marginalzone vorhanden (1, 46). Mit dem Antikörper anti-FDC-M1 konnten keine follikulär dendritischen Zellen dargestellt werden. Vereinzelt waren aber FDC mit dem Antikörper anti-FDC-M2 darstellbar (1). Die Stimulation mit SRBC ergab eine verspätet auftretende Immunantwort mit geringen IgG-Leveln im Vergleich zum WT (46). Zusätzlich war eine Reduktion der IgG-Produktion im Vergleich zum B- $LT\beta^{-/-}$  nachweisbar (108). Histologisch waren wenige Keimzentren (PNA-Cluster) in der weißen Pulpa verstreut vorhanden (1).

Eine fast vollständige Durchmischung der B- und T-Zellen findet sich in der Milz des  $LT\beta R^{-/-}$ . Wie auch in unserer Arbeit gezeigt, kommen in der Milz keine Follikel und keine Marginalzone vor. Wie beim  $LT\beta^{-/-}$  finden sich wenige anti-FDC-M2-positive Zellen (33). Der Stimulationsversuch mit SRBC ergab in unserer Studie keine Keimzentrenbildung. Nach intraperitonealer Injektion des haptensierten Hühner  $\gamma$ -Globulins (nitrophenol-haptentated chicken  $\gamma$ -globulin) wurden wenige, aberrante PNA-positive Zellen um die Zentralarterien beschrieben. In niedriger Dosierung ergab sich ein signifikant verminderter Immunglobulinswitch mit IgG-Produktion und Affinitätsreifung (33). Die  $\gamma$ -Globulin-Gabe in erhöhter Dosis zeigte weiterhin erniedrigte Immunglobulinlevel, aber eine Normalisierung der Affinität (33).

Die Untersuchungen dieser Knockout-Tiere zeigen insgesamt, dass sich die T-abhängige Immunantwort bei Vergrößerung der Mischzone verschlechtert. Der zunehmende Mangel an FDC stellt vermutlich eine weitere Ursache für die verminderte Immunreaktion dar. Da es aber trotzdem in allen Fällen zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort kommt und auch ein IgG-Switch stattfindet, ist die Funktion der FDC nicht aufgehoben oder kann kompensiert werden. Neben der insgesamt verminderten Immunantwort ist besonders das verspätete Eintreten der Immunantwort ein Argument für den behindernden Einfluss einer großen Mischzone. Die ungeordnete Verteilung der T- und B-Zellen verringert die Wahrscheinlichkeit, dass der initiale Kontakt der Zellen mit ihrem Antigen stattfindet, da sich dort viele überflüssige Zellen befinden. Antigenerfahrene B- und T-Zellen treffen in diesem Zellpool nicht geordnet zusammen, wodurch die weitere Aktivierung eventuell erst nach einer längeren „Suche“ oder gar nicht stattfinden kann.

Für die Autoimmunität entsteht ein Bild, das Parallelen zur Immunität aufweist. In der  $LT\beta R^{-/-}$ -Maus kommt es durch veränderte Thymusepithelzellen zu einer zentralen

Toleranzstörung der T-Zellen (7, 12). Es wurden lymphozytäre Infiltrate verschiedener Organe beschrieben und dichte Antikörperanlagerungen an Magen, Speicheldrüsen und Pankreas beobachtet (7). Antikörpertiter gegen Insulin, DNA sowie der Rheumafaktor waren signifikant erhöht (12). Obwohl diese Faktoren alle für ein massives Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen sprechen, wurde keine manifeste Erkrankung oder kürzere Lebenszeit der betroffenen Tiere beschrieben (12). Die Aussagen zum Ausbruch der Erkrankungen beruhten in der zitierten Literatur allein auf den genannten Laborparametern. Trotz der vermehrten Antikörperproduktion, die primär auf einen Defekt im Thymus zurückzuführen ist, hat dies für die  $LT\beta R^{-/-}$ -Maus keine schweren Folgen. Autoimmunologische Prozesse sind bei der verringerten Ordnung lymphatischen Gewebes vermindert. Wie am Beispiel der Immunität erläutert, spielt auch hier die verminderte Kontakthäufigkeit der T- und B-Zellen in der vergrößerten Mischzone eine Rolle.

Die Separation der Zellen in einzelne Kompartimente ermöglicht es, Immunantworten gezielter und schneller ablaufen zu lassen. Die Mischzone im Übergang der PALS zum Follikel bildet ein wichtiges Strukturelement der Milz, in dem die sonst getrennt liegenden Zellen in Kontakt treten können. Die Vergrößerung der Mischzone führt dabei nicht zu unkontrollierten Immunantworten, sondern im Gegenteil zu einem verspäteten Eintreten der Immunantwort und einer insgesamt reduzierten Reaktion.

Ein weiterer neuer Aspekt der quantitativen Analyse des Wildtyps der Maus bildet die Dominanz des B-Areals (30%) innerhalb der weißen Pulpa gegenüber dem T-Areal (10%), obwohl Durchflusszytometrie-Studien ein Verhältnis der T- und B-Lymphozyten von 1 : 1 ergaben (77). Kombiniert man beide Studien, ergibt sich die Theorie, dass T-Zellen in der PALS dichter liegen müssen als die B-Zellen im B-Areal.

Der Vergleich der Studien wird erschwert, da vor der Ermittlung der Zellzahlen mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine enzymatische Trennung der roten und weißen Pulpa erfolgte und dabei die Grenze der Marginalzone zur roten Pulpa durch metallophile Makrophagen markiert wurde. Unsere Flächenberechnung der Marginalzone beruhte dagegen auf Einbeziehung des weiter zur roten Pulpa hin liegenden B-Zell-Saums. Ein unbekannter Teil der Marginalzonenfläche beziehungsweise des B-Areals ist beim direkten Vergleich der Zahlen daher abzuziehen. Die Vermutung der dichter liegenden Zellen im T-Areal wird durch Untersuchungen zur Zellverteilung in der weißen Pulpa bei der Ratte (Arbeitsgruppe

Westermann, Daten noch nicht veröffentlicht) bestätigt. Es konnten dort Zellzahlen pro  $\mu\text{m}^2$  Gewebe erhoben werden. Das Ergebnis zeigte, dass die PALS über mehr Zellen pro Flächeneinheit verfügt ( $0,033$  Zellen/ $\mu\text{m}^2$ ) als der Follikel ( $0,023$  Zellen/ $\mu\text{m}^2$ ) und die Marginalzone ( $0,015$  Zellen/ $\mu\text{m}^2$ ). Beim Vergleich unserer Flächenberechnung (T-Areal 10 % + reines B-Areal 10% + Teil der Marginalzone) mit den Zellzahlen ergibt sich ein Verhältnis der Zellen von 1:1. Die Dichte der Zellen bildet eine Parallele zum Aufbau des Milzstromas. Antikörper gegen Fibroblasten und retikuläre Fasern zeigten ein dichteres stromales Netzwerk in der PALS im Vergleich zur lockeren Verteilung der Fasern in den Follikeln (6).

Da man innerhalb der weißen Pulpa von Ratten- und Mausmilz von ähnlichen Flächenverhältnissen der Kompartimente ausgehen kann (39, 72, 123), lassen sich Flächen und Zellzahlen verbinden. T-Zellen nehmen in der Milz die kleinere Fläche im Vergleich zum B-Areal ein. Durch eine dichtere Anordnung der Lymphozyten und extrazellulären Matrix im T-Areal ergibt sich ein Ausgleich, sodass T- und B-Zellen insgesamt in gleichen Zellmengen innerhalb der weißen Pulpa liegen.

Bezüglich der Analyse des TNFR<sup>-/-</sup> lagen in der Literatur bisher allein qualitative Studien vor. Wir konnten mit der quantitativen Analyse die Ähnlichkeit der TNFR<sup>-/-</sup>-Milz mit der Wildtypmilz verdeutlichen (Abbildung 12). Bisher wurde meist davon ausgegangen, dass TNFR<sup>-/-</sup>-Tiere keine Follikel in der Milz aufweisen (81, 107). Wir konnten quantitativ ein B-Areal abgrenzen, das follikulären Strukturen gleicht. Die Lage dieses Areals zwischen PALS und Marginalzone entspricht dem Gebiet, in dem auch im Wildtyp Follikel zu finden sind. Zudem sind dort liegende B-Zellen weder der Mischzone noch der Marginalzone zuzuordnen. Sie bilden ein eigenständiges Areal, entsprechend den follikulären B-Zellen im Wildtyp. Lediglich Größe und Form des Areals zeigen Abweichungen zur normalen Milz. Die B-Zellen bilden keine runden oder kugeligen Areale, sondern liegen in einem die PALS umschließenden Saum.

Der Unterschied zwischen qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten bezüglich follikulärer Strukturen wirft die Frage nach weiteren Kriterien auf, die Aussagen über ein Vorhandensein follikulärer Strukturen machen können.

Gegen das Vorkommen von Follikeln in der TNFR<sup>-/-</sup>-Milz spricht das Fehlen follikulär dendritischer Zellen. Allgemein wird das Vorkommen dieses Zelltyps mit der Ausbildung von Follikeln assoziiert, wobei dies keiner einheitlichen Definition zu Grunde liegt. Genauere Untersuchungen zu FDC konnten zeigen, dass für das

Vorkommen follikulär dendritischer Zellen ein TNF-Signal von hämatopoetischen Zellen an TNF-Rezeptoren auf nicht-hämatopoetischen Zellen notwendig ist (17, 64, 107): Knochenmarktransplantationen aus dem WT ergaben für TNF<sup>-/-</sup>-Empfänger eine Wiederherstellung der Follikel mit der Fähigkeit, Keimzentren nach Stimulation mit SRBC zu bilden (15). Aus subkutan injizierten Lymphknotenzellen neugeborener Mäuse entstanden lymphatische Aggregate mit follikulär dendritischen Zellen (17).

Für das Vorkommen einer follikelähnlichen Struktur spricht die Chemokinexpression im TNFR-Knockout. Studien zeigen, dass B-Zell-leitendes CXCL13 sowohl im B-Areal von TNF<sup>-/-</sup> als auch in TNFR<sup>-/-</sup>-Mäusen zu finden ist (73). Im Vergleich mit dem WT ist diese Expression zwar vermindert, aber messbar. Die verminderte Ausprägung wird entweder durch die fehlende Einwanderung stromaler Zellen wie FDC oder direkt durch die fehlende Signalgebung am TNFR verursacht.

Die Betrachtung der anderen Kompartimente im TNFR<sup>-/-</sup> ergaben weiterhin Ähnlichkeiten mit der Wildtypmilz. Die PALS und die Marginalzone waren korrekt lokalisiert. Die Marginalzone zeigte eine leichte Zunahme der Größe. Das T-Areal stellte sich leicht vermindert dar. In Studien zur Chemokinexpression spiegelt sich dieser minimale Unterschied in einer geringen Abnahme des T-Zellen organisierenden Chemokins CCL21 in TNF<sup>-/-</sup> und TNFR<sup>-/-</sup> (73). Da FDC nicht in der PALS vorkommen, könnte die geringe Veränderung durch die Unterbrechung der Signale über den TNFR erklärt werden. Dieser Signalweg spielt vermutlich bei der Organisation des T-Areals eine untergeordnete Rolle, sodass die Auswirkung auf das Areal nur minimal ist. Die PALS im TNFR<sup>-/-</sup> ist deshalb verkleinert vorhanden.

Insgesamt konnten wir im TNFR-Knockout das Vorkommen aller Milzkompartimente beobachten. Ein messbares B-Areal fand sich in follikelähnlicher Lokalisation und Größe. Die Expression des B-Zellen anziehenden Chemokins CXCL13 in diesem Gebiet spricht zudem für eine Funktion dieses Gebiets, die den Follikeln in der Wildtypmaus entspricht (73). Die anderen Kompartimente zeigten sich weitgehend unauffällig.

Die Milzstruktur der LTβR-defizienten Maus zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp ein abweichendes Bild (Abbildung 11). In Übereinstimmung mit der Literatur stellten wir eine massive Störung der Organisation innerhalb der weißen Pulpa und das Fehlen einiger Kompartimente fest (33, 109). Quantitativ ergab sich zusätzlich eine starke

Abnahme der weißen Pulpa. Der Verlust des eigenständigen T-Areals, die Verminderung des B-Areals und die massive Zunahme der Mischzone verdeutlichen auch quantitativ die Abweichung zum Wildtyp (Abbildung 12).

Für die Bildung normaler Milzkompartimente wird LT auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs benötigt, die mit  $LT\beta R$  tragenden Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs, wahrscheinlich den Stromazellen, interagieren: Die Gabe von WT-Knochenmark führt nicht zur Normalisierung der Milzstruktur im  $LT\beta R^{-/-}$  (29). Nach WT-Knochenmarktransplantation in ein  $LT\beta^{-/-}$ -Tier verbesserte sich der Aufbau der Kompartimente (29). Die Chemokinkonzentrationen von CXCL13 und CCL21 waren sowohl in  $LT\alpha^{-/-}$ - als auch in  $LT\beta^{-/-}$ -Tieren vermindert (73). Die massive Verminderung in beiden Knockout-Varianten und der stärkere Abfall im  $LT\alpha^{-/-}$  im Vergleich zum  $TNFR^{-/-}$  zeigt, dass die Chemokinproduktion von der Interaktion des  $LT\alpha 1\beta 2$  mit  $LT\beta R$  abhängt und nicht von der  $LT\alpha 3$ -Verbindung mit dem  $TNFR$  (73).

Bei  $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren kommen keine Marginalzonen-B-Zellen, Marginalzonenmakrophagen (MZM) oder metallophilen Makrophagen (MMM) in der Milz vor (33). Der Grund hierfür ist schwieriger zu erklären. Bisher wurde noch kein Chemokin identifiziert, das für die Entstehung der Marginalzone direkt verantwortlich ist. Die Dislokation der MZM bei CCL21- und CCL19-Mangel zeigt, dass Chemokine bei der Lokalisation eine Rolle spielen (4). Es konnte auch gezeigt werden, dass beide Makrophagenarten sowohl während der Entwicklung als auch in der Homöostase vom Vorkommen der Marginalzonen-B-Zellen abhängig sind (77). Der genaue Retentionsmechanismus der B-Zellen in der Marginalzone und dessen  $LT\beta R$ -Abhängigkeit wird unter Berücksichtigung verschiedener Integrine und Chemokine noch diskutiert (85).

Insgesamt ergeben sich Unterschiede in der Abhängigkeit der Ontogenese von  $TNFR$  und  $LT\beta R$ . Beide Rezeptoren werden für die Entstehung einer vollkommen intakten Milzstruktur und -funktion benötigt. Während bei  $TNFR$ -Defizienz in der Ontogenese eine Milz entsteht, die kaum Abweichungen zum Wildtyp erkennen lässt, führt das Fehlen des  $LT\beta R$  zu einer massiven Abnahme der weißen Pulpa und zu Störungen in allen Kompartimenten.

## **Die avaskuläre Milztransplantation – ein Modell für die Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus**

Mit der qualitativen und quantitativen Analyse der Milzregenerate im Wildtyp konnten wir zeigen, dass die avaskuläre Milztransplantation ein sehr gutes Modell für die Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus darstellt. Der Nachteil bisheriger Studien zu dieser Fragestellung war ein aktiver Eingriff in die Regulationsmechanismen, um lymphatisches Gewebe entstehen zu lassen (28, 56, 55). Die avaskuläre Milztransplantation führt auf natürlichem Wege zu einem Regenerat, ohne die regulatorischen Faktoren direkt zu manipulieren (79, 112).

Die Kinetik zeigte, dass 8 Wochen die geeignete Dauer darstellen, ein vollständig regeneriertes Gewebe zu erhalten. Wie auch in anderen Arbeiten festgestellt (Abbildung 10), wurde die transplantierte Milz bis auf einen kleinen Randsaum zunächst nekrotisch und entwickelte sich vom Rand ins Zentrum hinein neu (43). Bereits nach 3 Wochen war der Anteil weißer Pulpa am gesamten Milzschnitt erreicht, der sich auch bei einigen Tieren nach 8 Wochen fand (Abbildung 16 A). Kompartimente waren zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht ausdifferenziert (Abbildung 13). Histologisch betrachtet dominierten nach 3 Wochen die lymphozytären Anordnungen durch B-Zellen, während T-Zell-Anordnungen kaum vorkamen (Abbildung 13). Durchflusszytometrische Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass die Einwanderung der Lymphozyten ab der dritten Woche des Regenerationsprozesses in einem konstanten Verhältnis verläuft (76). B-Zellen bildeten mit 70 % die größere einwandernde Lymphozytenfraktion gegenüber den T-Zellen mit 25 % (76). Die primäre Organisation der B-Zellen, trotz im Regenerat vorhandener T-Zellen, bildet eine Parallele zur Ontogenese (116): Die Einwanderung der T-Lymphozyten ist abhängig von bereits vorhandenen B-Zellen (74). Signale der B-Zellen sind initial notwendig, um die Chemokinproduktion von CCL21 der Stromazellen im T-Areal anzuregen; daher ist auch das spätere T-Areal um die Zentralarteriole primär von B-Zellen besiedelt (27, 74). In der fünften bis achten Woche veränderte sich das Verhältnis B-Areal zu T-Areal nicht mehr (Abbildung 16 B). Die Bestimmung der Gesamtlymphozytenzahl zeigte, dass es in diesem Zeitraum noch zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl in der Milz kommt (76). Die histologische Struktur verbesserte sich, was besonders an der Marginalzone erkennbar war, die histologisch in den meisten Fällen erst in der achten Woche

vollständig organisiert erschien. Da sowohl in der Ontogenese als auch in Milztransplantaten die Marginalzone als Abschluss der Entwicklung angesehen wird, kann nach 8 Wochen Regenerationszeit von einem Abschluss der Entwicklung ausgegangen werden (13, 112).

An dem voll entwickelten, regenerierten Gewebe konnten wir weiterhin zeigen, dass es sich um organisiertes lymphatisches Gewebe der Milz handelt. Das histologische Bild zeigte einen normalen Aufbau der Milz (Abbildung 14). Alle Kompartimente waren differenzierbar vorhanden. Bei Stimulation mit SRBC entstanden PNA<sup>+</sup> Keimzentren (Abbildung 17). Die Induktion der thymusabhängigen Immunantwort bewies, dass eine immunologische Funktion im Regenerat ablaufen kann. Es ist auch bekannt, dass Milzregenerate bei der Infektionsabwehr pathogener Mikroorganismen mitwirken (62, 79). Gerade bei Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*, die nach Splenektomie häufig sehr schwer verlaufen, trug ein Milzregenerat zum Überleben bei (97, 98).

Die Abnahme der weißen Pulpa im Regenerat verlief für fast alle Kompartimente gleichmäßig, was für eine intakte interne Struktur spricht (Abbildung 12). Der Vergleich mit weiteren Transplantationsversuchen, in denen das Ergebnis durch eine Quantifizierung bestimmt wurde, ergaben in der Vergangenheit wesentlich schlechtere Resultate (72). Die weiße Pulpa erreichte dort nur ein Fünftel der Kontrolle. Die Werte der Kompartimente unterlagen bei den einzelnen Tieren zudem extremen Schwankungen, die für die Marginalzone von 0 % bis zu einer normalen Ausprägung reichte. Eine spätere Studie, bei der mit einer ähnlichen Operationsmethode gearbeitet wurde und moderne Möglichkeiten zur Auswertung zur Verfügung standen, ergab mit unseren Ergebnissen vergleichbare morphometrische Daten (123).

Es stellt sich die Frage, warum bei dem insgesamt gutem Ergebnis die weiße Pulpa nicht den Anteil der weißen Pulpa in der Kontrollmilz erreichen konnte.

Vermutlich liegt hier eine Kombination verschiedener Faktoren zu Grunde. Da die Transplantation ohne Anschluss an das Gefäßsystem erfolgt, ist der Blutfluss des Regenerats im Vergleich zur normalen Milz vermindert (79). Die Einwanderung markierter Lymphozyten erreicht in allen Kompartimenten nur ein Zehntel der Menge des Kontrolltieres (123). Auch der Ort, an den das Transplantat gepflanzt wird, spielt eine Rolle. Es wurden sowohl für die subkutane als auch für die intra-omentale Transplantation gute Ergebnisse erreicht (26, 106). Die auch von uns verfolgte Methode der intra-omentalen Platzierung der Milzstücke ergab im direkten Vergleich und vor allem funktionell das bessere Ergebnis (106). Auch das Alter der Tiere ist

entscheidend. Das Alter des Empfängers bestimmt in erster Linie den Innervationsgrad und die histologische Strukturierung, das Alter des Spenders hingegen die maximal erreichbare Größe, wobei ein junger Empfänger und ein junger Spender insgesamt das beste Ergebnis liefern (121). Es ist weiterhin bekannt, dass die Menge des implantierten Gewebes nicht direkt mit der Menge an regeneriertem Gewebe korreliert. Ein großes Implantat begünstigt nicht die Entwicklung eines großen Regenerats (79). Zu viel Milzgewebe hat sich auf Grund der massiven Nekrose sogar ungünstig für das Überleben der Versuchstiere erwiesen (104). Auch ist schon sehr früh aufgefallen, dass die im Körper belassene eigene Milz oder Milzreste die Entwicklung eines Transplantats blockieren (119). In ähnlicher Weise entwickelten sich die späteren Transplantate schlechter, wenn mehrere Milzen nacheinander in das gleiche Tier eingebracht wurden (71). Vor kurzem wurde eine neue Theorie über die Limitation des Wachstums veröffentlicht, die vor allem zu einem reduzierten Endgewicht des Transplantats führte (76). Im Organismus vorhandenes lymphatisches Gewebe wie Lymphknoten und Milz vermitteln  $LT\beta R$ -abhängig einen hemmenden Impuls auf neu wachsendes lymphatisches Gewebe. Während sich in der Ontogenese Lymphknoten und Milz parallel zueinander entwickeln, blockieren die Lymphknoten indirekt das Wachstum des Milztransplantats im erwachsenen Organismus (76). Ein Regenerat kann folglich unabhängig von allen oben genannten Faktoren nicht die Ausmaße der ontogenetisch angelegten Milz erreichen. Obwohl die Einwanderung der Zellen auf ein Zehntel abnimmt (123), ergibt sich am Ende eine weiße Pulpa, die wesentlich größer ist als ein Zehntel der Ausgangsmenge. Die  $LT\beta R$ -vermittelte Hemmung der Regeneration könnte daher nicht nur an der insgesamt kleineren Regeneratmenge, sondern auch an der verminderten weißen Pulpa beteiligt sein.

Um die Entstehung lymphatischen Gewebes in dem Modell der Milztransplantation richtig zu beurteilen, ist es entscheidend, ob die beobachteten Effekte auf die Eigenschaften des Spenderorgans oder auf den Empfänger zurückzuführen sind. Transplantationen an kongenen Tierstämmen haben gezeigt, dass regeneriertes Gewebe fast ausschließlich mit Zellen des Empfängers besiedelt wird (76, 79). Auch einige lymphatische Zellen aus dem implantierten Organ überleben die Transplantation und verteilen sich unregelmäßig in lymphatischen und nicht lymphatischen Organen des Empfängers (120). Die Zellen behalten dabei ihre

Proliferations- und Funktionsfähigkeit; die Relevanz bezüglich der Milzregeneration ist hingegen nicht geklärt (120). Eindeutig ist dagegen die Rolle des Stromas. Stromazellen des Spenders bilden die Voraussetzung für die Entstehung des Regenerats. Neues lymphatisches Gewebe entsteht an der Stelle, an der das Implantat platziert wird. Die Bestrahlung der Milz vor der Implantation mit einer für Zellen letalen Strahlendosis lässt kein Milzregenerat entstehen (103). Die Stromazellen sind ursprünglich ontogenetisch entstandenes Material. Das Modell der avaskulären Milztransplantation ist folglich nicht ganz unabhängig von der Ontogenese durchzuführen. Diese Einschränkung gilt aber in gleichem Maße für alle folgenden Versuche dieser Reihe. Es ist schwer zu sagen, ob sich Milzregenerate auch ohne ontogenetisch entstandene stromale Zellen entwickeln können, da nach einer Splenektomie ohne Manipulation keine neue Milz im Organismus entsteht. Da alle Gewebe und Organe ursprünglich aus einer omnipotenten Zelle hervorgehen, könnte die Stammzellforschung auf diesem Gebiet Erfolge bringen. Bei Bereitstellung des richtigen Milieus könnte es möglich sein, Milzstroma aus Stammzellen zu generieren. Im Interesse der Stammzellforschung steht die Milz bisher aber nur durch ihre Rolle bei der Hämatopoese und die damit verbundene Stammzellgewinnung (25). Für die Entstehung von Lymphknoten hingegen wurde bereits eine Theorie entwickelt, in welcher die Umwandlung der mesenchymalen Stammzelle in die Vorstufe einer Stromazelle primär unabhängig von LT, TNF und LIGHT abläuft (19).

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass die avaskuläre Milztransplantation als Modell für die Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus dienen kann. Innerhalb von 8 Wochen entwickelt sich aus einem initial fast vollständig nekrotischen Milzstück neues lymphatisches Gewebe mit Kompartimenten, die in gleicher Weise in der nativen Milz zu finden sind. Die Kompartimente erfüllen immunologische und nicht-immunologische Funktionen. Das Modell kann zur Untersuchung weiterer Faktoren verwendet werden.

### **TNFR und LT $\beta$ R bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus**

Wie in der ontogenetisch entstandenen TNFR<sup>-/-</sup>-Milz gezeigt, spielt der TNFR in der Ontogenese eine untergeordnete Rolle. Das Ergebnis der Transplantation einer TNFR<sup>-/-</sup>-Spendermilz in einen TNFR<sup>-/-</sup>-Empfänger überraschte daher sehr. Das

Regenerat zeigte eine massiv verminderte weiße Pulpa mit kaum differenzierbaren Kompartimenten (Abbildung 18). Der TNFR stellt folglich bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus einen sehr wichtigen Bestandteil dar. Vermutlich verursacht der Verlust des TNFR im Stroma des Regenerats die gestörte Entwicklung und nicht die TNFR-Abwesenheit im Empfänger: Aus subkutan injizierten Lymphknotenzellen des Wildtyps entstanden in einer Studie auch im TNFR<sup>-/-</sup>-Tier Lymphknoten mit natürlicher Morphologie (17). Direkte Milztransplantationen zwischen TNFR<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren könnten diese Frage definitiv klären. Diese Versuche waren für uns zum jetzigen Zeitpunkt nicht durchführbar, da keine genetisch kompatiblen Tierstämme für dieses Experiment zur Verfügung standen.

Weiterhin manifestieren sich die Auswirkungen des TNFR-Verlustes im adulten Organismus eher in einem sehr frühen Stadium der Regeneration. Dafür sprechen erstens die kaum vorhandene und schlecht organisierte weiße Pulpa und zweitens geringe Effekte, die ein TNFR-Signal-Entzug bei vollständig differenziertem Gewebe hat (57): Blockierende Antikörper gegen den TNFR bewirkten nur eine Abnahme des FDC-Netzwerks. Selbst dieser Effekt wurde bei Induktion einer Immunantwort wiederhergestellt (57).

Unser Befund ergänzt Studien an Lymphknotenregeneraten, in denen Unterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen beobachtet wurden (17). Die Injektion von Lymphknotenzellen ergab in neugeborenen Mäusen die Entwicklung normaler Lymphknoten. Im adulten Organismus dagegen entstanden lymphatische Aggregate mit schlechter Organisation. Die Struktur des Gewebes verbesserte sich nach der Stimulation der B-Zellen durch anti-CD40 (17). Ursächlich für die Unterschiede zwischen Ontogenese und adultem Organismus könnte der sinkende Anteil lymphoider Vorläuferzellen (lymphoid inducer cells) nach der Geburt sein. Lymphoide Vorläuferzellen vermitteln zur Initiierung der Lymphknotenentwicklung ein starkes LT-Signal am LT $\beta$ R der stromalen Vorläuferzelle (Abbildung 3). Die einwandernden B-Zellen übernehmen nach kurzer Zeit die Signalgebung in einem positiven Rückkopplungsmechanismus und tragen damit zum Erhalt der lymphatischen Struktur bei (18). Im adulten Organismus könnte die Entstehung lymphatischen Gewebes von reifen B-Zellen und deren starken Aktivierung abhängen. Unsere Versuche zeigen, dass diese Aktivierung ein Signal über den TNFR mit TNF oder LT $\alpha$ 3 benötigt.

Ergänzend zeigen Studien, dass durch lokale TNF- und LT $\alpha$ -Expression lymphatisches Gewebe entsteht (49, 84). Obwohl die Induktion der beiden Faktoren

bereits die Einwanderung lymphatischer Zellen zur Folge hatte, konnte bisher noch nicht festgestellt werden, dass auch der Umkehrschluss gilt: Ohne die Signalvermittlung durch den TNFR ist die Entstehung neuen lymphatischen Gewebes nicht möglich. TNFR-blockierende Medikamente erlangen durch diese Erkenntnis eine gestärkte Stellung in der Therapie und eventuell auch in der Prophylaxe autoimmunologischer und chronisch inflammatorischer Prozesse (60, 82). Besonders TNFR-artige blockierende Antikörper würden so neben der reinen TNF-Blockade zusätzlich die Genese lymphatischen Gewebes durch die Interaktion des  $LT\alpha$  am TNFR verhindern (115).

Bereits in der Ontogenese erwies sich der  $LT\beta R$  als äußerst bedeutend. Bei der Transplantation eines  $LT\beta R$ -defizienten Organs in einen  $LT\beta R$ -defizienten Empfänger zeigt sich die gleiche Bedeutung in der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus. Das Regenerat wies keine Unterschiede zur ontogenetisch entstandenen  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz auf (Abbildung 19). Etwas überraschend ist der Befund im Zusammenhang mit einer anderen Studie, in der die Implantation einer  $LT\beta R^{-/-}$ -Milz in einen Wildtyporganismus nur eine minimale Regeneration zeigte (76). Der Wildtyporganismus übt, anders als der  $LT\beta R$ -defiziente Organismus, eine Hemmung auf die Regeneration des Implantats aus (76). Dies geschieht über den  $LT\beta R$  des Empfängers, aber unabhängig vom  $LT\beta R$  auf dem Spenderorgan (76). Fehlt dieser hemmende Mechanismus durch  $LT\beta R$ -Defizienz des Empfängers, dann kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Regeneration auch ohne  $LT\beta R$  auf dem Milzstroma stattfinden. Für die Entstehung lymphatischen Gewebes im reifen Organismus konnten die veränderte Struktur und das Fehlen kompletter Zellpopulationen auf den  $LT\beta R$ -Mangel des Milzstromas zurückgeführt werden (76). Da die Transplantation einer WT-Milz in einen  $LT\beta R$ -defizienten Empfänger zur Bildung einer Milz mit allen Strukturelementen geführt hat (76), scheinen die Zellen per se in der  $LT\beta R$ -Maus generierbar zu sein. Der  $LT\beta R$  hat bei der Entstehung lymphatischen Gewebes während der Ontogenese und im adulten Organismus die gleiche Bedeutung.

### 5 Zusammenfassung

Die Milz steht als größtes sekundär lymphatisches Organ bei vielen Fragestellungen der Immunologie im Mittelpunkt der Forschung. In fast allen Fällen erfolgte die Beschreibung der Histologie allein nach qualitativen Gesichtspunkten, während eine Quantifizierung nicht stattfand. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der computerunterstützten Quantifizierung der Milzkompartimente, wobei eine objektive Darstellung der Bilder geschaffen wurde. Mit der Quantifizierung konnte die avaskuläre Milztransplantation als Modell zur Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus etabliert werden. Bereits bei der Messung der Kompartimente des Wildtyps ergab sich ein hoher Anteil einer bisher unterschätzten Zone, in der T- und B-Zellen gemeinsam vorkommen. Die weitere Analyse dieser Zone ergab zwei Mischbereiche: erstens in der Eintrittszone des Blutes in die weiße Pulpa der Milz und zweitens am Übergang des T-Areals (PALS) zum B-Areal (Follikel). Die Mischung der Zellen im Bereich der Follikel und PALS ist bedeutend für die T- und B-Zell-Kontakte und die Generierung einer TH-abhängigen Immunantwort. Eine Vergrößerung der Mischzone ist für die Entstehung einer Immunantwort nicht förderlich.

Der TNFR und der LT $\beta$ R sollten hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus überprüft werden. Diese Zytokine aus der TNF-Superfamilie hatten sich bereits sowohl für die Entwicklung als auch für die Aufrechterhaltung lymphatischer Gewebe als bedeutend erwiesen. Die Untersuchung der ontogenetisch entstandenen Milzen der Knockout-Mäuse ergaben für den TNFR eine unbedeutende Rolle während der Ontogenese. Die TNFR<sup>-/-</sup>-Milz beinhaltete alle Kompartimente, einschließlich eines follikelähnlichen B-Zell-Areals. Die LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-Milz zeigte eine gestörte Milzstruktur und suggeriert damit eine bedeutende Rolle des Rezeptors während der Entwicklung der Organe.

Während die Ontogenese der Milz nur zu einem geringen Grad vom TNFR abhängt, entstand unter TNFR-Mangel im adulten Organismus fast kein lymphatisches Gewebe. Ein Signal über den TNFR ist notwendig, um lymphatisches Gewebe im adulten Organismus, vermutlich durch B-Zell-Signale, entstehen zu lassen.

Die Transplantation einer LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-Milz in einen LT $\beta$ R-defizienten Organismus zeigte genauso undifferenziertes lymphatisches Gewebe wie bereits in der Ontogenese beobachtet. Der LT $\beta$ R ist folglich auch für die Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus bedeutend.

## 6 Literaturverzeichnis:

1. **Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K:**  
Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94, 9302-7.
2. **Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG:**  
In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines.  
J Exp Med, 1999. 190, 1123-34.
3. **Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG:**  
A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.  
Nature, 2000. 406, 309-14.
4. **Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM:**  
Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis.  
Nat Immunol, 2002. 3, 1185-91.
5. **Aust G, Sittig D, Becherer L, Anderegg U, Schütz A, Lamesch P, Schmücking E:**  
The role of CXCR5 and its ligand CXCL13 in the compartmentalization of lymphocytes in thyroids affected by autoimmune thyroid diseases.  
Eur J Endocrinol, 2004. 150, 225-234.
6. **Balogh P, Horvath G, Szakal AK:**  
Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen.  
J Histochem Cytochem, 2004. 52, 1287-98.

- 7. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC:**  
Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR.  
J Exp Med, 2003. 198, 757-69.
- 8. Browning JL, French IE:**  
Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos.  
J Immunol, 2002. 168, 5079-87.
- 9. Browning JL, Sizing DI, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR, Ambrose CM, Hession C, Miatkowski K, Griffiths DA, Ngam-ek A, Meier W, Benjamin CD, Hochman PS:**  
Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes.  
J Immunol, 1997. 159, 3288-98.
- 10. Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton HC, Haraldsen G, Brandtzaeg P:**  
Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis.  
Blood, 2004. 104, 3021-7.
- 11. Chen LT, Weiss L:**  
The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen.  
Blood, 1973. 41, 529-37.
- 12. Chin RK, Lo JC, Kim O, Blink SE, Christiansen PA, Peterson P, Wang Y, Ware C, Fu YX:**  
Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression.  
Nat Immunol, 2003. 4, 1121-7.

- 13. Claassen E, Ott A, Boersma WJA, Deen C, Schellekens MM, Dijkstra CD, Kors N, van Rooijen N:**  
Marginal zone of the murine spleen in autotransplants: functional and histological observations in the response against a thymus-independent type 2 antigen.  
Clin exp Immunol, 1989. 77, 445-451
- 14. Cook MC, Basten A, Fazekas de St Groth B:**  
Outer periarteriolar lymphoid sheath arrest and subsequent differentiation of both naive and tolerant immunoglobulin transgenic B cells is determined by B cell receptor occupancy.  
J Exp Med, 1997. 186, 631-43.
- 15. Cook MC, Körner H, Riminton DS, Lemckert FA, Hasbold J, Amesbury M, Hodgkin PD, Cyster JG, Sedgwick JD, Basten A:**  
Generation of splenic follicular structure and B cell movement in tumor necrosis factor-deficient mice.  
J Exp Med, 1998. 188, 1503-10.
- 16. Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA:**  
A lymphotoxin-beta-specific receptor.  
Science, 1994. 264, 707-710.
- 17. Cupedo T, Jansen W, Kraal G, Mebius RE:**  
Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin.  
Immunity, 2004. 21, 655-667.
- 18. Cupedo T, Lund FE, Ngo VN, Randall TD, Jansen W, Greuter MJ, Waal-de Malefyt R, Kraal G, Cyster JG, Mebius RE:**  
Initiation of cellular organization in lymph nodes is regulated by non-B cell-derived signals and is not dependent on CXC chemokine ligand 13  
J Immunol, 2004. 173, 4889-4896.

**19. Cupedo T, Mebius RE:**

Cellular interactions in lymph node development.

J Immunol, 2005. 174, 21-25.

**20. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN:**

Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles.

Immunol Rev, 2000. 176, 181-93.

**21. Cyster JG:**

Lymphoid organ development and cell migration.

Immunol Rev, 2003. 195, 5-14.

**22. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR:**

The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways.

Immunity, 2002. 17, 525-35.

**23. Delves PJ, Roitt IM:**

The immune system. First of two parts.

N Engl J Med, 2000. 343, 37-49.

**24. Delves PJ, Roitt IM:**

The immune system. Second of two parts.

N Engl J Med, 2000. 343, 108-17.

**25. Dennis JE, Charbord P:**

Origin and differentiation of human and murine stroma.

Stem Cells, 2002. 20, 205-214.

- 26. Dijkstra CD, Langevoort HL:**  
Regeneration of splenic tissue after autologous subcutaneous implantation:  
Development of non-lymphoid cells in the white pulp of the rat spleen.  
Cell Tissue Res, 1982. 222, 69-79.
- 27. Dijkstra CD, Döpp EA:**  
Ontogenetic development of T- and B-lymphocytes and non-lymphoid cells  
in the white pulp of the rat spleen.  
Cell Tissue Res, 1983. 229, 351-363.
- 28. Drayton DL, Ying X, Lee J, Lesslauer W, Ruddle NH:**  
Ectopic LTalpha directs lymphoid organ neogenesis with concomitant  
expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted  
sulfotransferase.  
J Exp Med, 2003. 197, 1153-1163.
- 29. Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Fütterer A, Kosco-Vilbois MH,  
Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K:**  
Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of  
lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of  
lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells.  
J Exp Med, 1999. 189, 159-167.
- 30. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira  
S, Aderem A:**  
Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by  
sequestering iron.  
Nature, 2004. 432, 917-21.
- 31. Fu YX, Huang G, Matsumoto M, Molina H, Chaplin DD:**  
Independent signals regulate development of primary and secondary follicle  
structure in spleen and mesenteric lymph node.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94, 5739-43.

- 32. Fu YX, Chaplin DD:**  
Development and maturation of secondary lymphoid tissues.  
Annu Rev Immunol, 1999. 17, 399-433.
- 33. Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K:**  
The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues.  
Immunity, 1998. 9, 59-70.
- 34. Gommerman JL, Browning JL:**  
Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease.  
Nat Rev Immunol, 2003. 3, 642-55.
- 35. Grogan ThM, Jolley CS, Rangel CS:**  
Immunoarchitecture of the human spleen.  
Lymphology, 1983. 16, 72-82.
- 36. Grogan ThM, Rangel CS, Richter LC, Wirt DP, Villar HV:**  
Further delineation of the immunoarchitecture of the human spleen.  
Lymphology, 1984. 17, 61-68.
- 37. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG:**  
A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements.  
J Exp Med, 2001. 194, 45-56.
- 38. Hehlhans T, Pfeffer K:**  
The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.  
Immunology, 2005. 115, 1-20.

**39. Herklotz J:**

Die lokale Immunantwort der Milz: Regulation durch das Zentrale Nervensystem und Auswirkungen auf die Bewegungsaktivität von Ratten.  
Med. Diss. Hannover, 2001

**40. Hjelmstrom P:**

Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines.

J Leukoc Biol, 2001. 69, 331-339.

**41. Hjelmstrom P, Fjell J, Nakagawa T, Sacca R, Cuff CA, Ruddle NH:**

Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation.

Am J Pathol, 2000. 156, 1133-8.

**42. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD:**

Immunobiology: the immune system in health and disease  
4. Aufl, Churchill Livingstone, 1999

**43. Johnson J, Weiss L:**

Electron microscopic study of subcutaneous and intraperitoneal splenules in the mouse.

Am J Anat, 1989. 185, 89-100.

**44. Kalies K, Blessenohl M, Nietsch J, Westermann J:**

T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response.

J Immunol, 2006. 176, 741-749.

**45. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC:**

Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells.

J Exp Med, 2001. 193, 1373-81.

- 46. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA:**  
Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice.  
Immunity, 1997. 6, 491-500.
- 47. Koni PA, Flavell RA:**  
A role for tumor necrosis factor receptor type1 in gut-associated lymphoid tissue development: Genetic evidence of synergism with lymphotoxin beta.  
J Exp Med, 1998. 187, 1977-1983.
- 48. Kraal G, Janse M:**  
Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody.  
Immunology, 1986. 58, 665-669.
- 49. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH:**  
Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis.  
J Exp Med, 1996, 183, 1461-1472.
- 50. Kuprash DV, Alimzhanov MB, Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Drutskaya LN, Marino MW, Turetskaya RL, Anderson AO, Rajewsky K, Pfeffer K, Nedospasov SA:**  
Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice.  
Mol Cell Biol, 2002. 22, 8626-34.
- 51. LeHir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, Müller M, di Padova F, Moore M, Ryffel B, Eugster HP:**  
Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling.  
J Exp Med, 1996. 183, 2367-72.

- 52. Leenen PJ, Radosevic K, Voerman JSA, Salomon B, van Rooijen N, Klatzmann D, van Ewijk W:**  
Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover.  
J Immunol, 1998. 160, 2166-73.
- 53. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ:**  
The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.  
Cell, 2001. 104, 487-501.
- 54. Lopes-Carvalho T, Kearney JF:**  
Development and selection of marginal zone B cells.  
Immunol Rev, 2004. 197, 192-205.
- 55. Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG:**  
BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis.  
Immunity, 2000. 12, 471-481.
- 56. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyada J, Matlodian M, Cyster JG:**  
Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis.  
J Immunol, 2002. 169, 424-433.
- 57. Mackay F, Majeau GR, Lawton P, Hochman PS, Browning JL:**  
Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice.  
Eur J Immunol, 1997. 27, 2033-42.
- 58. MacLennan ICM:**  
Germinal centers.  
Annu Rev Immunol, 1994. 12, 117-139

- 59. MacLennan ICM, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DMY, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG:**  
Extrafollicular antibody responses.  
Immunol Rev, 2003. 194, 8-18.
- 60. Maini RN, Taylor PC:**  
Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis.  
Annu Rev Med, 2000. 51, 207-229.
- 61. Manzo A, Paoletti S, Carulli M, Blades MC, Barone F, Yanni G, FitzGerald O, Bresnihan Barry, Caporali R, Montecucco C, Ugucioni M, Pitzalis C:**  
Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis.  
Eur J Immunol, 2005. 35, 1347-59.
- 62. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMCO, Portela MC:**  
Regeneration of splenic autotransplants.  
Ann Hematol, 2002. 81, 622-626
- 63. Martin F, Kearney JF:**  
Marginal-zone B cells.  
Nat Rev Immunol, 2002. 2, 323-35.
- 64. Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Huang G, Kim J, Thomas DA, Nahm MH, Chaplin DD:**  
Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells.  
J Exp Med, 1997. 186, 1997-2004.

- 65. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF:**  
LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator.  
Immunity, 1998. 8, 21-30.
- 66. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG:**  
Antigen-specific memory B cell development.  
Annu Rev Immunol, 2005. 23, 487-513.
- 67. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL:**  
Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells.  
Immunity, 1997. 7, 493-504.
- 68. Mebius RE:**  
Organogenesis of lymphoid tissues.  
Nat Rev Immunol, 2003. 3, 292-303.
- 69. Mebius RE, Kraal G:**  
Structure and function of the spleen.  
Nat Rev Immunol, 2005. 5, 606-16.
- 70. Medzhitov R, Janeway C Jr:**  
Innate immunity.  
N Engl J Med, 2000. 343, 338-44.
- 71. Metcalf D:**  
Restricted growth capacity of multiple spleen grafts.  
Transplantation, 1964. 2, 387-392.
- 72. Moore MTF, Leong ASY, Drew PA, Kiroff GK, Jamieson GG:**  
Heterotopic autologous splenic grafts in rat. Morphological studies  
Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 1986. 409, 693-704.

- 73. Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG:**  
Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen.  
J Exp Med, 1999. 189, 403-12.
- 74. Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG:**  
Splenic T zone development is B cell dependent.  
J Exp Med, 2001. 194, 1649-60.
- 75. Nishikawa SI, Honda K, Vieira P, Yoshida H:**  
Organogenesis of peripheral lymphoid organs.  
Immunol Rev, 2003. 195, 72-80.
- 76. Nohroudi K:**  
Bedeutung des Lymphotoxin-beta-Rezeptors für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus am Modell der avaskulären Milztransplantation.  
Tech.-Naturw. Diss. Lübeck, 2005
- 77. Nolte MA, 't Hoen ENM, van Stijn A, Kraal G, Mebius RE:**  
Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments.  
Eur J Immunol, 2000. 30, 626-34.
- 78. Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MHJ, Kraal G, van Lier RAW, Mebius RE:**  
B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone.  
J Immunol, 2004. 172, 3620-3627.
- 79. Pabst R, Westermann J, Rothkotter HJ:**  
Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants.  
Int Rev Cytol, 1991. 128, 215-60.

- 80. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G:**  
Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.  
J Exp Med, 1996. 184, 1397-411.
- 81. Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, Pfizenmaier K, Bluethmann H, Kollias G:**  
Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94, 6319-6323.
- 82. Papadakis KA, Targan SR:**  
Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.  
Annu Rev Med, 2000. 51, 289-98.
- 83. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW:**  
Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection.  
Cell, 1993. 73, 457-67.
- 84. Picarella DE, Kratz A, Li CB, Ruddle NH, Flavell RA:**  
Insulinitis in transgenic mice expressing tumor necrosis factor beta (lymphotoxin) in the pancreas.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89, 10036-40.
- 85. Pillai S, Cariappa A, Moran ST:**  
Marginal zone B cells.  
Annu Rev Immunol, 2005. 23, 161-96.

**86. Rajewsky K:**

Clonal selection and learning in the antibody system.

Nature, 1996. 381, 751-8.

**87. Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS:**

Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor.

Immunity, 1998. 9, 71-9.

**88. Roberts CWM, Shutter JR, Korsmeyer SJ:**

Hox11 controls the genesis of the spleen.

Nature, 1994. 368, 747-749.

**89. Rose ML, Birbeck MSC, Wallis VJ, Forrester JA, Davies AJS:**

Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue.

Nature, 1980. 284, 364-6.

**90. Rüttinger L:**

Die weiße Pulpa der menschlichen Milz: Eine dreidimensionale Rekonstruktion

Med. Diss. Marburg, 2002

**91. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M, Jonsson R:**

Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome.

Arthritis Rheum, 2003. 48, 3187-201.

**92. Scheu S, Alferink J, Pötzel T, Barchet W, Kalinke U, Pfeffer K:**

Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis.

J Exp Med, 2002. 195, 1613-24.

**93. Schiebler TH:**

Lymphatisches System, Immunsystem

In: Schiebler TH, Junqueira LC, Carneiro J: Histologie

4. Aufl, 342-372, Springer-Verlag, Berlin, 1996

**94. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K:**

Anatomie

8. Aufl., 171-186, Springer-Verlag, Berlin, 1999

**95. Schneider K, Potter KG, Ware CF:**

Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes.

Immunol Rev, 2004. 202, 49-66.

**96. So T, Lee SW, Croft M:**

Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity.

Int J Hematol, 2006. 83, 1-11

**97. Steely WM, Satava RM, Brigham RA, Setser ER, Davies RS:**

Splenic autotransplantation: determination of the optimum amount required for maximum survival.

J Surg Res, 1988. 45, 327-32.

**98. Steely WM, Satava RM, Harris RW, Quispe G:**

Comparison of omental splenic autotransplant to partial splenectomy. Protective effect against septic death.

Am Surg, 1987. 53, 702-5.

**99. Stein JV, Nombela-Arrieta C:**

Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview.

Immunology, 2005. 116, 1-12.

**100. Steiniger B, Rüttinger L, Barth PJ:**

The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments.

J Histochem Cytochem, 2003. 51, 655-64.

**101. Steinman RM, Pack M, Inaba K:**

Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs.

Immunol Rev, 1997. 156, 25-37.

**102. Stopfer P, Männel DN, Hehlgans T:**

Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells.

J of Immunol, 2004. 172, 7459-7465.

**103. Tavassoli M:**

Limitation of splenic growth as studied by heterotopic splenic implants.

Blood, 1975. 46, 631-635.

**104. Tavassoli M, Sacks PV, Crosby WH:**

The effect of in vitro irradiation on the subsequent growth of ectopic splenic autoimplants.

Proc Soc Exp Biol Med, 1975. 148,780-783.

**105. Tew JG, Kosco MH, Burton GF, Szakal AK:**

Follicular dendritic cells as accessory cells.

Immunol Rev, 1990. 117, 185-211.

**106. Thalhamer J, Leitner W, Kurz ME, Liaunigg A, Seifriedsberger M, Bergmann ES, Kaindl H, Pimpl W:**

Immunoarchitecture and specific functions of splenic autotransplants at different implantation sites.

Eur Surg Res, 1992. 24, 22-36

- 107. Tkachuk M, Bollinger S, Ryffel B, Pluschke G, Banks TA, Herren S, Gisler RH, Kosco-Vilbois MH:**

Crucial role of tumor necrosis factor receptor 1 expression on nonhematopoietic cells for B cell localization within the splenic white pulp.

J Exp Med, 1998. 187, 469-477.

- 108. Tumanov AV, Kuprash DV, Lagarkova A, Grivennikov SI, Abe K, Shakhov AN, Drutskaya LN, Stewart CL, Chervonsky AV, Nedospasov SA:**

Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues.

Immunity, 2002. 17, 239-250.

- 109. Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Rybtsov SA, Koroleva EP, Takeda J, Nedospasov SA, Kuprash DV:**

Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting.

Immunol Rev, 2003. 195, 106-16.

- 110. van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Claassen E:**

Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen.

Crit Rev Immunol, 1992. 11, 337-80.

- 111. van Ewijk W, Nieuwenhuis P:**

Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp.

Experientia, 1985. 41, 199-208.

- 112. van Rooijen N, Claassen E, Kraal G, Dijkstra D:**

Cytological basis of immune functions of the spleen. Immunocytochemical characterization of lymphoid and non-lymphoid cells involved in the 'in situ' immune response.

Prog Histochem Cytochem, 1989. 19, 1-71.

- 113. Vinuesa CG, Gulbranson-Judge A, Khan M, O'Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GGB, Owen MJ, MacLennan ICM:**  
Dendritic cells associated with plasmablast survival.  
Eur J Immunol, 1999. 29, 3712-3721.
- 114. Vinuesa CG, Cook MC:**  
The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: implications for immunodeficiency and immunopathology.  
Curr Mol Med, 2001. 1, 689-725.
- 115. Vollmar A, Dingermann T:**  
Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe.  
1.Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005
- 116. von Gaudecker B:**  
Lymphatische Organe  
In: Hinrichsen KV: Humanembryologie: Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen.  
1. Aufl., 340-380, Springer-Verlag Berlin, 1990
- 117. Ware CF:**  
Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF.  
Annu Rev Immunol, 2005. 23, 787-819.
- 118. Watts TH:**  
TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses.  
Annu Rev Immunol, 2005. 23, 23-68.
- 119. Westermann J, Pabst R, Claassen E:**  
Histophysiology of autotransplanted splenic tissue.  
Res Immunol, 1991. 142, 321-5.

**120. Westermann J, Pabst R:**

Autotransplantation of the spleen in the rat: donor leukocytes of the splenic fragment survive implantation to migrate and proliferate in the host.  
Cell Tissue Res, 1997. 287, 357-64.

**121. Westermann J, Michel S, Lopez-Kostka S, Bode U, Rothkötter HJ, Bette M, Weihe E, Straub RH, Pabst R:**

Regeneration of implanted splenic tissue in the rat: re-innervation is host age-dependent and necessary for tissue development.  
J Neuroimmunol, 1998. 88, 67-76.

**122. Weyand CM, Kurtin PJ, Goronzy JJ:**

Ectopic lymphoid organogenesis: A fast track for autoimmunity.  
Am J of Pathol, 2001. 159, 787-793.

**123. Willführ KU, Westermann J, Pabst R:**

Absolute numbers of lymphocyte subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen.  
Eur J Immunol, 1990. 20, 903-11.

**124. Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, Watanabe H, Suzuki K, Asakura H, Abo T:**

The primary site of CD4-8-B220+ alphabeta T cells in lpr mice: the appendix in normal mice.  
J Immunol, 1998. 160, 2665-2674.

**125. Yoshida H, Kawamoto H, Santee SM, Hashi H, Honda K, Nishikawa S, Ware CF, Katsura Y, Nishikawa SI:**

Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells.  
J Immunol, 2001. 167, 2511-21.

**126. Zlotnik A, Yoshie O:**

Chemokines: a new classification system and their role in immunity.

Immunity, 2000. 12, 121-7.

### 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jürgen Westermann, für die interessante Themenstellung, die exzellente persönliche Betreuung und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Herrn Dr. Klaus Nohroudi für die umfangreiche Vorbereitung, seine große Hilfe bei allen fachlichen Fragen, alle Anregungen und viele persönliche Worte.

Frau Dr. Kathrin Kalies für die Unterstützung bei der Themenwahl, Integration in das gesamte Team und nette Betreuung.

Frau Lidija Gutjahr für die gute und geduldige Einweisung in histologische Arbeits- und Färbetechniken, vielen Arbeitsstunden und sehr gute Präparate.

Frau Dr. Antje Klinger für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenzmethodik und fachlichen Rat.

Herrn Dr. Uwe Speck für die Einweisung in Bildverarbeitung und Software.

Dem Institut für Anatomie, deren sämtliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter zu einem herausragenden Arbeitsklima und guter Stimmung beigetragen haben. Es hat mir große Freude bereitet, ein Teil dieser Arbeitsgemeinschaft zu sein und in diesem Institut meine Doktorarbeit schreiben zu dürfen.

Meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und die Doktorarbeit ermöglichen, mich in jeder Hinsicht unterstützen und motivieren.

## 8 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Karola Klaperski  
Geburtstag: 21. September 1980  
Geburtsort: Wuppertal  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1987-1991: Grundschule GGS Wupper, Radevormwald  
1991-2000: Röntgengymnasium, Remscheid-Lennep  
1997-1998: High-School, Michigan, USA (6 Monate)  
Mai 2000: Abitur

## Studium:

Oktober 2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
September 2002: Ärztliche Vorprüfung  
August 2003: 1. Staatsexamen  
August 2005: 2. Staatsexamen  
Famulaturen: Unfallchirurgie, Viszeralchirurgie, Anästhesiologie, Pädiatrie, Pädiatrie/USA, Radiologie/Niederlande

Zeitlicher Rahmen der  
Dissertation:

Okt. 2002 – April 2003 Vorbereitender Kurs zum Thema Immunologie  
August 2003 Themenfestlegung, Beginn der Literaturrecherche  
Okt. 2003 – Sept. 2005 Versuche, Laborarbeit und Datenerfassung  
Okt. 2005 – Juli 2006 Schriftliche Ausarbeitung, Abschluss der Arbeit