

Aus der Universität zu Lübeck

Institut für Anatomie

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Westermann

**Bedeutung des Lymphotoxin- β -Rezeptors für die Bildung
von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus
am Modell der avaskulären Milztransplantation**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Klaus Nohroudi

aus Wuppertal

Lübeck, 2005

Inhalt

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	9
2.1. Materialien	9
2.1.1. Chemikalien, Medien und Kits.....	9
2.1.2. Operationsmaterialien	11
2.1.3. Glas- und Plastikmaterialien	12
2.1.4. Geräte	13
Tiere und Haltungsbedingungen	14
Operationen	15
2.1.5. Hauttransplantation	15
2.1.6. Milztransplantation	17
2.2. Immunstimulation mit Schaferythrozyten (SRBC)	18
2.3. Injektion von Blutplasma	18
Untersuchung des Milzgewebes	19
2.3.1. Leukozytenzahl	19
2.3.2. Durchflusszytometrie.....	19
2.3.3. Immunhistologie	22
2.4. Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression	23
Statistische Auswertung	27
3 Ergebnisse	28
3.1. Regeneration von transplantiertem Milzgewebe	28
3.1.1. Kinetik der Milzregeneration.....	29
3.1.2. Erfolgreiche Regeneration von lymphatischem Gewebe.....	35
3.1.3. Gewicht und Leukozytenzahl	35
3.1.4. Lymphozyten-Subpopulationen.....	36
3.1.5. Lymphatische Struktur und Funktion.....	40

3.2. Zusammensetzung und Funktion von Milzgewebe im adulten Organismus sind abhängig von LTβR auf Stromazellen.....	44
3.2.1. C57BL/6 und LTβR ^{-/-} -Tiere sind isogen.....	44
3.2.2. MZ B-Zellen aber nicht NK-Zellen sind abhängig von LTβR in der Milz.....	45
3.2.3. Kompartimente und Keimzentren sind abhängig von LTβR in der Milz.....	48
3.3. Der Lymphotoxin-β-Rezeptor ermöglicht und begrenzt die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus.....	52
3.4. Hemmung der Milzregeneration durch LTβR	54
3.4.1. Hemmung durch LTβR in eigener Milz.....	54
3.4.2. Hemmung durch LTβR in Milz und Lymphknoten	55
3.4.3. Das Endgewicht des Transplantats ist unabhängig von der transplantierten Menge	58
3.4.4. Zugabe von LTβR exprimierendem Gewebe führt zum Rückgang von etabliertem lymphatischem Gewebe	60
3.4.5. Hemmung wird nicht über LTβR exekutiert	63
4 Diskussion.....	66
5 Zusammenfassung	82
6 Literatur	83
Anhang	96
Abkürzungen	99

1 Einleitung

Unser Körper wird täglich mit Mikroorganismen und Parasiten konfrontiert, deren ungehinderte Ausbreitung zu schweren Krankheitssymptomen und letztlich zum Tode führen würde. Bestandteile der angeborenen Immunabwehr (z.B. Makrophagen) erkennen für Mikroorganismen spezifische Moleküle und bilden damit die erste Verteidigungslinie des Körpers, die die Ausbreitung von Krankheitserregern verzögert und die adaptive Immunantwort einleitet (Übersicht in 1). Durch diese werden T- und B-Lymphozyten aktiviert, die sich durch eine hohe Spezifität für die Erreger auszeichnen und darüber hinaus ein immunologisches Gedächtnis bilden, wodurch künftige Infektionen mit dem gleichen Erreger vor Ausbruch der Krankheit eliminiert werden (Übersicht in 2). Bei der Induktion, Aufrechterhaltung und Regulation von Immunantworten spielen Zytokine eine entscheidende Rolle (3), für deren Produktion insbesondere T-Lymphozyten von großer Bedeutung sind (4). Interleukin (IL)-2, IL-12 und Interferon (IFN)- γ sind dabei typische Mediatoren der zellvermittelten T-helfer (T_H) 1-Antwort, während IL-4 und IL-10 die T-helfer (T_H) 2-Antwort und damit die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten fördern (5). IL-15 und TGF (Tumor Growth Factor)- β werden in lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben exprimiert. Während IL-15 essentiell für das Überleben einer Subpopulation von T-Gedächtniszellen und der Natürlichen Killer (NK)-Zellen ist (6), hilft die regulatorische Aktivität von TGF- β , das Auftreten von Autoimmunerkrankungen durch überschießende Immunreaktionen zu vermeiden (7). Die hohe Spezifität der Lymphozyten für einzelne Antigene des Erregers hat allerdings den Nachteil, dass nur etwa einer von 10 bis 100.000 Lymphozyten diese zu Beginn der Infektion erkennt. Das Zusammentreffen von Antigen und dafür spezifischen Lymphozyten gewährleisten die sekundär lymphatischen Organe (im weiteren Verlauf auch lymphatisches Gewebe genannt), die strategisch im Körper positioniert sind. In Lymphknoten und Peyerschen Platten werden Antigene von Erregern, die über die Haut, den Respirations- oder den Darmtrakt in den Körper eingedrungen sind, durch Antigen präsentierende Zellen konzentriert, während in der Milz die Antigene aus dem Blut gesammelt werden (Übersichten in 8; 9). Lymphozyten wandern auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen ständig durch die lymphatischen Organe, die damit das Zentrum der adaptiven Immunantwort bilden und einen umfassenden Schutz gegen eindringende Pathogene sicherstellen (10; 11). Zur Erfüllung dieser Aufgabe muss lymphatisches Gewebe eine Umgebung bereitstellen, die es

den Zellen des Immunsystems ermöglicht, miteinander zu interagieren und somit eine spezifische Antwort gegen die Pathogene zu generieren. Die spezielle Mikroarchitektur der verschiedenen lymphatischen Organe ist darauf ausgerichtet, den Transport und die Präsentation von Antigenen und nachfolgend die Aktivierung von antigenspezifischen T- und B-Lymphozyten zu ermöglichen (Übersichten in 2; 12). Stromazellen und Kollagenfasern, die von Fibroblasten gebildet werden, formieren das Grundgerüst der lymphatischen Organe (13; 14). Innerhalb dieses Gerüsts sind die B-Zellen in Follikeln organisiert, die um das T-Zell-Areal in Lymphknoten (Paracortex), Peyerschen Platten (Interfollikularregion) und Milz (periarterioläre Lymphozytenscheide, PALS) angeordnet sind, wodurch die lymphatischen Organe in Kompartimente gegliedert werden (Übersichten in 8; 15). Verschiedene Subpopulationen von Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen sind an den jeweils speziellen Eintrittsstellen in lymphatische Gewebe positioniert, um Antigene aufzunehmen und den Lymphozyten zu präsentieren (Übersichten in (16-18)). Follikulär Dendritische Zellen (FDCs) sind spezialisierte Stromazellen im B-Zell-Areal, die für lange Zeit Immunkomplexe auf ihrer Oberfläche binden können und an der Bildung von Keimzentren und der Affinitätsreifung von Antikörperantworten beteiligt sind (19; 20). Die Induktion einer adaptiven Immunantwort erfordert das Zusammentreffen von antigenspezifischen T-Zellen und DCs sowie nachfolgend die Stimulation antigenspezifischer B-Zellen durch aktivierte T-Zellen, um eine Antikörperantwort zu generieren (Übersicht in 2). Die hierfür erforderliche Wanderung von Antigen präsentierenden Zellen und Lymphozyten durch die Kompartimente wird durch chemotaktische Proteine (Chemokine) gesteuert (Übersicht in 21). Die Stromazellen der verschiedenen Kompartimente produzieren unterschiedliche Chemokine und durch differentielle Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren auf Lymphozyten und DCs werden diese in das entsprechende Kompartiment geleitet und der geordnete Ablauf der Immunantwort gewährleistet (Übersichten in 12; 22; 23). Das Fehlen lymphatischer Organe oder die Zerstörung ihrer Mikroarchitektur führt daher zu einer starken Beeinträchtigung der Immunantwort (24; 25). Die Effektivität, mit der antigenspezifische Immunreaktionen in lymphatischem Gewebe generiert werden, erweist sich dagegen bei Autoimmunerkrankungen als fatal. So entwickeln sich bei rheumatoider Arthritis (RA) (26), insulinabhängigem Diabetes mellitus (IDDM) (27), dem Morbus Basedow (Graves Disease, GD) (28) oder dem Sjögren-Syndrom (29) im betroffenen Organ Strukturen, die denen der sekundär lymphatischen Organe gleichen und deshalb ektopes lymphatisches Gewebe

genannt werden (30). Je mehr Ähnlichkeit die Infiltrationen der autoreaktiven Zellen dabei mit der Struktur von lymphatischem Gewebe aufweisen, desto schwerer ist das beobachtete Krankheitsbild (Übersichten in 31; 32). Es ist also von größter Bedeutung, sowohl die Entwicklung der lymphatischen Organe in der Ontogenese als auch die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus zu verstehen, um Strategien zu entwickeln, dieses unerwünschte lymphatische Gewebe zu beseitigen, ohne die für eine effektive Immunabwehr benötigten Organe zu schädigen.

Die Entstehung der lymphatischen Organe während der Individualentwicklung wurde in den letzten Jahren intensiv studiert und ist inzwischen auf zellulärer und molekularer Ebene gut verstanden (Übersichten in 33; 34). Liganden und Rezeptoren der TNF Superfamilie rückten als kritische Mediatoren der Entstehung von lymphatischem Gewebe in den Mittelpunkt (Übersichten in 35; 36). Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass der Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β R) und die durch ihn regulierten Gene die zentrale Achse in der Organogenese von Lymphknoten und Peyerschen Platten bildet (37-39). Und obwohl die Organanlage der Milz von anderen Genen gesteuert wird (40), ist die Ausbildung ihrer lymphatischen Strukturen ebenfalls an LT β R gekoppelt (37; 41; 42). Grundlage dieser Regulation ist die differentielle Expression des LT β R und seines Hauptliganden, dem LT $\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimer Lymphotoxin- β (LT β) (Übersicht in 36). Der LT β R wird in lymphatischen Organen nur von nicht-hämatopoietischen Stromazellen sowie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs) und Mastzellen exprimiert, während LT β nur membrangebunden auf lymphoiden Zellen vorkommt (43-45). Die Entwicklung beginnt mit der Bindung von LT β -exprimierenden ‚lymphoid tissue inducer cells‘ an LT β R auf ‚lymphoid tissue organizer cells‘ (Abbildung 1A) (33). Für die Bildung von lymphatischem Gewebe ist nachfolgend die hierdurch in diesen Stromazellen induzierte Produktion von Chemokinen entscheidend (38). Diese Chemokine, die auch bei der Migration im Rahmen der Immunantwort benötigt werden (siehe oben), leiten die Lymphozyten in die sich entwickelnden lymphatischen Organe und steuern nachfolgend den Aufbau der Mikroarchitektur. Die typische Kompartimentierung innerhalb des lymphatischen Gewebes kommt durch Stromazellen zustande, die unterschiedliche Chemokine produzieren und B- und T-Lymphozyten, die die entsprechenden Chemokinrezeptoren in unterschiedlicher Weise exprimieren (Übersichten in 12; 46; 47). Die Stromazellen des T-Zell-Areals produzieren CCL19 und CCL21, die beide an CCR7 binden, der sich auf T-Lymphozyten

findet (48; 49). Im Follikel produzieren die Stromazellen hingegen CXCL13, das an CXCR5 bindet, der auf naiven B-Zellen exprimiert wird (50; 51). So werden über Chemokingradienten die T- und B-Zellen in das lymphatische Gewebe und anschließend in ihr entsprechendes Kompartiment geleitet (Abbildung 1B) (22).

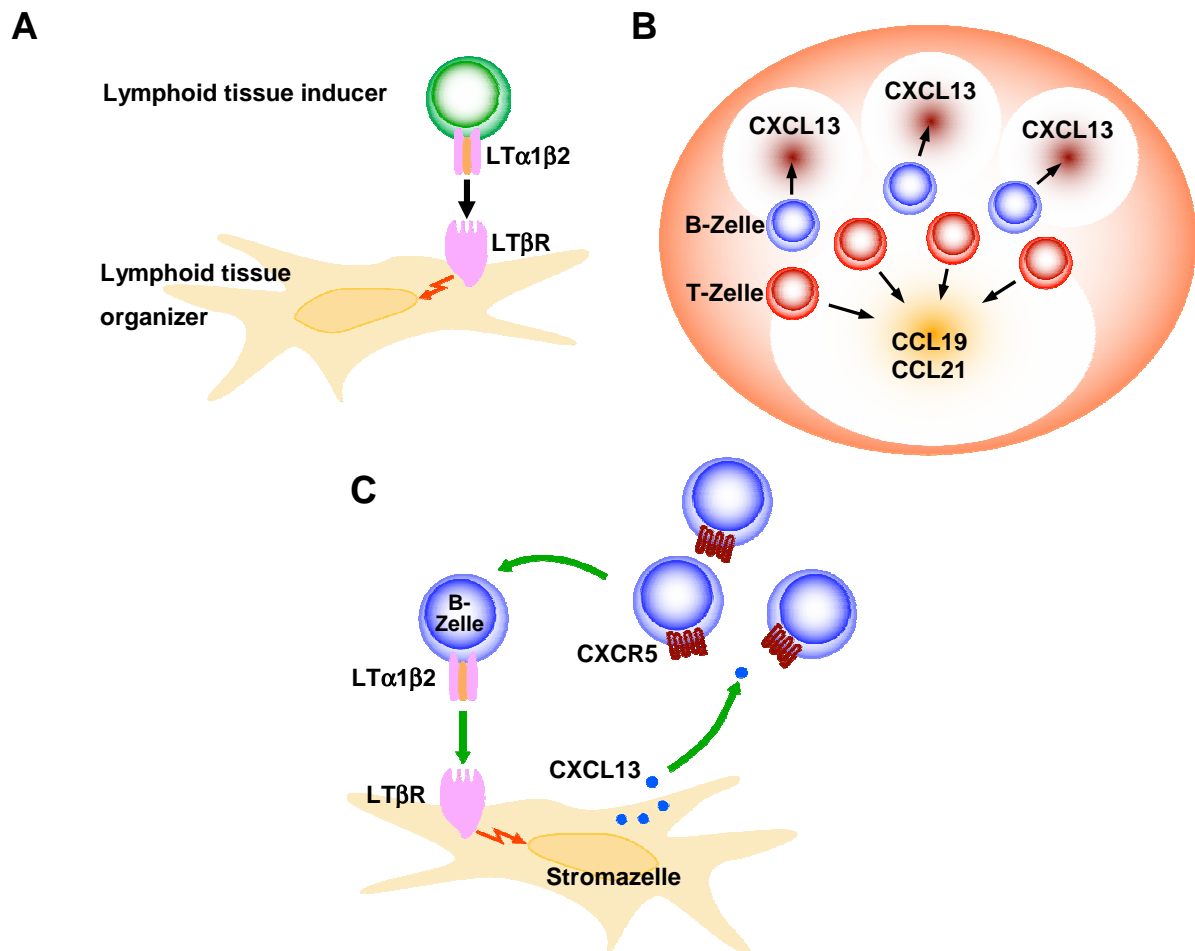


Abbildung 1: Bildung von Kompartimenten in lymphatischen Geweben

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 hierdurch zur Produktion von Chemokinen angeregt werden.

B) Durch differentielle Produktion von Chemokinen durch die Stromazellen nach Ligation des $LT\beta R$ wandern T- und B-Zellen in verschiedene Kompartimente.

C) Die durch Ligation von $LT\beta$ auf den Stromazellen im B-Zell-Areal induzierte Ausschüttung von $CXCL13$ lockt $CXCR5^+$ B-Zellen an und induziert die Expression von $LT\beta$, wodurch es zu einer positiven Rückkopplung kommt.

Im Follikel wird durch die Bindung von $LT\beta$ auf B-Zellen an den $LT\beta R$ auf den Stromazellen eine positive Rückkopplung in Gang gesetzt. Die induzierte Ausschüttung von

CXCL13 lockt nicht nur weitere B Lymphozyten an, sondern erhöht gleichzeitig die Expression von LT β auf diesen Zellen, wodurch sich das System selbst verstärkt und die Follikelbildung vorantreibt (Abbildung 1C) (52). Die Erkenntnisse zur Organogenese der sekundär lymphatischen Organe stammen überwiegend aus Studien an Knockout-Mäusen (Übersichten in 35; 46). Verschiedene Untersuchungen haben LT β auf B Lymphozyten als den entscheidenden Liganden für LT β R auf den Stromazellen in der Milz identifiziert (53; 54). Die zentrale Rolle des Lymphotoxin- β -Rezeptors wurde an LT β R^{-/-}-Mäusen deutlich, die weder Lymphknoten noch Peyersche Platten besitzen und deren lymphatische Strukturen in der Milz grundlegende Defekte aufweisen. Die Trennung von T-Zell-Areal (PALS) und Follikel ist aufgehoben und T- und B-Lymphozyten liegen stattdessen in starker Durchmischung vor. Die für die Milz typische Marginalzone mit einem Ring aus metallophilen Makrophagen um T- und B-Zell-Areal ist nicht vorhanden. Die strukturellen Defizite setzen sich bei der zellulären Zusammensetzung und Funktion fort. Natürliche Killer (NK)-Zellen sind zu über 90 Prozent reduziert und Marginalzonen (MZ) B-Zellen sowie Follikulär Dendritische Zellen (FDCs) fehlen. Nach Antigenstimulation bilden sich keine Keimzentren und die Antikörperantwort ist stark eingeschränkt (37; 55).

Dem profunden Wissen über die Ontogenese der lymphatischen Organe stehen vergleichsweise wenige Daten über die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus gegenüber. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen aber, dass die Erkenntnisse über die Individualentwicklung nicht einfach auf den adulten Organismus übertragen werden können. So stellen die in LT β R^{-/-}-Mäusen beobachteten Effekte eine Mischung aus gestörter Ontogenese und Homöostase dar (Übersicht in 56). In früheren Studien wurde versucht, über die Injektion oder transgene Expression von antagonistischen und agonistischen Fusionsproteinen sowie die Transplantation von Knochenmark, die Prozesse im adulten Organismus von der Ontogenese zu trennen, mit teilweise mehrdeutigen Ergebnissen (Übersicht in 57). Bei der Blockade des LT β R-Signals mit Antikörpern oder Fusionsproteinen zu verschiedenen Zeitpunkten der Individualentwicklung, erwies sich die Entstehung der Lymphknoten und Peyerschen Platten als ein Prozess, der nur während der Embryonalentwicklung in begrenzten Zeitfenstern stattfindet und nach der Geburt nicht mehr induziert oder unterdrückt werden kann (39; 41; 42; 58). Die Befunde für die Etablierung und den Erhalt der Mikroarchitektur lymphatischer Organe sind dagegen sehr widersprüchlich. Untersuchungen mit Fusionsproteinen ermittelten ein sehr kurzes

Zeitfenster am Tag der Geburt, in dem das LT β R-Signal benötigt wird, damit sich die Stromazellen in der Milz so differenzieren, dass sich T- und B-Lymphozyten in PALS und Follikel organisieren können (54). Die Unterbrechung des Signals vor diesem Zeitpunkt hatte keine Auswirkungen und danach führte die Blockade von LT β R nur zu einer temporären Durchmischung von T- und B-Zell-Areal (41; 54; 59). Insbesondere die Follikel mit den FDCs waren demnach eine dynamische Struktur, deren Erhalt ein ständiges Signal von LT β auf B-Zellen über den LT β R auf den Stromazellen benötigte (60). Andererseits ergaben sich bei der Transplantation von Knochenmark ganz andere Befunde. Die gestörte Milzarchitektur von LT $\beta^{-/-}$ -Tieren konnte im adulten Organismus durch Transplantation von LT β -positivem Knochenmark vollständig wiederhergestellt werden, was das beschriebene Zeitfenster für die Differenzierung der Stromazellen in Frage stellt (61). Darüber hinaus wurde nach der Transplantation von Lymphotoxin-defizientem Knochenmark in Wildtyp-Tiere, in einem Fall auch nach 6 Monaten noch eine klare Abgrenzung von T- und B-Zell-Areal in der Milz berichtet, die sich in anderen Versuchen nicht zeigen ließ (60; 62). Die Funktion des Lymphotoxin- β -Rezeptors im adulten Organismus ist also nach wie vor nicht eindeutig geklärt, denn eine klare Abgrenzung der Prozesse von Ontogenese und Aufrechterhaltung der lymphatischen Organe war mit diesen Modellen nicht möglich. Detaillierte Kenntnisse über die Abläufe im adulten Organismus sind aber dringend notwendig, um die Neubildung von lymphatischem Gewebe im Rahmen von Autoimmunerkrankungen besser zu verstehen und Behandlungsstrategien zu entwickeln. Der Lymphotoxin- β -Rezeptor spielt mit den durch ihn induzierten Chemokinen auch bei der Entwicklung von ektopem lymphatischem Gewebe eine wesentliche Rolle (Übersichten in 31; 32; 63). Mäuse, die transgen die entsprechenden Chemokine oder Lymphotoxin unter der Kontrolle des Ratteninsulinpromotors (RIP) exprimierten, sollten Aufschluss über deren Rolle in diesem Prozess geben. Dabei wurde einmal die Expression von CCL19, CCL21 oder CXCL13 im nichtlymphatischen Gewebe als Induktor für die Neogenese von lymphatischem Gewebe beschrieben, wobei LT β nur eine Rolle für dessen Organisationsgrad zukam (64; 65). In anderen Versuchen war es die erzwungene Expression von LT β , die zur Produktion von Chemokinen und Bildung lymphatischer Strukturen in nichtlymphatischen Geweben führte (66). Da in allen Fällen die Bildung von lymphatischem Gewebe induziert wurde, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, welches Molekül für die Initialisierung des Prozesses

verantwortlich ist. Schließlich ergab eine Studie an Patienten mit rheumatoider Arthritis, dass die Expression von LT β und CXCL13 im erkrankten Gewebe etwa gleich gute Indikatoren für differenziertes, ektopes lymphatisches Gewebe mit Keimzentren und FDCs sind (26).

Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus zu untersuchen und dabei die Rolle einzelner Moleküle auf lokaler Ebene zu analysieren. Dies war mit den bisher beschriebenen Modellen nur unzureichend möglich. Studien an Knockout-Mäusen sind ein wirksames Instrument, um die Funktion einzelner Moleküle zu untersuchen. Allerdings lassen sich hier die Folgen für die Ontogenese und den adulten Organismus nicht differenzieren. Da sich in LT β R^{-/-}-Tieren zum Beispiel die Lymphknoten nicht entwickeln, kann hier auch nicht untersucht werden, welche Funktion der Lymphotoxin- β -Rezeptor für deren Funktion im adulten Organismus hat. Die transgene Expression von Fusionsproteinen wie LT β R-Fc oder Chemokinen wie CCL21 kann den Zustand der Homöostase nur unzureichend wiedergeben, da sie sich jeglicher Regulation durch endogene Faktoren entzieht und damit Effekte hervorrufen kann, die unter Bedingungen der Homöostase nicht auftreten würden. Knochenmarktransplantationen und die konstitutive Expression oder Applikation von zum Beispiel LT β R blockierenden Fusionsproteinen beeinflussen den gesamten Organismus und können so die lokalen Effekte überlagern. Ein geeignetes Modell müsste die lokal begrenzte, gezielte Aus- oder Einschaltung einzelner Moleküle zulassen, ohne dauerhaft in die Homöostase eingreifen zu müssen. Diese Bedingungen sind zum Beispiel bei Organtransplantationen erfüllt, weil einzelne Gewebe von genetisch defizienten Tieren auf Wildtyp-Tiere übertragen, in ihrer Regeneration ohne weitere Eingriffe über die Zeit verfolgt werden können. Es ist schon lange bekannt, dass die avaskuläre Transplantation von Milzgewebe zur Regeneration von intaktem lymphatischem Gewebe führt (67). Das immunologische Kompartiment der Milz, die Weiße Pulpa mit Follikeln und PALS, stellt dabei nur einen Teil des Organs dar. Sie ist umrahmt von einem Ring aus metallophilen Makrophagen und der Marginalzone (MZ), in der sich die für die Milz typischen MZ B-Zellen befinden. Dieses lymphatische Gewebe ist eingebettet in die Rote Pulpa, in dessen Sinusoiden überalterte Erythrozyten von Makrophagen phagozytiert werden (17; 68). Detaillierte Untersuchungen haben ergeben, dass das transplantierte Gewebe zuerst nekrotisch wird und anschließend von außen nach innen regeneriert, wobei zuerst Rote und dann Weiße Pulpa entsteht (Übersicht in 69).

In einem Zeitraum von 8 Wochen kommt es nach anfänglichem Verschwinden der geordneten Strukturen zur Wiederherstellung aller Kompartimente und der immunologischen Funktionalität des Milzgewebes (70; 71). Die avaskuläre Milztransplantation stellt deshalb ein geeignetes Modell zur Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus dar. Die Transplantation von Milzgewebe aus Knockout-Mäusen bietet zudem die Möglichkeit, den Einfluss einzelner Moleküle auf lokaler Ebene zu untersuchen.

Trotz der erwiesenen zentralen Bedeutung des Lymphotoxin- β -Rezeptors für die Ontogenese von sekundär lymphatischen Organen ist seine Funktion für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus umstritten. Unsere Hypothese war, dass der LT β R für diesen Prozess essentiell ist und ohne seine Beteiligung nicht nur in der Ontogenese, sondern auch im adulten Organismus kein lymphatisches Gewebe entstehen kann. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Modells der intraperitonealen, avaskulären Milztransplantation diese Hypothese anhand der folgenden Fragestellungen überprüft:

1. In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass der zeitliche Verlauf der Regeneration stark variieren kann (70; 71). Durch eine Kinetik sollte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Regeneration in unserem Modell abgeschlossen war.
2. Der Vergleich von Gewicht, zellulärer Zusammensetzung und histologischer Struktur von Milz und Transplantat sowie der Basisexpression der Zytokine IL-2, -4, -10, -12, -15, IFN- γ und TGF- β in den einzelnen Kompartimenten sollte zeigen, in wie weit ein vollständig regeneriertes Milztransplantat einer nativen Milz entsprach und somit die Bildung von lymphatischem Gewebe widerspiegelte.
3. Die Transplantation von Milzgewebe aus Wildtyp (WT)-Mäusen in LT β R^{-/-}-Mäuse sollte klären, ob die in der Milz von Knockout-Tieren reduzierten NK-Zellen sowie die nicht vorhandenen MZ B-Zellen, FDCs und Keimzentren auf die fehlende Expression des Rezeptors in der Milz des adulten LT β R^{-/-}-Tieres zurückzuführen oder durch die Ontogenese festgelegt sind.
4. Durch Überkreuz-Transplantation von Milzgewebe zwischen WT- und LT β R^{-/-}-Tieren sollte schließlich untersucht werden, welche Bedeutung der LT β R im transplantierten Gewebe für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus hat und ob die Expression von LT β R in anderen Geweben des Empfängers die Bildung von lymphatischem Gewebe beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Medien und Kits

7-Aminoactinomycin D (7-AAD),	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Aceton, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APAAP-Substrat	2 % (v/v) N,N-Dimethylformamid, 0,02 % Naphtol AS-MX Phosphat, 0,1 mM Levamisole in 0,1 M TRIS, pH 8,2
Atropinsulfat-Lösung, 0,5 mg/ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Avidin-Peroxidase-Komplex (EXTRAVIDIN®-Peroxidase)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Deoxyribonuklease I-Kit	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC (v/v) in Aqua bidest.
Diaminobenzidin (DAB), (Liquid DAB + Substrate)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
K ₂ EDTA	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
dNTP-Mix (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Einbettmedium, Tissue-Tek®	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Eindeckmittel, AQUATEX®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, 70%, 75 %, 100 %	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Puffer	1 % (w/v) BSA, 0,01 % (w/v) NaN ₃ in PBS
Fast Blue BB, Fast Red TR	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hammelblut in Alsever Puffer, 50 %	Labor Dr. Merk & Kollegen, Ochsenhausen, Deutschland
HCl, 25%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid, Ketanest®S	Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland
KHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Levamisole	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Mastermix für reverse Transkription	4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix, 250 ng Random-Primer in 1 µl DEPC-H ₂ O
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mausserum, normal	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9%, steril	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
NaN ₃	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
N,N-Dimethylformamid,	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
NH ₄ CL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Saline (PBS) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

PFA 4%	4 % PFA in PBS
Primer und TaqMan®-Sonden	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Random-Primer (hexamers_rand)	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Reverse Transkriptase (BD PowerScript™)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI-1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Schwinzerlyse-Reagenz	0,83 % (w/v) NH ₄ Cl, 0,1 % KHCO ₃ (w/v) 0,01 % (w/v) K ₂ EDTA in Aqua bidest.
Streptavidin-Allophycocyanin(APC)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
2x TaqMM, qPCR® Mastermix Plus	Eurogentec, Seraing, Belgien
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05 % (w/v) Tween®20, 0,86 % (w/v) NaCl in Aqua bidest., pH 7,6
Tris(hydroxymethyl)aminomethan,	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster, Deutschland
Toluidinblau-Lösung (0,1 %)	0,1 % Toluidinblau (w/v), 1 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O
Tween®20	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Xylazinhydrochlorid, 2 % (Rompun®)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

2.1.2. Operationsmaterialien

Einmalskalpelle, Klinge 11	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen, 1 ml, steril (BD Plastipak™)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fixierpflaster (Leukoplast®)	BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland

Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm (BD Microlance™ 3)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl	Nadelhalter, fein, Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette
Nahtmaterial (SERAPID®), 5/0, DSS-13; Polyglykolsäure	Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland
Operationstücher, steril (Foliodrape®)	P. Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Sprühpflaster (BAND-AID®)	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Tupfer, 10 x 10 cm, steril (Vliwasoft®)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland

2.1.3. Glas- und Plastikmaterialien

Falcon®-Gefäße, 5, 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Glasröhren (Innendurchmesser: 6 mm, Länge: 5,5cm), DURAN®	Schott AG, Mainz, Deutschland
Mikrotiterplatten, Polystyrol, 96 Wells, Flachboden	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
96 Well Multiply®-PCR-Platten, Polypropylen mit Klebefolie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5 und 1,5 ml, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Folienobjektträger, PALM® MembraneSlides, Polyethylenaphthalat, 1mm	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland
Petrischalen, steril	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.4. Geräte

Real-Time PCR, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Durchflusszytometer, FACSCalibur™, 4CA ; 4 Farben Standardkonfiguration	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrischer Koagulator (Spark-Wave Typ 440-A)	Radionics Incorporated, Burlington, Massachusetts, USA
Mikrodissektion, PALM® MicroBeam mit PALM® RoboSoftware	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Serienschnittmikrotom, CM300 Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Jung Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuumkonzentrations-Zentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage, OHAUS® Adventurer™ AR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Giessen, Deutschland
Waage, Kern 440-51N, Messgenauigkeit 1 g	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, MiniSpin®Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tiere und Haltungsbedingungen

Für alle Versuche wurden Labormäuse vom Stamm C57BL/6NCrIBR, C57BL/6Ly5.1 und Lymphotoxin- β -Rezeptor-Knockout (LT β R^{-/-}) (37) verwendet. Von allen Stämmen wurden jeweils 5 Zuchtpaare von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in der spezifisch pathogenfreien Barrierehaltung der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck eingestallt. Alle Versuchstiere stammten aus Nachzuchten dieser Zuchtpaare. Jungtiere wurden 21 bis 25 Tage nach der Geburt von den Elterntieren, nach Geschlechtern getrennt, abgesetzt. Einzelhaltung wurde konsequent vermieden, indem Gruppen von 3 bis 6 Tieren pro Käfig gebildet wurden. Durch Lochmarkierung der Ohren, die den Tieren beim Absetzvorgang verabreicht wurde, war jedes Tier eines Käfigs eindeutig zu identifizieren. Die Markierung erfolgte mittels einer in der institutseigenen Werkstatt hergestellten Lochzange aus Edelstahl, mit der kreisrunde Löcher von 1,5 mm Durchmesser in das Außenohr gestanzt wurden. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 56 und 84 Tage alt und es wurden Männchen und Weibchen zu gleichen Teilen verwendet. Bei allen Transplantationen wurde Gewebe nur zwischen gleichgeschlechtlichen Tieren verpflanzt. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit einem Abdeckgitter aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Die Einstreu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt und standardisiertes Pelletfutter (altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) sowie Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. In den vollklimatisierten Räumen wurde bei einer Temperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sowie einer relativen Luftfeuchte von $60 \pm 5\%$ ein künstlicher Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden (Hellphase: 06:00 – 18:00 Uhr) vorgegeben.

Labormäuse vom Stamm Balb/cAnNCrIBR wurden von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, in die oben beschriebene Barrierehaltung eingestallt und nach einer Eingewöhnungszeit von 14 Tagen im Rahmen der Hauttransplantationen eingesetzt.

Operationen

Alle chirurgischen Eingriffe wurden in den Räumen der spezifisch pathogenfreien Tierhaltung durchgeführt. Injektionen wurden mit sterilen Einwegspritzen verabreicht und während der Operation lagen die Tiere auf sterilen Operationstüchern. Die für die Operationen benötigten Instrumente wurden vor jedem Operationstag autoklaviert und zwischen den Eingriffen an verschiedenen Tieren mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Vor den operativen Eingriffen wurden die Tiere gewogen und anschließend die Narkoselösung intraperitoneal injiziert. Jedem Tier wurde dabei eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (50 mg/kg KG), Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg KG) und Atropinsulfat (25 µg/kg KG) in steriler Kochsalzlösung (0,9 %) verabreicht, die nach 3 Minuten zur vollständigen Narkose führte. Nach Abschluss der Operationen wurde das Aufwachen aller Tiere abgewartet.

2.1.5. Hauttransplantation

Die Hauttransplantationen wurden nach der Methode von Bailey und Usama (72), modifiziert nach Hedrich (73), durchgeführt. Das betäubte Tier wurde mit der Ventralseite nach unten auf das sterile Tuch gelegt und der Schwanz mit 70 %igem Ethanol abgerieben. Mit einem Einwegskalpell wurden dann zwei rechteckige Stücke (Länge ca. 0,5 cm, Breite ca. 0,2 cm) der Schwanzhaut abgehoben. Dabei reichte die Schnitttiefe gerade so weit, dass die unter der Haut verlaufenden Gefäße nicht verletzt wurden (Abbildung 2, links). Die Hautstücke wurden bis zur Transplantation in Petrischalen mit steriler Kochsalzlösung zwischengelagert.

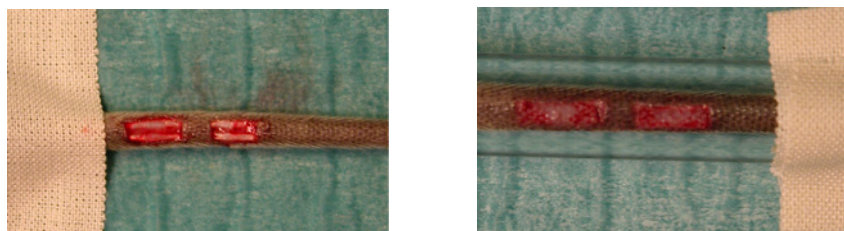


Abbildung 2: Transplantation von Schwanzhaut bei Mäusen

Links: Dorsalansicht des Schwanzes einer C57BL/6-Maus mit den präparierten Betten für die Transplantation. Deutlich sichtbar ist die dorsal verlaufende Arterie.
Rechts: Gleiches Tier wie im linken Bild mit aufgetragenen Transplantaten einer Balb/c-Maus und der über den Schwanz geschobenen Glasröhre, die mit Fixierpflaster am distalen Ende befestigt ist.

In die beim Empfänger durch die oben beschriebene Exzision entstandenen Betten wurden die Hautstücke der Spender so eingebracht, dass die Haarwuchsrichtung der Transplantate der der eigenen Schwanzhaare des Empfängertieres entgegengesetzt war. Anschließend wurden die Transplantate mit Sprühpflaster abgedeckt. Nach Trocknung des Sprühpflasters wurde eine Glasröhre über den Schwanz bis zur Schwanzbasis geschoben und mit Fixierpflaster am heraustretenden Schwanzende befestigt (Abbildung 2, rechts). Die Enden der Glasröhre waren dabei so abgeflammt, dass sie nicht in die Haut schnitten und die Transplantate nicht mit dem Glas in Berührung kamen. Nach 4 Tagen wurden die Glasröhren entfernt und mit der Beurteilung der Transplantate begonnen.

Beurteilung der Hauttransplantate

Zur Beurteilung, ob das Transplantat abgestoßen oder angenommen wurde, wurde in den ersten 20 Tagen täglich und im Anschluss einmal wöchentlich bis zum Ablauf von 100 Tagen eine Kontrolle der Tiere und eine Überprüfung der Transplantate durchgeführt. Die Beurteilung wurde nach der von Hedrich (73) entwickelten Tabelle vorgenommen:

Tabelle 1: Scoring-Tabelle nach Hedrich

Score	Größe	Erscheinungsbild
0	keine Beurteilung möglich	keine Beurteilung möglich
1	ursprüngliche Größe	volle Behaarung
2	weniger als 25 % reduziert	reduzierte Behaarung
3	mehr als 25 % reduziert	schuppig, abblätternd
4	dunkelrote Punkte und feucht mit serösem Exudat, oder trockene Kruste	Haare vorhanden, zusammenklebend
5	vernarbt	keine Haare

Zur Beurteilung wurde je ein Wert für die Größe und das Erscheinungsbild ermittelt und somit ergab sich nach dem Muster 1/1 (ursprüngliche Größe und volle Behaarung) ein Gesamtwert für jedes Transplantat. Bewertungen von 1/1, 1/2, 1/3, 2/1 oder 2/2 bedeuteten keine Abstoßungsreaktion. Bewertungen von 2/3, 2/5, 3/1, 3/2, 3/3 oder 3/5, indizierten

eine chronische Abstoßung, 4/4 die akute Phase und 5/5 das Endstadium der Abstoßung. Ein Transplantat wurde als endgültig angenommen gewertet, wenn nach 100 Tagen keine Abstoßungsreaktion erkennbar war.

2.1.6. Milztransplantation

Das betäubte Tier wurde mit der Ventralseite nach oben auf das sterile Tuch gelegt und der Bauch mit 70 %igem Ethanol eingesprüht. Sodann wurde die Haut mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und mit einer Schere etwa 1,5 cm unterhalb des Sternums ein kleiner Einschnitt in der Medianlinie gesetzt. Durch die Öffnung in der Haut konnte nun die Bauchmuskulatur mit Peritoneum gegriffen und ebenfalls eingeschnitten werden. Dieser Einschnitt wurde, Haut und Bauchmuskulatur fassend, kranial bis zum Processus xiphoideus erweitert. Ein mit steriler Kochsalzlösung getränkter Tupfer wurde links vom Einschnitt platziert, die Magen und Milz verdeckenden Teile des Darms mit einer anatomischen Pinzette herausgezogen und dort abgelegt. Während der Zeit der Auslagerung wurde der Darm regelmäßig mit steriler Kochsalzlösung beträufelt.

Tiere, die Milzgewebe nach Entfernung der eigenen Milz erhielten, wurden in folgender Weise splenektomiert. Durch Anhebung des Magens folgte die Milz über die Verbindung durch das Ligamentum gastrosplenicum nach, welches nun milznah mit der Schere durchtrennt wurde. Nachfolgend wurden die großen Gefäße der Milz aufgesucht, durch Elektrokoagulation verschlossen, durchtrennt und die Milz herausgehoben. Wenn möglich, dienten die entnommenen Organe als Spendergewebe, ansonsten wurde die Milz von Spendertieren verwendet. Spendertiere wurden parallel zur Vorbereitung des Empfängers durch Genickbruch geopfert und die Milz entnommen. Die zur Transplantation vorgesehenen Milzen wurden in einer Petrischale mit steriler Kochsalzlösung abgelegt und mit einem Einwegskalpell in vier etwa gleich große Stücke geteilt. Zur Transplantation wurde beim Empfängertier das Ligamentum gastrosplenicum angehoben und zwei Stücke des Milzgewebes mit der Pinzette zwischen Ligament und Magenwand eingeschoben. Nach abschließender Kontrolle der Position der beiden Transplantate wurden Magen und Darm reponiert. Die Bauchhöhle wurde mit steriler Kochsalzlösung befeuchtet und mit resorbierbaren Polyglykolsäurefäden durch getrennte, jeweils fortlaufende Nähte für Bauchmuskulatur und Haut verschlossen. Danach wurde die Wunde mit Sprühpflaster abgedeckt und das Tier in seinen Haltungskäfig zurückgelegt.

Bei den Versuchsgruppen, die im Abstand von 8 Wochen zwei Transplantate erhielten, wurde vor dem Einbringen des zweiten Transplantats die Lage des ersten Transplantats genau dokumentiert. Dadurch wurde bei der Organentnahme eine eindeutige Unterscheidung von erstem und zweitem Transplantat ermöglicht.

2.2. Immunstimulation mit Schaferythrozyten (SRBC)

Um die immunologische Funktion des transplantierten Milzgewebes zu überprüfen, wurde den Tieren 10 Tage vor der Organentnahme eine Injektion mit Schaferythrozyten verabreicht. Die 50 %ige Vollblut-Suspension von Hammelblut in Alsever-Puffer wurde in steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung (Verhältnis 1:3) gewaschen, zentrifugiert (600 x g, 10 Min) und in der Thoma-Kammer ausgezählt. Anschließend wurden die Erythrozyten mit steriler Kochsalzlösung auf 5×10^9 Zellen pro ml eingestellt. Die Tiere wurden zwei Minuten unter Infrarotlicht gesetzt und anschließend immobilisiert. Jedes Tier erhielt dann 10^9 Erythrozyten in 200 μ l Kochsalzlösung intravenös in die Schwanzvene injiziert.

2.3. Injektion von Blutplasma

Die Gewinnung des Blutplasmas wurde bei der Charles River GmbH (Kißlegg, Deutschland) durchgeführt. Das gefrorene Plasma von C57BL/6- bzw. $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren wurde nach seiner Ankunft langsam aufgetaut, bei 4 Grad Celsius aliquotiert und sofort bei minus 20°C wieder eingefroren. $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere wurden splenektomiert und erhielten ein WT-Milztransplantat wie oben beschrieben. Im Anschluss erhielten die Tiere zwei Mal pro Woche eine intraperitoneale Injektion mit Blutplasma von entweder C57BL/6 oder $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen. Beginnend am dritten Tag nach der Operation erhielt jedes Tier in den ersten zwei Wochen 350 μ l Plasma pro Injektion und in den folgenden 6 Wochen jeweils 300 μ l. Insgesamt wurden so jedem Tier über einen 8-wöchigen Versuchszeitraum 5000 μ l Plasma verabreicht. Zwei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere geopfert.

Untersuchung des Milzgewebes

Am Tag der Organentnahme wurden die Tiere einzeln durch Genickbruch geopfert. Im Anschluss daran wurde der Bauch mit 70 %igem Ethanol eingesprüht und großzügig eröffnet. Die Milz bzw. das Transplantat wurde aufgesucht, entnommen und gewogen. Der für die Immunhistologie bestimmte Teil wurde dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei minus 80°C gelagert. Die Proben für die Durchflusszytometrie wurden erneut gewogen und in Petrischalen mit RPMI-1640 Medium bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Danach erfolgte eine Sichtprüfung des Bauchraums, wobei auf Veränderungen der inneren Organe und Anzeichen für entzündliche Prozesse geachtet wurde. Hierbei wurde ebenfalls überprüft, ob die mesenterialen Lymphknoten vorhanden waren.

2.3.1. Leukozytenzahl

Die für die Durchflusszytometrie bestimmten Milzstücke wurden in einem Metallsieb (Porenweite 0,2 mm) zerzupft, mit 3 ml RPMI-1640 Medium durch das Sieb passiert und die Suspension in sterile 50 ml Falcon®-Gefäße überführt. Die Gefäße wurden mit Schwingerlyse-Reagenz aufgefüllt und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken 20 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die Leukozyten mit 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet in 5 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut mit 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen, 5 µl dieser Suspension entnommen und die Leukozytenzahl in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

2.3.2. Durchflusszytometrie

Zur phänotypischen Charakterisierung der aus der Milz isolierten Leukozyten wurden die Zellen mit fluoreszenz-gekoppelten und biotinylierten mausspezifischen Antikörpern markiert (Tabelle 2). Alle Antikörper wurden vor ihrem Einsatz im Versuch auf ihre optimale Konzentration in 50 µl Volumen für 650000 Zellen titriert. Biotinylierte Antikörper wurden durchgehend mit Streptavidin-APC nachgewiesen.

Tabelle 2: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD4	PE	RM4-5	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD16/CD32	kein	2.4G2	Ratte-IgG2b	
CD21/CD35	FITC	7G6	Ratte IgG2b	
CD23	Biotin	B3B4	Ratte IgG2a	
CD25	Biotin	7D4	Ratte-IgM	
CD44	Biotin	IM-7	Ratte IgG2b	
CD45.1	PE	A20	Maus-IgG2a	
CD45RB	Biotin	16A	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD45R/B220	PE	RA3-6B2	Ratte IgG2a	
ICAM-1 (CD54)	Biotin	3E2	Hamster-IgG	
L-Selektin (CD62L)	Biotin	MEL-14	Ratte IgG2a	
CD69	Biotin	H1.2F3	Hamster-IgG1	
I-A ^b (MHCII)	Biotin	25-9-17	Maus-IgG2a	
IgD	FITC	11-26c.2a	Ratte IgG2a	
IgM	PE	R6-60.2	Ratte IgG2a	
Isotyp-Kontrolle	Biotin	R35-95	Ratte IgG2a	
$\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1)	Biotin	DATK32	Ratte IgG2a	
NK1.1	PE	PK136	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TCR- β	FITC	H57-597	Hamster-IgG	

Aus den in Tabelle 2 aufgeführten Antikörpern wurden für die Leukozyten einer Milz bzw. eines Transplantats verschiedene Kombinationen entwickelt, mit denen jeweils drei Antigene gleichzeitig angefärbt wurden, um verschiedene Zellpopulationen quantitativ zu erfassen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Angefärbte Antigene in den verschiedenen Proben

Antigen 1	Antigen 2	Antigen 3	Untersuchte Populationen
TCR- β	CD4	CD25	CD25 ⁺ CD4 ⁺ regulatorische T-Zellen
TCR- β	CD4	CD45RB	CD45RB ⁻ CD4 ⁺ -memory-T-Zellen
TCR- β	NK1.1	CD69	CD69 ⁺ aktivierte T-, NK- u. NK-T-Zellen
TCR- β	CD45R/B220	$\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1)	$\alpha 4\beta 7$ ⁺ T- u. B-Zellen
TCR- β	CD45R/B220	CD44	CD44 ⁺ T- u. B-Zellen
TCR- β	CD45R/B220	ICAM-1 (CD54)	ICAM-1 ⁺ T- u. B-Zellen
TCR- β	CD45R/B220	L-Selektin (CD62L)	L-Selektin ⁺ T- u. B-Zellen
IgD	IgM	MHCII (I-A ^b)	MHC-Klasse II ⁺ und IgD ⁻ B-Zellen
CD21/CD35	IgM	CD23	CD21/CD35 ⁺ CD23 ⁻ MZ B-Zellen

T-Lymphozyten wurden mit anti-TCR- β identifiziert und mit anti-CD4 in CD4- und CD8-T-Zellen unterschieden. Der Anteil an CD8-T-Zellen wurde über die CD4⁻TCR β ⁺ Zellen bestimmt, da diese Populationen nahezu identisch sind (74). Von den isolierten CD4-positiven T Lymphozyten wurde dann mit anti-CD45RB der Anteil an CD4-memory (CD45RB⁻) bzw. mit anti-CD25 der Prozentsatz an regulatorischen CD4-T-Zellen bestimmt. B-Lymphozyten wurden mit anti-CD45R/B220 oder anti-IgM dargestellt und durch anti-IgD der Anteil IgD negativer B-Zellen differenziert. Die Population der Marginalzonen B-Lymphozyten (MZ B-Zellen) wurde aus den B-Zellen durch anti-CD21/CD35 und anti-CD23 isoliert (CD21/CD35⁺, CD23⁻). Der Anteil Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Zellen wurde mit anti-NK1.1 und anti-TCR β (siehe oben) bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression von Oberflächenmolekülen auf B- und T-Zellen mit den Antikörpern anti- α 4 β 7, anti-CD44, anti-CD54, anti-CD62L und anti-MHC-Klasse II untersucht. Bei der kongenen Milztransplantation wurden Leukozyten des Spenders mit anti-CD45.1 identifiziert. Als Kontrolle diente IgG2a-Isotypkontrolle.

Die für die Leukozytenzählung hergestellte Suspension wurde nach der Zählung mit FACS-Puffer auf 13000 Zellen pro μ l eingestellt und jeweils 50 μ l in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 100 μ l FACS-Puffer wurden die Proben für 15 Sekunden bei 1000 U/Min auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit 500 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platten bei 1200 U/min so lange auf den Schüttler gestellt, bis die Zellen sich vollständig vom Boden der Wells gelöst hatten. Auf die Proben wurde dann anti-CD16/CD32 zur Blockierung der Fc-Rezeptoren gegeben und 20 Minuten auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l FACS-Puffer dazugegeben und wie beschrieben zentrifugiert und resuspendiert. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wurde der FITC-konjugierte Antikörper zugegeben und wieder 20 Minuten auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Nachfolgend wurde schrittweise normales Mausserum, der biotinylierte Antikörper und zuletzt ein Gemisch aus PE-konjugiertem Antikörper und Streptavidin-APC auf die Proben gegeben und inkubiert. Nach den einzelnen Färbeschritten wurde jeweils, wie beschrieben, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in jeweils 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in ein 5 ml Falcon®-Röhrchen überführt. Danach erfolgte sofort die Messung am Durchflusszytometer, wobei für jede Probe 50000 Ereignisse aufgezeichnet wurden. Von diesen wurden die Lymphozyten über FSC und SSC selektiert

und weiter analysiert. Um tote Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde den Proben kurz vor der Messung der Farbstoff 7-AAD zugesetzt, der zwischen Cytosin- und Guanin-Basen der DNS interkaliert. Dabei dringt 7-AAD selektiv in apoptotische und tote Zellen ein (75), die dann über ihre tiefrote Fluoreszenz identifiziert werden können. Akquisition und Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest™Pro (Version 4.0.2, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.3.3. Immunhistologie

Um die Struktur des Milzgewebes zu beurteilen, wurden immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte hergestellt. Milzgewebe wurde zu diesem Zweck bei einer Temperatur von -20°C auf einem Objektisch in Einbettmedium fixiert und mit einem Serienschnittmikrotom 12 µm dick geschnitten. Die Gefrierschnitte wurden auf Glasobjektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur für 2 Stunden getrocknet und danach für 10 Minuten bei -20°C in Methanol-Aceton (1:1 (v/v) Gemisch) fixiert. Für die immunhistologische Färbung kamen die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper zum Einsatz.

Tabelle 4: Für die Immunhistologie verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD45R/B220	kein	RA3-6B2	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FDC-M1	kein	FDC-M1	Ratte IgG2c	
TCR-β	Biotin	H57-597	Hamster-IgG	
MOMA-1	Biotin	MOMA-1	Ratte IgG2a	BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz
Ratte-Ig	kein	Ig-Fraktion von Antiserum aus Kaninchen		Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
APAAP	kein	RAPAAP	Ratte IgG1	

Vor Beginn des Färbeprozesses wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in PBS gespült. Die immunhistologischen Färbungen erfolgten mit der APAAP-Methode und der markierten Avidin-Biotin-Methode. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur in einer dunkel gehaltenen, feuchten Kammer statt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde jeweils für 5 Minuten mit TBS-Tween gespült. B-Lymphozyten und Follikulär Dendritische Zellen wurden mit der APAAP-Methode angefärbt. Nach erneuter Fixierung in 4 %igem PFA (4°C, 45 Min.) wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in TBS-Tween bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper gegen

B-Lymphozyten (anti-CD45R/B220) oder gegen Follikulär Dendritische Zellen (anti-FDC-M1) für eine Stunde inkubiert. Darauf folgte für 30 Minuten die Inkubation mit dem Brückenantikörper (anti-Ratte-Ig) in 5 %igem normalem Mausserum. Nach 30 Minuten Inkubation mit dem Ratte-APAAP-Komplex erfolgte der Nachweis über Fast Blue BB in APAAP-Substrat, das für 25 Minuten auf den Schnitt gegeben wurde. Die markierte Avidin-Biotin-Methode wurde zum Nachweis von T-Lymphozyten (anti-TCR- β), metallophilen Makrophagen (anti-MOMA-1) und Keimzentren angewendet. Letztere wurden mit Hilfe des aus der Erdnuss *Arachis hypogaea* gewonnenen Lectins (Peanut agglutinin, PNA), das an B-Zellen im Keimzentrum bindet, dargestellt. Nach einstündiger Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper bzw. PNA wurde für 30 Minuten der Avidin-Peroxidase-Komplex auf den Schnitt gegeben. Als Nachweisreagenz diente Diaminobenzidin, das für 5 Minuten auf den Schnitt gegeben wurde. Schließlich wurden die Objektträger für die Mikroskopie mit wässrigem Eindeckmittel eingedeckt.

2.4. Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression

Alle Verdünnungen von Proben und Lösungen wurden mit DEPC-H₂O durchgeführt. Von den bei der Organentnahme eingefrorenen und bei -80°C gelagerten Milzen und Milztransplantaten wurden 10 μ m dicke Kryostatschnitte angefertigt und diese entweder im Ganzen in ein Reaktionsgefäß mit 300 μ l RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit) gegeben oder einzeln auf Folienobjektträger aufgebracht und mit Toluidinblau gefärbt. Dazu wurden die Schnitte 30 Sekunden in Ethanol (75%) fixiert und anschließend in DEPC-H₂O 30 Sekunden gespült. Nachfolgend wurde für 10 Sekunden in Toluidinblau-Lösung gefärbt und zweimal für 15 Sekunden in DEPC-H₂O gespült. Abschließend wurden die Schnitte in zwei Schritten jeweils 30 Sekunden in Ethanol (100%) entwässert. Jeder zehnte Schnitt wurde auf einem Glasobjektträger fixiert und zur Identifizierung der Kompartimente, wie oben beschrieben, immunhistologisch gefärbt.

Laser Mikrodisektion

Durch den Vergleich der immunhistologisch gefärbten Kontrollschnitte mit den mit Toluidinblau gefärbten Schnitten konnten die Kompartimente PALS, Follikel und Rote Pulpa eindeutig identifiziert werden. Diese wurden mit Hilfe der PALM® RoboSoftware markiert, dem gepulsten, ultravioletten Laser der Mikrodisektionsanlage ausgeschnitten, in Verschlusskappen von Reaktionsgefäßen gesammelt und sofort in 300 μ l RLT-Puffer

(RNeasy® Mini Kit) verbraucht. Von jedem Kompartiment wurden so $3,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ für die mRNA-Analyse isoliert.

RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Aus den Proben wurde die vollständige RNA mit dem RNeasy® Mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die in RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit) befindlichen Proben für 10 Sekunden bei 12000 U/Min zentrifugiert und anschließend durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Einwegspritze die genomische DNA geschert. Nach Zugabe von Ethanol (70%) im Verhältnis 1:1 (v/v) wurde die Probe über Säulen (RNeasy® Mini Kit) 15 Sekunden bei 10000 U/Min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Aufeinander folgend wurde mit 700 μl RW1-Puffer (RNeasy® Mini Kit) sowie 500 μl RPE-Puffer (RNeasy® Mini Kit) jeweils 15 Sekunden und mit 500 μl RPE-Puffer 2 Minuten bei 10000 U/Min gewaschen und das Filtrat verworfen. Abschließend wurde die Säule für 1 Minute bei 14000 U/Min getrocknet. Die Eluierung der RNA aus der Säule erfolgte mit 30 μl DEPC- H_2O für 1 Minute bei 10000 U/Min, wobei das erste Eluat ein zweites Mal über die Säule gegeben wurde. Die Säule wurde nun verworfen und das Eluat für 13 Minuten bei 60°C in der Vakuumzentrifuge auf 12 μl reduziert, um die Konzentration an RNA zu erhöhen. Die so vorbereiteten Proben wurden mit je 1,5 μl 10x DNase-Puffer und DNase-I-Enzym (beides Deoxyribonuklease I-Kit) versetzt und 15 Minuten bei 20°C inkubiert, um die verbliebene genomische DNA zu verdauen. Nach Zugabe von 1,5 μl Stopp-Lösung (Deoxyribonuklease I-Kit) wurde für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, sofort auf Eis gekühlt und 2 μl DEPC- H_2O zugegeben. Von der Probe wurden für den Positiv-Ansatz 11,5 μl mit 8 μl Mastermix für reverse Transkription und 0,5 μl (100 U) Reverse Transkriptase versetzt. Für die Negativ-Kontrolle wurden 5,5 μl der Probe mit 4 μl Mastermix für reverse Transkription und 0,5 μl DEPC- H_2O gemischt. Beide Ansätze wurden aufeinander folgend für 10 Minuten bei 25°C (Bindung des Random-Primers), 50 Minuten bei 42 °C (Reverse Transkription der mRNA in cDNA) und 15 Minuten bei 70°C (Reaktionsstopp) inkubiert. Für die Lagerung bis zur Durchführung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden die cDNA-Proben bei -20°C eingefroren.

Quantitative Real-Time (RT) –PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System durchgeführt. Zur Detektion des PCR-Produkts dienten hierbei sequenzspezifische TaqMan®-Sonden, mit dem Signalfluorochrom Fluorescein (FAM, Emission: 520 nm) und dem Quencherfluorochrom Tetramethylrhodamin (TAMRA). Die für die sieben Zytokine und das House Keeping Gen MLN (Metastatic lymph node) 51 verwendeten Primer und Sondensequenzen mit Annealingtemperaturen (berechnet mit Clone Manager 7.01, S & D Software, Cary, NC, USA) und Fragmentgrößen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die Bestimmung in der PCR wurden pro Well 1,25 µl der Probe mit 12,5 µl 2x TaqMM, 9,25 µl DEPC-H₂O und 2 µl Primer-Sonden-Mix eingesetzt, mit einer Konzentration von Sense und Antisense Primer im Ansatz von jeweils 500nM (MLN51: 125 nM) und der Sonde von 200 nM (MLN51: 250nM). In der PCR wurde von jedem Positiv-Ansatz eine Doppelbestimmung und von der Negativ-Kontrolle eine Einfachbestimmung der 7 Zytokine und MLN51 durchgeführt. Das Programm begann mit einem Hot Start von 6 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen mit 30 Sekunden 95 °C und 1 Minute 60 °C. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der ABI PRISM® 7000 SDS 1.1 RQ Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), um den ct (Cycle of threshold) für jede Probe zu bestimmen. Die Expression der untersuchten mRNA wurde dann für jede Probe mit der Formel

$$2^{-(ct_{\text{Zytokin}} - ct_{\text{MLN51}})}$$

in Kopien pro Kopie MLN51 umgerechnet. Konnte in der PCR kein Produkt gemessen werden, wurde ein ct von 40 in die Berechnung eingesetzt, der den höchsten erreichbaren Wert für das hier angewandte System darstellt (Handbuch, RQ Software, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Für MLN51 musste immer ein ct von kleiner als 40 erreicht werden, sonst wurde die Probe aus der Untersuchung ausgeschlossen.

Tabelle 5: PCR-Sondensequenzen, Primersequenzen, Fragmentgrößen und Annealingtemperaturen

Name	Sequenz	Größe [bp]	Annealingtemperatur [°C]
MLN51 Sonde	5' CACGGGAAGCTTCGAGGTGTGCCTAAC		70
MLN51 Sense	5' CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG	134	66
MLN51 Antisense	5' TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG		66
TGF- β -1 Sonde	5' CACAGTACAGCAAGGTCCTTGCCCTCTACA		72
TGF- β -1 Sense	5' GACCCTGCCCTATATTTGGAG	146	64
TGF- β -1 Antisense	5' GCGACCCACGTAGTAGACGATG		66
IL-15 Sonde	5' CCTACACTGACACAGCCCAAATGAAGACATG		70
IL-15 Sense	5' CCATCTCGTGCTACTTGTGTTTCC	117	65
IL-15 Antisense	5' TCCAGTTGGCCTCTGTTTTAGG		62
IL-2 Sonde	5' CTTGCCCAAGCAGGCCACAGAATTG		70
IL-2 Sense	5' TCCCCAGGATGCTCACCTTC	98	65
IL-2 Antisense	5' ATGCCGCAGAGGTCCAAG		64
IL-12 Sonde	5' CTCTACGAGGAACGCACCTTTCTGGTTACAC		71
IL-12 Sense	5' GAGCACTCCCCATTCTACTTCTC	140	66
IL-12 Antisense	5' TGCATTGGACTTCGGTAGATGTC		64
IFN- γ Sonde	5' TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG		71
IFN- γ Sense	5' GCAAGGCGAAAAAGGATGC	98	62
IFN- γ Antisense	5' GACCACTCGGATGAGCTCATTG		65
IL-4 Sonde	5' CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATG		69
IL-4 Sense	5' GAGACTCTTTCGGGCTTTTTCG	96	63
IL-4 Antisense	5' AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG		64
IL-10 Sonde	5' CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC		70
IL-10 Sense	5' TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	96	65
IL-10 Antisense	5' CACCTGCTCCACTGCCTTG		65

Statistische Auswertung

Bei Überprüfung der Daten auf Normalverteilung (KOLMOGOROFF-SMIRNOV-Test) ergaben sich für die hier dargestellten Befunde keine signifikanten Abweichungen. Die Darstellung der Daten erfolgte deshalb in Form von Mittelwert und Standardabweichung. Aufgrund der teilweise kleinen Stichprobengröße wurden dennoch ausschließlich nicht-parametrische Testverfahren für die Analyse herangezogen. Vergleiche zwischen drei oder mehr Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der Ein-Weg Rangvarianzanalyse nach KRUSKAL & WALLIS (H-Test) durchgeführt. Bei signifikantem H-Test ($p < 0,05$) wurde beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben der MANN-WHITNEY U-Test als Folgetest herangezogen und bei abhängigen Stichproben der WILCOXON-Test durchgeführt. Zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen zwei Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN berechnet. Innerhalb der Abbildungen wurde zwischen $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) als Signifikanzniveau unterschieden.

Alle statistischen Tests wurden mit dem Programm SPSS® 12.0G für Windows (Version 12.0.1, SPSS Incorporated) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Milztransplantation dauerte vom Eintritt der Narkose bis zum Aufwachen der Tiere 15 bis 20 Minuten. Bei der hier angewandten Methode kam es zu keinen Todesfällen durch die Operation selbst oder durch postoperative Infektionen.

3.1. Regeneration von transplantiertem Milzgewebe

Die aus transplantiertem Milzgewebe hervorgegangenen Regenerate waren von rundlicher Form, zeigten die gleiche dunkelrote Färbung wie natives Milzgewebe und waren nahe dem Magen im großen Netz lokalisiert (Abbildung 3).

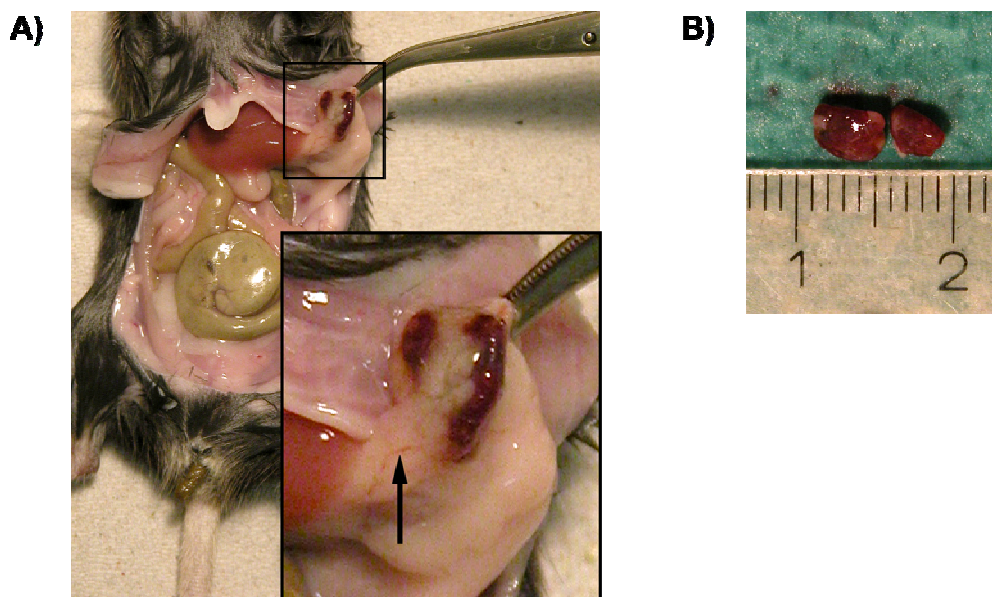


Abbildung 3: Organentnahme nach Milztransplantation

A) Übersicht des geöffneten Abdomen 8 Wochen nach der Transplantation. Die transplantierten Milzstücke liegen im großen Netz. Das Rechteck markiert den rechts unten vergrößert dargestellten Bereich. Der Pfeil bezeichnet ein zum Transplantat laufendes Blutgefäß.

B) Die aus dem großen Netz herauspräparierten Transplantate mit Skala in cm.

Gut zu erkennen waren die zum Transplantat ziehenden Blutgefäße (Abbildung 3A), die in allen Fällen dargestellt werden konnten. In der Regel ergaben die beiden transplantierten Milzstücke zwei getrennte Regenerate (Abbildung 3B). Waren sie dennoch zu einem Stück verschmolzen, dann war die Grenze zwischen den beiden Teilen immer deutlich sichtbar. Verwachsungen des Darms mit der Bauchwand traten in etwa 10 Prozent der Fälle im

Bereich der Operationswunde auf, die jedoch auf den Allgemeinzustand der Tiere und die Transplantate keinen erkennbaren Einfluss hatten. Bei 3 von 160 operierten Tieren wurden entzündliche Veränderungen (Abszesse) festgestellt, woraufhin sie aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden. Um festzustellen, wann die Regeneration abgeschlossen war, wurde die Entwicklung des Transplantats über einen Zeitraum von 8 Wochen verfolgt.

3.1.1. Kinetik der Milzregeneration

Um den zeitlichen Ablauf der Regeneration nach Transplantation zu untersuchen, wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6 (nachfolgend WT genannt) splenektomiert und Milzgewebe transplantiert. Eine, 3, 5 und 8 Wochen nach der Operation wurden die Transplantate entnommen, gewogen und durchflusszytometrisch sowie immunhistologisch untersucht.

Gewichtsentwicklung

Eine Woche nach der Operation wurde mit 17 mg das geringste Gewicht der Transplantate festgestellt. Dies war signifikant weniger als nach 5 und 8 Wochen (Abbildung 4).

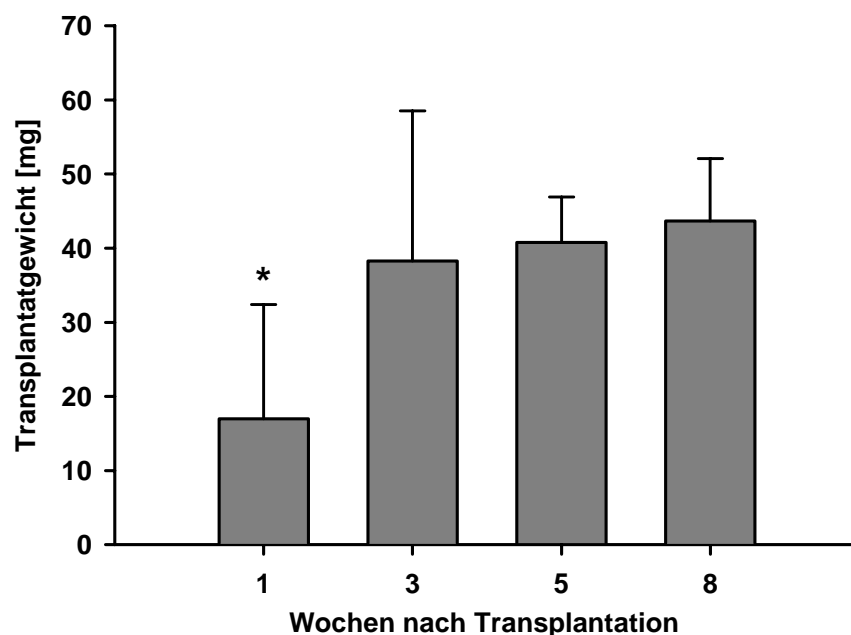


Abbildung 4: Gewichtsentwicklung der Milztransplantate

Gewichte der Milztransplantate 1, 3, 5 und 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 bis 9 Tieren pro Zeitpunkt. Transplantatgewicht nach 1 Woche signifikant niedriger als 5 und 8 Wochen nach der Transplantation; * = $p < 0,05$.

Nach drei Wochen hatte sich das mittlere Gewicht der Transplantate mit 38 mg mehr als verdoppelt. Nach der starken Zunahme in den ersten drei Wochen konnte in der Folgezeit eine Stabilisierung des Gewichts beobachtet werden. Acht Wochen nach der Transplantation waren die Regenerate mit 44 mg genauso schwer wie bereits nach 3 und 5 Wochen. Die Untersuchung der Leukozytenzahlen im Transplantat sollte klären, ob die Wiederbesiedlung mit Leukozyten zeitlich mit der Gewichtsentwicklung zusammenhängt.

Wiederbesiedlung mit Leukozyten

Wie schon beim Gewicht war auch bei der Leukozytenzahl nach einer Woche der geringste Wert zu beobachten (Abbildung 5).

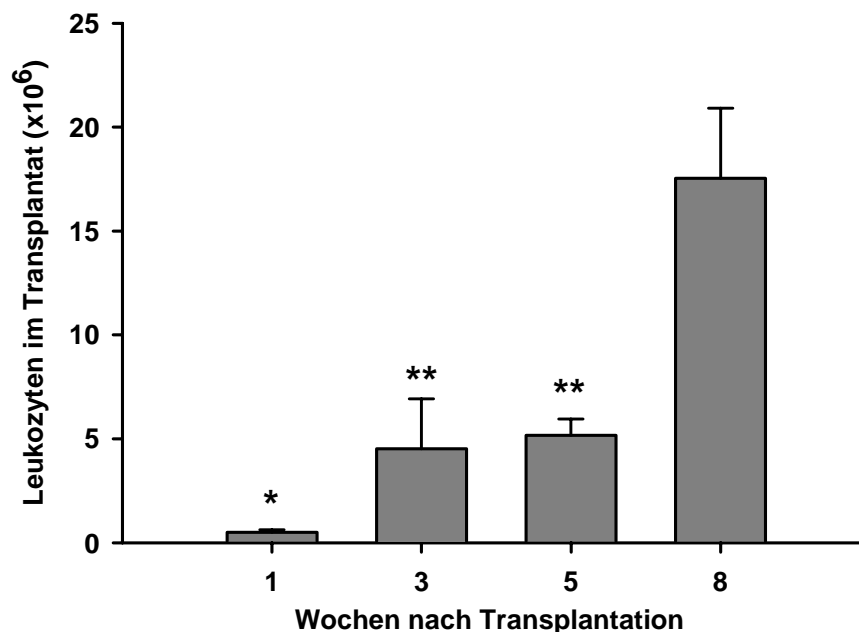


Abbildung 5: Entwicklung der Leukozytenzahlen im Transplantat

Leukozytenzahlen der Milztransplantate 1, 3, 5 und 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 bis 9 Tieren pro Zeitpunkt. Leukozytenzahl nach 1 Woche signifikant niedriger als nach 3, 5 und 8 Wochen. Drei und 5 Wochen nach Transplantation jeweils signifikant niedriger als nach 8 Wochen; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Mit $3,3 \times 10^5$ war die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt etwa 15mal niedriger als drei und fünf Wochen nach der Transplantation. Im Vergleich zu acht Wochen nach der Operation betrug der Unterschied sogar mehr als das 50fache. Sowohl drei als auch fünf Wochen nach der Transplantation wurde mit 5×10^6 etwa die gleiche Anzahl Leukozyten im Regenerat gefunden. Nach acht Wochen war die Leukozytenzahl mit $1,8 \times 10^7$ sprunghaft

um mehr als das dreifache angestiegen und hatte damit den höchsten Wert in dieser Versuchsreihe erreicht. Eine Woche nach der Transplantation finden sich also nur wenige Leukozyten im Transplantat und während der Regeneration schreitet die Gewichtsentwicklung der Wiederbesiedlung mit Leukozyten voran.

Eine Untersuchung der isolierten Leukozyten im Durchflusszytometer sollte Aufschluss darüber geben, ob einzelne Subpopulationen zu Beginn der Regeneration stärker einwandern als andere. Die Analyse erfolgte in drei Schritten, die für die Expression von CD25 auf CD4-T-Zellen exemplarisch dargestellt ist (Abbildung 6).

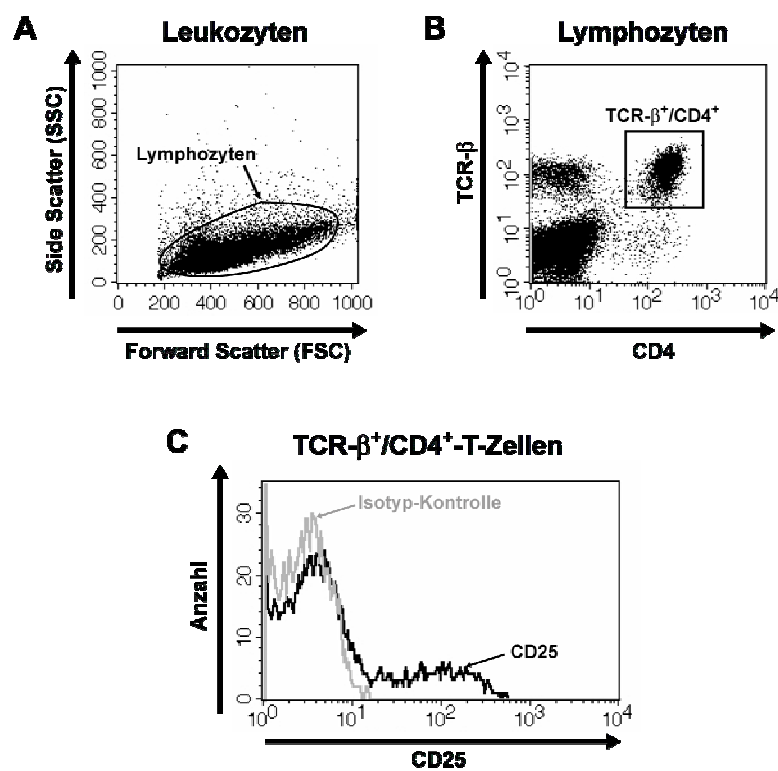


Abbildung 6: Analyse der Leukozyten im Durchflusszytometer

Schema der durchflusszytometrischen Analyse von mit Antikörpern markierten Leukozyten am Beispiel der Expression von CD25 auf CD4-T-Zellen.

A) Punktwolkendarstellung (Dot Plot) aller gemessenen Leukozyten nach Größe (FSC) und Granularität (SSC). Durch den Kreis werden Lymphozyten markiert.

B) Dot Plot der in A) markierten Lymphozyten und deren Identifikation in Abhängigkeit von der Bindung der Antikörper gegen TCR-β und CD4. Im Rechteck befinden sich die CD4-T-Zellen.

C) Histogramm der in B) markierten CD4-T-Zellen. Zellen der grauen Linie wurden mit der Isotyp-Kontrolle, Zellen der schwarzen Linie mit dem Antikörper gegen CD25 angefärbt.

Alle aufgezeichneten Ereignisse wurden in einer Punktwolkendarstellung (Dot Plot) nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) aufgetragen und Lymphozyten als kleine bis mittelgroße und wenig granuläre Zellen mit Hilfe einer Markierung ausgewählt (Abbildung 6A). Im nachfolgenden Dot Plot wurden die Lymphozyten entsprechend ihrer Färbung mit den Antikörpern gegen TCR- β und CD4 aufgetrennt und die doppelt positiven CD4-T-Zellen markiert (Abbildung 6B). Diese wurden schließlich im Histogramm auf die Expression von CD25 überprüft, wobei eine identisch behandelte Probe, die anstatt des Antikörpers gegen CD25 die Isotyp-Kontrolle erhalten hatte, als Referenz für die Ermittlung der CD25-positiven CD4-T-Zellen diente (Abbildung 6C).

Nach einer Woche war die Anzahl der lebenden Zellen im Transplantat so gering, dass keine Analyse möglich war. Für die Zeitpunkte 3, 5 und 8 Wochen nach der Transplantation macht Abbildung 7 deutlich, dass die Besiedlung des Transplantats gleichmäßig durch alle Lymphozyten-Subpopulationen stattfand. Zu keinem Zeitpunkt trat eine der untersuchten Zellpopulation vermehrt auf, sondern der Anteil an B-Lymphozyten war mit 73 Prozent ebenso wie der der T-Lymphozyten mit 23 Prozent über den gesamten Zeitraum konstant. Der Anteil von CD4⁻ (14 %) und CD8-T-Zellen (9 %) zeigte sich dabei ebenso gleich bleibend wie der von NK (2 %) und NK-T-Zellen (0,5 %) (Abbildung 7A). Innerhalb der T-Lymphozyten fanden sich CD4⁺CD45RB⁻ memory Zellen ebenso wie CD4⁺CD25⁺ regulatorische Zellen zu jedem Zeitpunkt in konstantem Anteil. Bei den B-Lymphozyten konnte über die Zeit ebenfalls kein Unterschied in den Anteilen von IgD negativen oder CD21⁺CD23⁻ Marginal Zonen (MZ) B-Zellen festgestellt werden (Abbildung 7B). Während der Regeneration kam es innerhalb des beobachteten Zeitraums also zu keiner präferentiellen Einwanderung durch eine der untersuchten Subpopulationen.

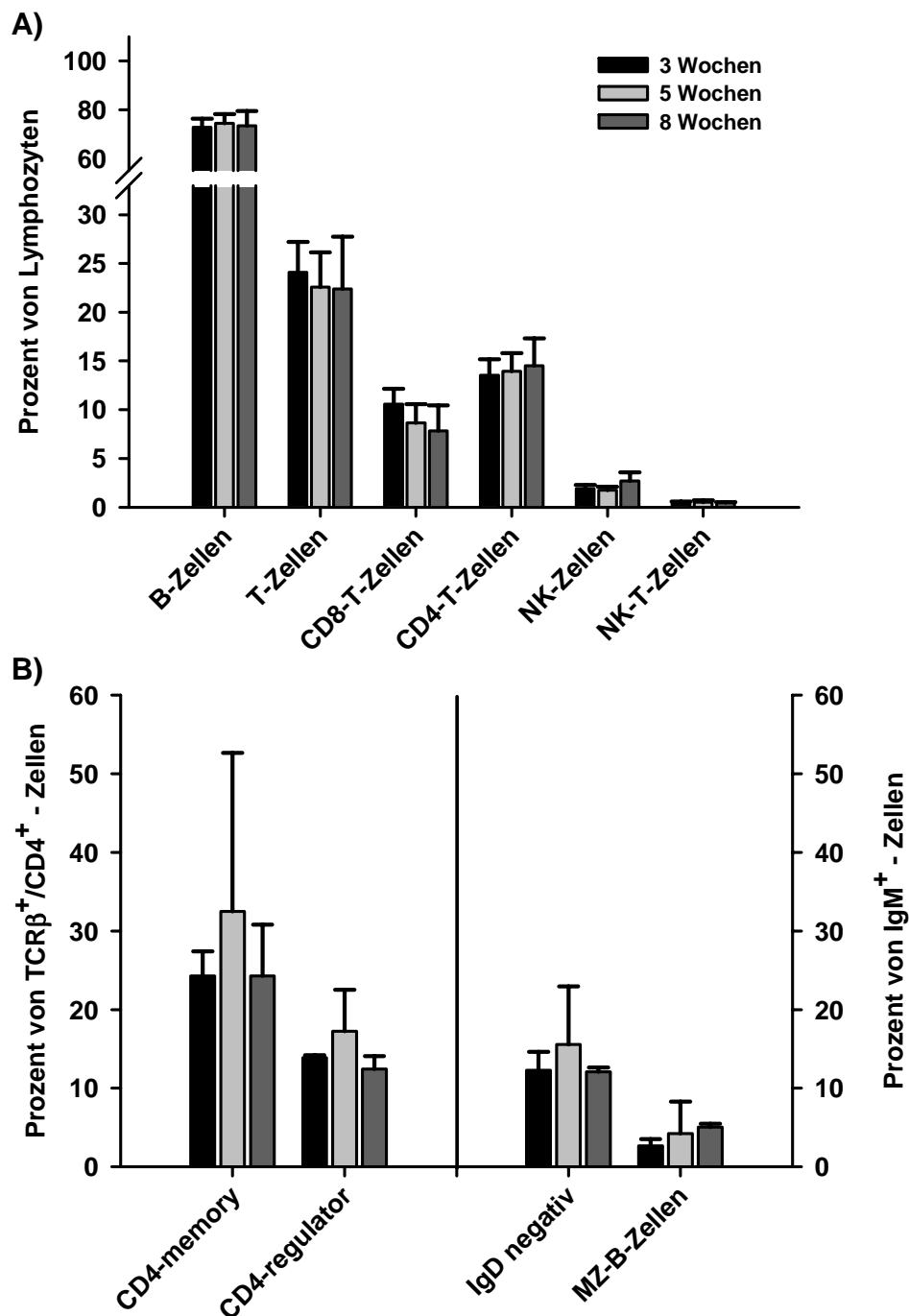


Abbildung 7: Gleichmäßige Besiedlung des Transplantats durch Subpopulationen der Lymphozyten

A) Prozentuale Anteile der Subpopulationen an den Gesamtlymphozyten in Milztransplantaten 3, 5 und 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere.

B) Prozentuale Anteile der CD45RB⁻ memory und CD25⁺ regulatorischen CD4-T-Zellen, sowie der IgD negativen und CD21⁺CD23⁻ Marginal Zonen B-Zellen zu den in A) genannten Zeitpunkten.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 4 Tieren pro Zeitpunkt.

Wiederherstellung lymphatischer Strukturen

Lymphatisches Gewebe zeichnet sich durch einen hohen Organisationsgrad von T- und B-Lymphozyten aus, weshalb neben dem Gewicht und der im Transplantat vorhandenen Leukozyten insbesondere die Wiederherstellung der lymphatischen Strukturen als Maß für die vollständige Regeneration diente. Die entnommenen Transplantate wurden darum hinsichtlich der Anordnung der eingewanderten Leukozyten immunhistologisch untersucht (Abbildung 8).

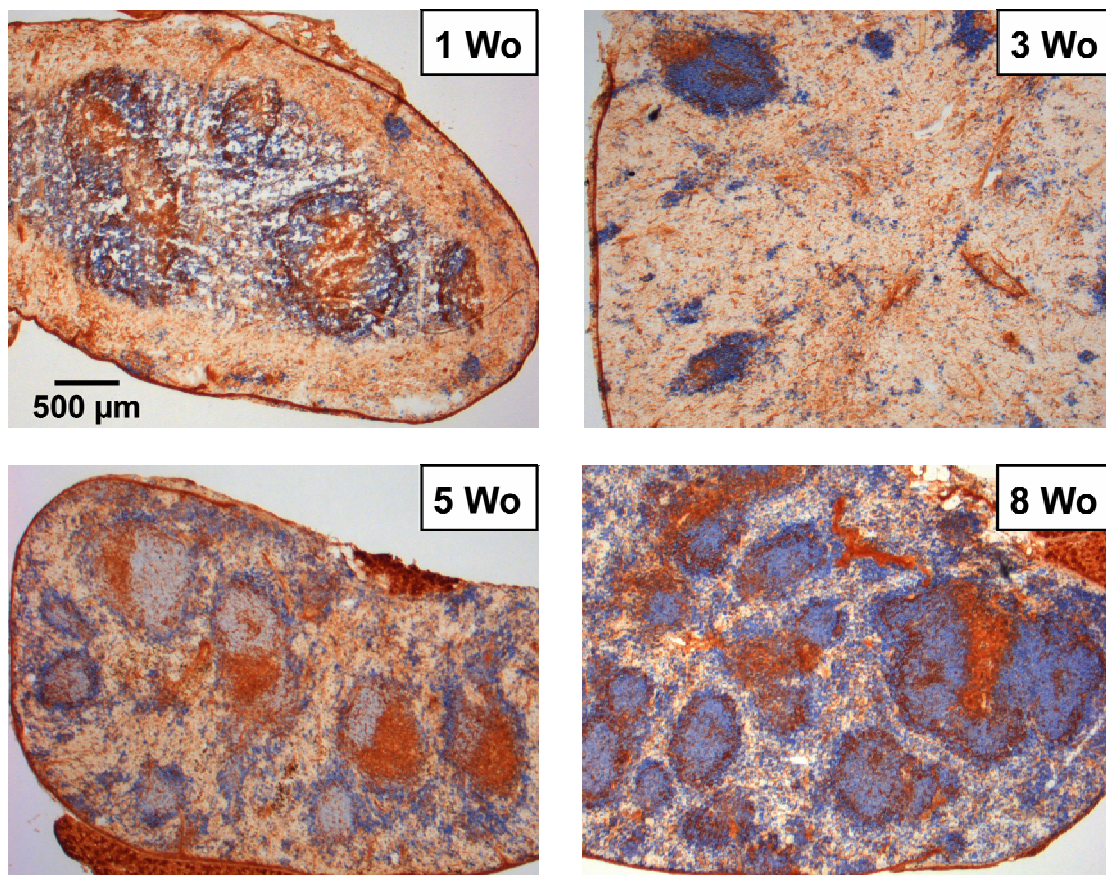


Abbildung 8: Entwicklung der Milzstruktur im Verlauf der Regeneration

Immunhistologisch gefärbte Kryostatschnitte von Milztransplantaten 1, 3, 5 und 8 Wochen nach Transplantation in splenektomierte WT-Tiere.

blau: B-Zellen (anti-B220), hellbraun: T-Zellen (anti-TCR β), dunkelbraun: metallophile Makrophagen (anti-MOMA-1); 1 Wo = eine Woche, 3 Wo = drei Wochen, 5 Wo = 5 Wochen und 8 Wo = 8 Wochen nach Transplantation; Größenverhältnisse im oberen linken Bild.

Eine Woche nach der Transplantation befanden sich in der Mitte des Regenerats die Reste ursprünglicher Milzstrukturen (Abbildung 8, oben links). In diesem Bereich war das

Gewebe von zahlreichen Löchern durchsetzt und sah nekrotisch aus. In Verbindung mit der durchflusszytometrischen Analyse stellte sich heraus, dass alle Zellen mit 7AAD angefärbt werden konnten. Die nekrotischen Areale waren von einem Ring festen Gewebes umschlossen, in dem so gut wie keine Lymphozyten anzutreffen waren. Nach drei Wochen war der nekrotische Gewebeskern verschwunden und die Schnittfläche wies keine nekrotischen Bereiche mehr auf (Abbildung 8, oben rechts). In der nach einer Woche noch leeren Randzone waren jetzt einzelne Anhäufungen von vor allem B-Lymphozyten zu sehen. Fünf Wochen nach der Transplantation waren Ansammlungen von Lymphozyten im ganzen Regenerat anzutreffen (Abbildung 8, unten links). Verbände von B-Lymphozyten waren mit jetzt gut zu erkennenden Anhäufungen von T-Zellen assoziiert. In den nach 8 Wochen entnommenen Transplantaten waren metallophile Makrophagen als ringförmige Strukturen um die B-Zell-Ansammlungen deutlich sichtbar (Abbildung 8, unten rechts). Gegenüber dem Transplantat nach 5 Wochen hatte die Dichte der Lymphozyten insbesondere zwischen den abgegrenzten B- und T-Zell-Arealen deutlich zugenommen.

Acht Wochen nach der avaskulären Transplantation von Milzgewebe war das Regenerat also gut mit Leukozyten gefüllt und die Lymphozyten waren in deutlich abgrenzbaren Arealen organisiert. Durch den anschließenden Vergleich mit nativen Milzen sollte die Bildung von lymphatischem Gewebe nach 8 Wochen qualitativ und quantitativ beurteilt werden.

3.1.2. Erfolgreiche Regeneration von lymphatischem Gewebe

Gewicht und Zusammensetzung der Leukozyten von Milztransplantaten 8 Wochen nach der Implantation wurden mit Milzen von unbehandelten WT-Kontrolltieren verglichen. Zur Überprüfung der immunologischen Funktion wurde einem Teil der Tiere 10 Tage vor der Organentnahme Schaferythrozyten (SRBCs) zur Induktion einer Immunantwort injiziert. Mit SRBCs stimulierte Transplantate und Kontrollmilzen wurden immunhistologisch auf die Präsenz von Keimzentren untersucht.

3.1.3. Gewicht und Leukozytenzahl

Das mittlere Gewicht der WT-Kontrollmilzen war mit 91 mg etwa doppelt so hoch wie das der Transplantate (44 mg; Abbildung 9, links). Da etwa die Hälfte einer nativen Milz transplantiert wurde, entsprach das Regenerat in der Menge dem eingesetzten Milzgewebe.

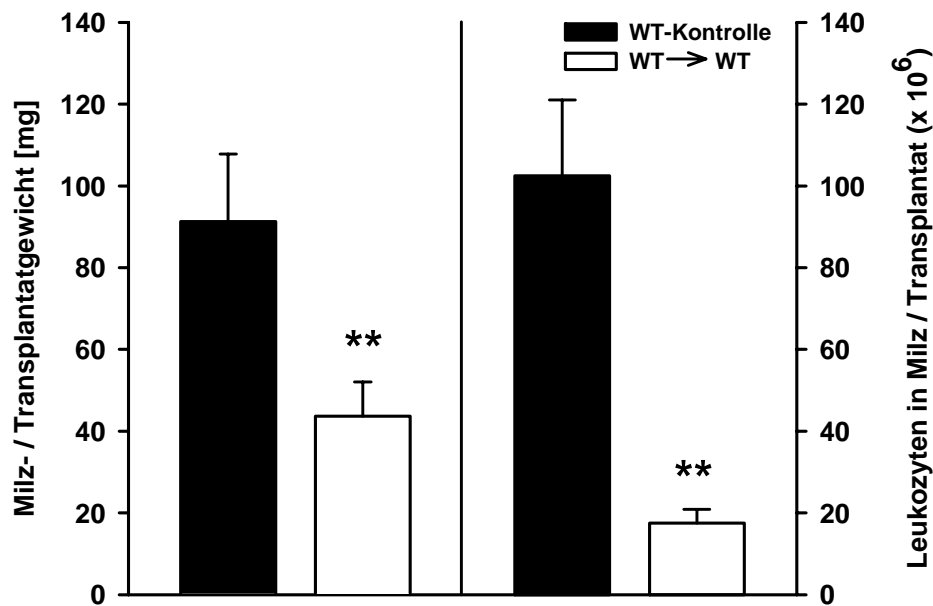


Abbildung 9: Größe und Zellzahl des Transplantats sind geringer

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) von nativen WT-Milzen (WT-Kontrolle) und Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere (WT → WT). Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 11 bzw. 9 Tieren; ** = p < 0,01

Die Anzahl der Leukozyten im Transplantat wich demgegenüber deutlich von der Ausgangsmenge ab. Kamen in der WT-Kontrollmilz etwa 1×10^8 Leukozyten vor, waren 8 Wochen nach der Transplantation nur etwa 20 Prozent dieser Menge im Regenerat vorhanden (Abbildung 9, rechts). Bezieht man die Leukozytenzahl allerdings auf das Gewicht, enthält das Transplantat 37 Prozent der Zellen einer nativen Wildtyp-Milz. Acht Wochen nach der Transplantation ist das Regenerat also kleiner und enthält deutlich weniger Leukozyten als eine native Milz.

3.1.4. Lymphozyten-Subpopulationen

Die aus Kontrollmilzen und Transplantaten isolierten Leukozyten wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht und verglichen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob im Transplantat alle für die Funktion wichtigen Lymphozyten-Populationen vorhanden waren. Insgesamt zeigten sich WT-Kontrollen und WT-Transplantate in der Zusammensetzung der Lymphozyten sehr ähnlich (Abbildung 10). Alle untersuchten Subpopulationen konnten im Transplantat nachgewiesen werden und die meisten von ihnen in gleichen Anteilen wie bei den Kontrolltieren. Der Anteil der

B-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten war mit etwa 70 Prozent bei den Transplantaten genauso hoch wie bei den Kontrollen (Abbildung 10A). Innerhalb der B-Lymphozyten zeigte sich die Subpopulation der MZ-B-Zellen bei den Transplantaten mit 5 Prozent gegenüber den Kontrolltieren mit 8 % nur leicht erniedrigt. Der Gesamtanteil der IgD negativen B-Zellen war hingegen bei transplantiertem und nativem Milzgewebe mit etwa 11 Prozent gleich hoch (Abbildung 10B). Für die T-Lymphozyten bestand ein sehr ähnliches Bild. Der Anteil an den Gesamtlymphozyten betrug bei den Milztransplantaten ebenso wie bei den Kontrollmilzen etwa 23 Prozent. Gleiches ergab sich auch für CD8- und CD4-T-Zellen, deren Anteil in Transplantaten und Kontrollen identisch war (Abbildung 10A). Bei näherer Untersuchung der CD4-T-Zellen waren die Gedächtniszellen mit jeweils etwa 24 Prozent gleich stark vertreten, während von den regulatorischen CD4-T-Zellen in den Transplantaten 40 Prozent weniger als in den nativen Milzen anzutreffen waren (Abbildung 10B). Natürliche Killerzellen waren in beiden Versuchsgruppen zu 2,7 Prozent vorhanden, aber NK-T-Zellen kamen in nativen Milzen etwa doppelt so häufig vor wie in den Transplantaten. Allerdings war dies die kleinste Subpopulation und erreichte maximal 1,5 Prozent Anteil an den Gesamtlymphozyten (Abbildung 10A). Neben der Analyse der Subpopulationen wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle L-Selektin, ICAM-1, $\alpha_4\beta_7$ sowie CD44 auf T- und B-Lymphozyten untersucht. Darüber hinaus wurde der Anteil der T-Zellen bestimmt, der für den Aktivierungsmarker CD69 positiv war und wie viele B-Zellen MHC-Klasse II (MHCII) exprimierten. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass weder für T- noch B-Lymphozyten irgendwelche Unterschiede in der Expression der beschriebenen Moleküle gefunden wurden. Etwa 65 Prozent der T-Zellen waren sowohl bei den WT-Transplantaten als auch bei den WT-Kontrollen positiv für L-Selektin. ICAM-1 und CD44 wurden auf ca. 80 Prozent der T-Zellen von Kontrollmilzen und Transplantaten exprimiert (Abbildung 11A). Integrin $\alpha_4\beta_7$ wurde in beiden Versuchsgruppen auf etwa 30 %, der Aktivierungsmarker CD69 auf jeweils 10 Prozent der T-Lymphozyten gefunden. Die Untersuchung der B-Lymphozyten ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 11B). Allerdings waren bei den Kontrolltieren deutlich mehr B-Zellen positiv für L-Selektin. Die hohe Standardabweichung (beide 10 Prozent) und die geringe Anzahl der Transplantate ($n = 3$) ließ hier keinen signifikanten Unterschied erkennen. Die anderen untersuchten Oberflächenmoleküle konnten sowohl in der nativen Milz als auch im Transplantat durchgängig auf über 90 Prozent der B Lymphozyten nachgewiesen werden.

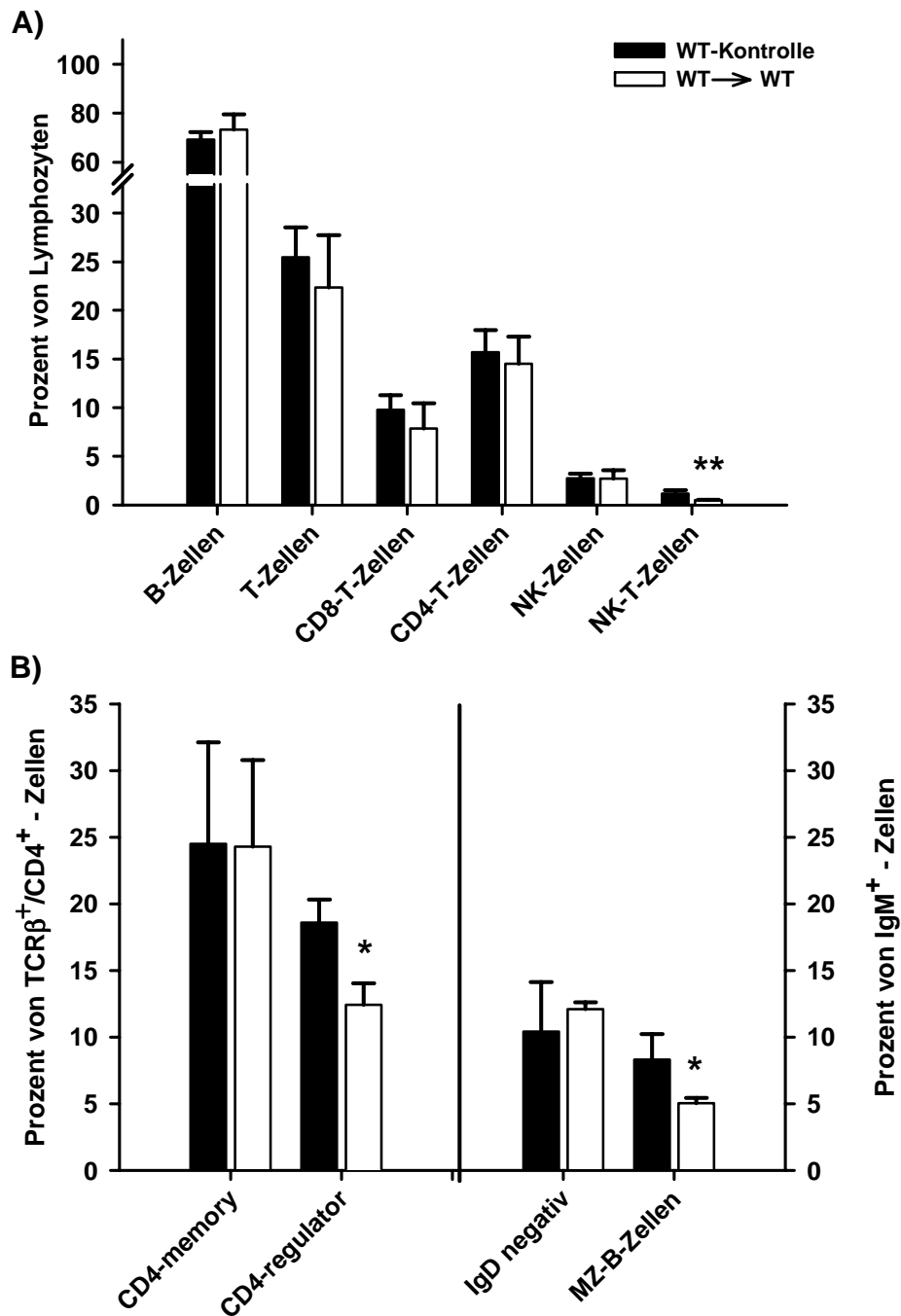


Abbildung 10: Lymphozyten-Subpopulationen von nativen WT-Milzen und Milztransplantaten

A) Prozentuale Anteile der Subpopulationen an den Gesamtlymphozyten in nativen WT-Milzen (WT-Kontrolle) und Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere (WT → WT).

B) Prozentuale Anteile der CD45RB⁻ memory und CD25⁺ regulatorischen CD4-T-Zellen, sowie der IgD negativen und CD21⁺CD23⁻ Marginal Zonen B-Zellen bei den in A) genannten Versuchsgruppen.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 7 bzw. 4 Tieren; * = p < 0,05, ** = p < 0,01.

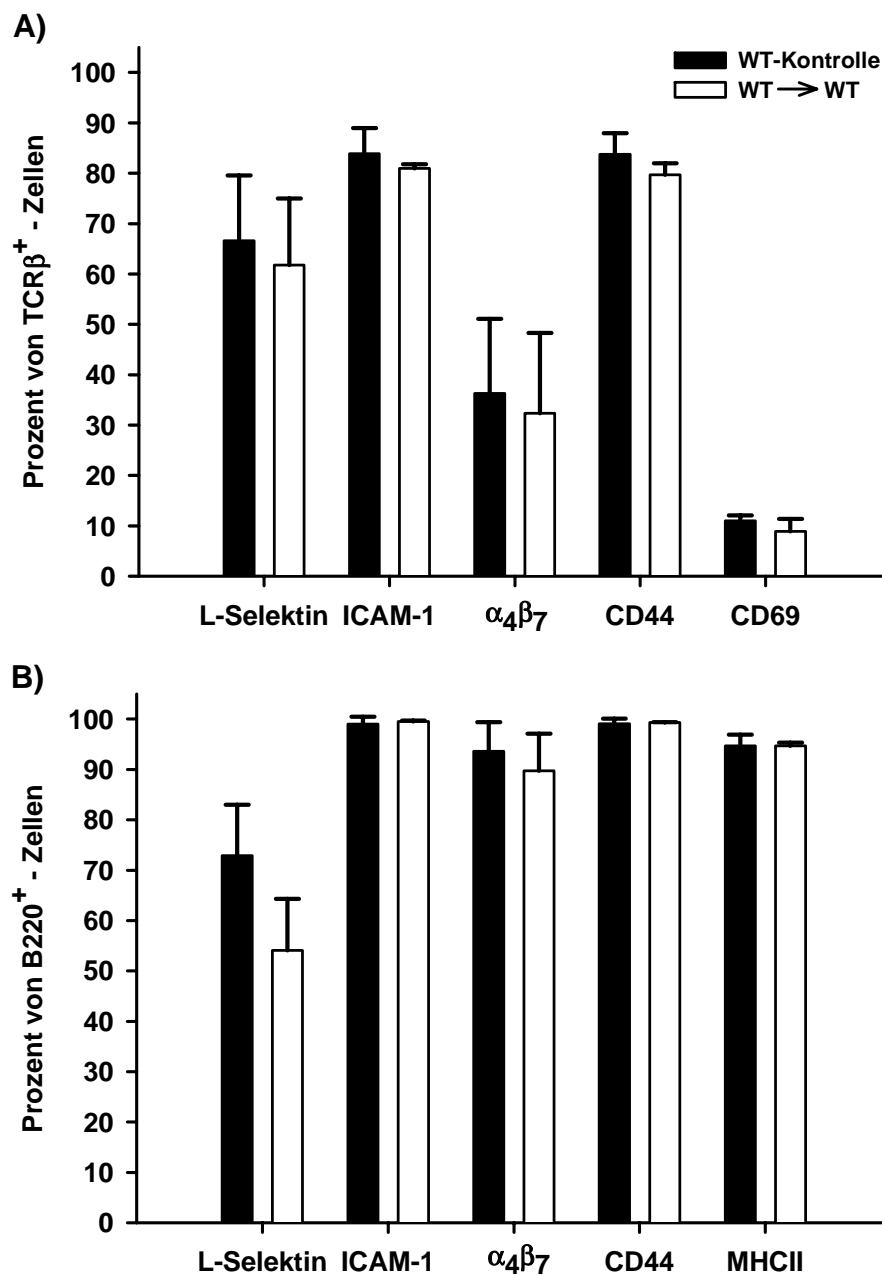


Abbildung 11: Oberflächenmoleküle auf T und B Lymphozyten von nativen WT-Milzen und Milztransplantaten

A) Expression von L-Selektin, ICAM-1, α₄β₇, CD44 und CD69 auf T-Zellen (TCRβ⁺) nativer WT-Milzen (WT-Kontrolle) und von Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere (WT → WT).

B) Expression von L-Selektin, ICAM-1, α₄β₇, CD44 und MHCII auf B-Zellen (IgM⁺) der in A) genannten Versuchsgruppen.

Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 6 bzw. 3 Tieren; * = p < 0,05, ** = p < 0,01.

Obwohl im Transplantat also deutlich weniger Leukozyten vorhanden waren als in der nativen Milz, war die Zusammensetzung in beiden Versuchsgruppen vergleichbar. Lediglich in kleineren Subpopulationen ergaben sich Abweichungen. In der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle ließen sich keine Unterschiede feststellen.

3.1.5. Lymphatische Struktur und Funktion

Die erfolgreiche Regeneration der Milztransplantate sollte insbesondere über deren Struktur und Funktion überprüft werden. Deshalb wurden die nach 8 Wochen entnommenen WT-Transplantate immunhistologisch mit nativen WT-Milzen verglichen. Unstimulierte Transplantate und native Milzen wurden hinsichtlich der Präsenz von PALS (Pa), Follikel (Fo) und Marginalzone (MZ) als Kompartimente der Weißen Pulpa untersucht. Bei Transplantaten und Milzen von Tieren, denen 10 Tage vor der Organentnahme SRBCs i.v. injiziert worden waren, wurde zusätzlich das Auftreten von Keimzentren (KZ) überprüft (Abbildung 12). In der unstimulierten Kontrollmilz waren die Kompartimente gut zu erkennen; die Weiße Pulpa war deutlich von der Roten Pulpa abgegrenzt (Abbildung 12A, links). Die Weiße Pulpa zeigte die typische Aufteilung in T-Zell-Areal (PALS) und B-Zell-Areal (Fo und MZ). MOMA-1⁺ metallophile Makrophagen bildeten den bekannten Ring um Follikel und PALS. Demgegenüber waren die Lymphozyten in der Roten Pulpa ohne erkennbare Strukturen untereinander vermischt. Die Transplantate wiesen strukturell kaum Unterschiede zu den Kontrollmilzen auf. Alle Kompartimente waren eindeutig zu erkennen (Abbildung 12A, rechts). Die Anteile von Weißer und Roter Pulpa waren vergleichbar und ebenso gut voneinander abzugrenzen. Follikel und PALS waren im Transplantat in gleicher Weise angeordnet wie in der Kontrollmilz und die Marginalzone war im Transplantat sehr gut über die metallophilen Makrophagen abgrenzbar. Ein wesentlicher Bestandteil des B-Zell-Areals sind Follikulär Dendritische Zellen (FDCs). Sie sind netzartig angeordnet und konnten sowohl im Kontrolltier als auch im Transplantat über anti-FDC-M1 im Bereich der Follikel nachgewiesen werden (Abbildung 12B, oben). Die Injektion von Schaferythrozyten führte zur Induktion einer Immunantwort, die im Kontrolltier zur Bildung von Keimzentren im überwiegenden Teil der Follikel führte (Abbildung 12B, unten links). Außer der damit verbundenen Zunahme des B-Zell-Areals waren keine histologischen Veränderungen erkennbar. Im Transplantat war nach Stimulation ebenfalls deutlich die Bildung von Keimzentren nachzuvollziehen (Abbildung 12B, unten rechts).

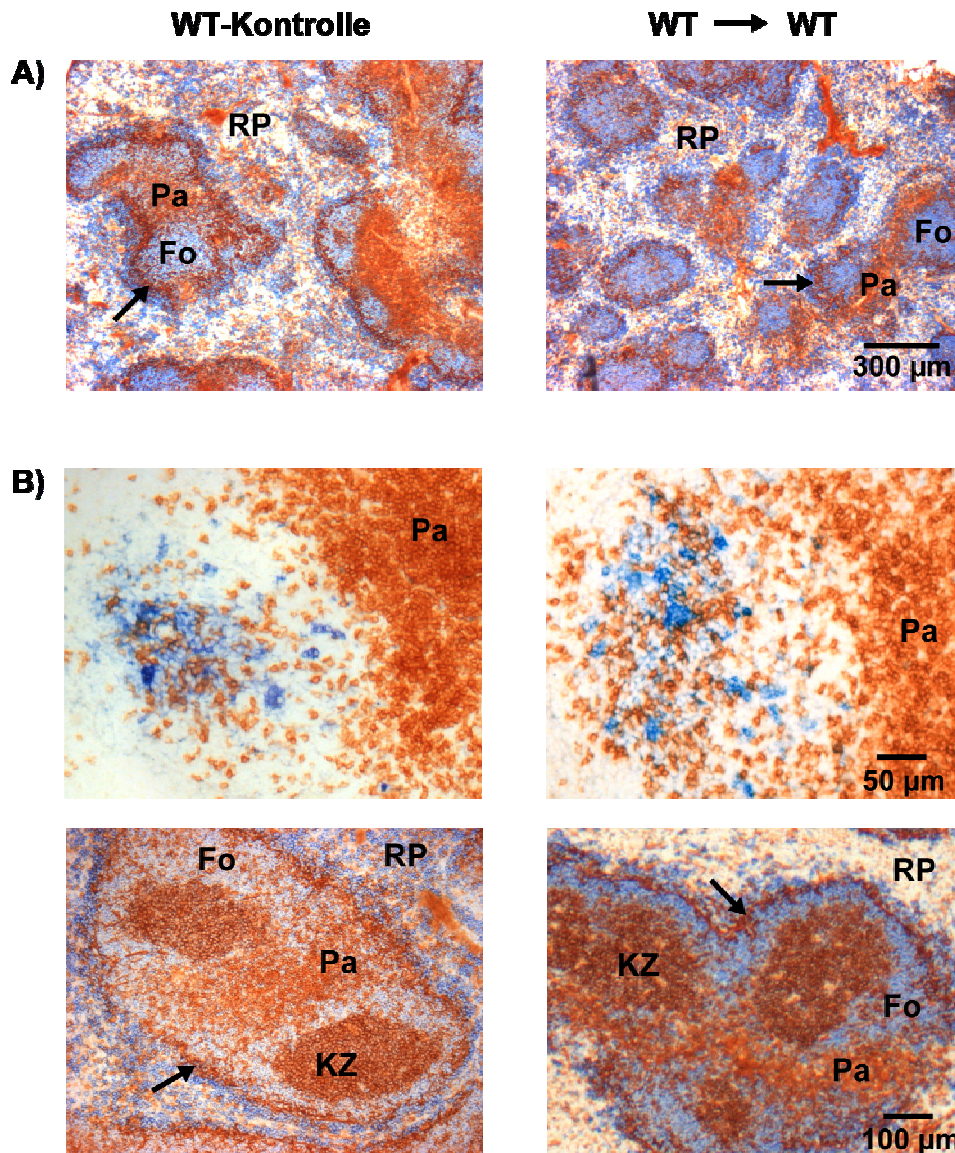


Abbildung 12: Struktur und Funktion des Transplantats gleicht der nativen Milz

A) Immunhistologisch gefärbte Kryostatschnitte einer unstimulierten, nativen WT-Milz (WT-Kontrolle, links) und eines Milztransplantats 8 Wochen nach der Transplantation in eine splenektomiertes WT-Tier (WT → WT, rechts).

blau: B-Zellen (anti-B220), hellbraun: T-Zellen (anti-TCR β), dunkelbraun: metallophile Makrophagen (anti-MOMA-1).

B) Kryostatschnitte von Tieren, denen 10 Tage vor der Organentnahme SRBCs i.v. injiziert wurden.

oben: blau: FDCs (anti-FDC-M1), hellbraun: T-Zellen (anti-TCR β).

unten: Färbung wie in A) mit zusätzlichem Nachweis von B-Zellen im Keimzentrum (PNA, dunkelbraun).

Fo: Follikel, KZ: Keimzentrum, Pa: Periarteriolen-Lymphozytenscheide (PALS), RP: Rote Pulpa, Pfeile zeigen auf die Marginalzone mit MOMA-1-positiven Makrophagen.

Größenverhältnisse sind für jedes Bildpaar im Bild rechts angegeben.

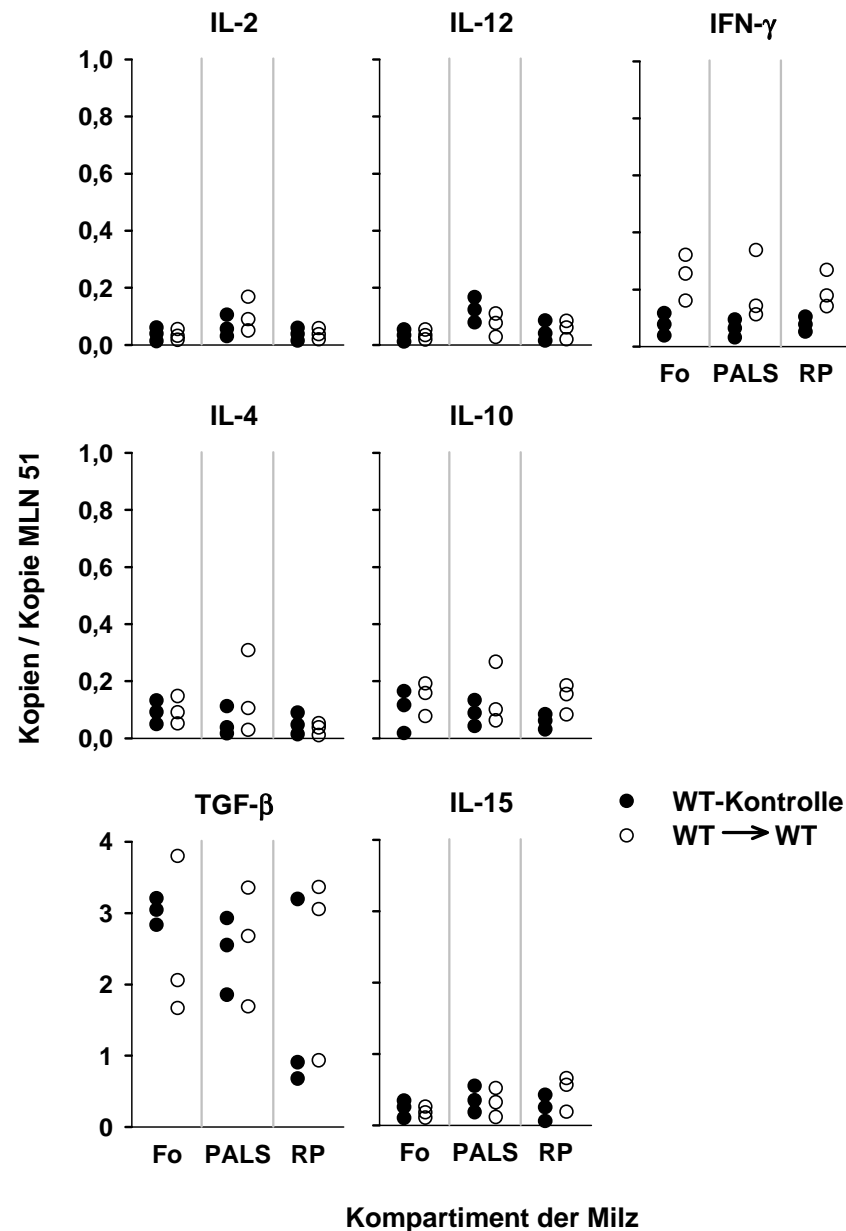


Abbildung 13: Kein Unterschied in der basalen Zytokinexpression

Expression von Zytokinen in den Kompartimenten von unstimulierten, nativen WT-Milzen (WT-Kontrolle) und Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere (WT → WT). Die Einzelwerte der mRNA-Expression von IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β und IL-15 sind in Kopien pro Kopie MLN51 für n = 3 Tiere pro Gruppe angegeben. Fo = Follikel, PALS = Periarteriöläre Lymphozytenscheide, RP = Rote Pulpa.

Die histologisch nachgewiesene Funktionalität der Milztransplantate wurde auf molekularer Ebene anhand der basalen Expression der mRNA von IL-2, -4, -10, -12, -15, IFN- γ und TGF- β in unstimulierten Milzen und Transplantaten überprüft. Da für die Funktion von lymphatischem Gewebe die Organisation der Lymphozyten in Kompartimenten von großer Bedeutung ist, wurden Follikel, PALS und Rote Pulpa mittels Mikrodissektion ausgeschnitten und getrennt analysiert (Abbildung 13). Für keines der untersuchten Zytokine ergaben sich dabei Unterschiede in der Expression zwischen Kontrollmilzen und Transplantaten; auch in den Kompartimenten war die Expression sehr gleichmäßig. Die T_H1-Zytokine IL-2, IL-12 und IFN- γ wurden auf vergleichbar niedrigem Niveau exprimiert wie die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10. TGF- β war sowohl bei Kontrolltieren als auch in den Transplantaten gegenüber T_H1- und T_H2-Zytokinen 30fach höher und damit am stärksten exprimiert. IL-15 wurde im Vergleich zu T_H1- und T_H2-Zytokinen etwa dreimal mehr und zu TGF- β dementsprechend 10mal weniger gefunden.

Acht Wochen nach der avaskulären Transplantation des Milzgewebes war das Regenerat halb so groß wie eine native Milz und enthielt deutlich weniger Leukozyten. Die Zusammensetzung der Lymphozyten und deren Expression von Oberflächenmolekülen waren dabei aber vergleichbar. In der immunhistologischen Färbung konnten in den Transplantaten alle lymphatischen Strukturen einer nativen Milz einschließlich der Marginalzone und der FDCs dargestellt werden. Nach Stimulation mit SRBCs bildeten sich in den Transplantaten Keimzentren, die in Größe und Position denen der WT-Milzen entsprachen. Die basale Zytokinexpression vervollständigte das Bild eines Transplantats, das sich grundsätzlich nicht von einer Kontrollmilz unterschied. Das Milztransplantat stellte demnach 8 Wochen nach der avaskulären Transplantation in Struktur und Funktion ein gutes Abbild der nativen WT-Milz dar und diente deshalb im weiteren Verlauf der Untersuchung als Modell für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus. An diesem Modell sollte nun die Bedeutung des Lymphotoxin- β -Rezeptors für diesen Prozess näher untersucht werden.



3.2. Zusammensetzung und Funktion von Milzgewebe im adulten Organismus sind abhängig von LTβR auf Stromazellen

LTβR^{-/-}-Mäuse haben keine Lymphknoten und in der Milz sind T- und B-Lymphozyten nicht in PALS, Follikel und Marginalzone organisiert, sondern durchmischt. Follikulär Dendritische Zellen sind nicht vorhanden und nach Stimulation mit SRBCs können auch keine Keimzentren nachgewiesen werden. Neben den strukturellen Defiziten zeichnen sich LTβR^{-/-}-Mäuse dadurch aus, dass ihnen Marginalzonen-B-Zellen sowie metallophile Makrophagen völlig fehlen und NK-Zellen um über 90 Prozent reduziert sind. Durch Transplantation von WT-Milzgewebe in LTβR^{-/-}-Empfänger sollte geklärt werden, ob die beschriebenen Defizite durch die Ontogenese festgelegt werden oder die Expression von LTβR im adulten Organismus diese beheben kann.

3.2.1. C57BL/6 und LTβR^{-/-}-Tiere sind isogen

Um Unverträglichkeiten in der Histokompatibilität zwischen den Mausstämmen auszuschließen, wurde zunächst ein Isohistogenitätstest mittels Transplantation von Schwanzhaut durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Isohistogenitätsnachweis über Hauttransplantationen

Spender	Empfänger	Annahme	Abstoßung
Balb/c	C57BL/6	0	4
C57BL/6	C57BL/6	4	0
LTβR ^{-/-}	C57BL/6	5	0
C57BL/6	LTβR ^{-/-}	5	0
Beispiele für je ein angenommenes (links) und abgestoßenes Transplantat (rechts)			

Die Begutachtung der Transplantate wurde nach der angegebenen Scoring-Tabelle (Tabelle 1) vorgenommen und ihrem Erscheinungsbild entsprechend als Annahme oder Abstoßung gewertet.

Als allogene Kontrolle diente hierbei die Transplantation der Haut von Balb/c (MHC-haplotyp d) auf C57BL/6 (MHC-haplotyp b). Die isogene Kontrolle waren Transplantationen zwischen C57BL/6 und der Isohistogenitätstest fand als Überkreuz-Transplantation zwischen C57BL/6 und $LT\beta R^{-/-}$ statt. In jeder Gruppe wurden $n = 5$ Tiere transplantiert. Sowohl aus der allogenen als auch aus der isogenen Kontrollgruppe erhielt jeweils ein Tier den Score 0, da sie sich das Transplantat abgebissen hatten und somit aus der Untersuchung ausgeschlossen werden mussten. Tabelle 6 zeigt, dass in der allogenen Kontrollgruppe alle Transplantate abgestoßen wurden. Zwei Wochen nach Transplantation befanden sich alle Transplantate dieser Gruppe in der Phase der akuten Abstoßung. Bis 100 Tage nach der Transplantation zeigten sich sowohl bei der isogenen Kontrollgruppe als auch bei den beiden Testgruppen keine Anzeichen chronischer oder gar akuter Abstoßungsreaktionen. Sie wurden deshalb als isogen beurteilt.

3.2.2. MZ B-Zellen aber nicht NK-Zellen sind abhängig von $LT\beta R$ in der Milz

Acht Wochen nach Transplantation von WT-Milzgewebe in splenektomierte $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger waren bei der Organentnahme keine Anzeichen von entzündlichen Reaktionen nachweisbar; das $WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$ Transplantat glich in Farbe und Textur dem $WT \rightarrow WT$ Transplantat.

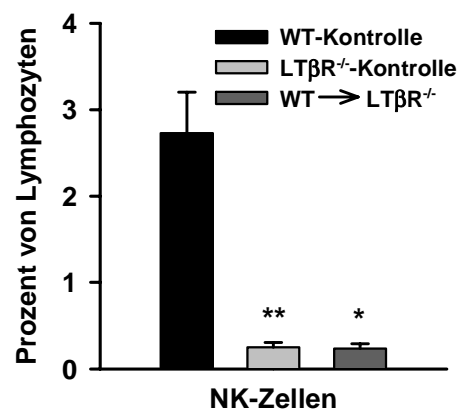


Abbildung 14: Keine Rekonstitution von NK-Zellen durch Expression von $LT\beta R$ im Milzgewebe

Prozentualer Anteil der NK-Zellen an den Gesamtlymphozyten in nativen WT- (WT-Kontrolle) und $LT\beta R^{-/-}$ -Milzen ($LT\beta R^{-/-}$ -Kontrolle) sowie WT-Transplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere ($WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$). Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ bis 7 Tieren; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Die Untersuchung im Durchflusszytometer sollte Aufschluss darüber geben, ob die Expression von LTβR im Milzgewebe zu einer Rekonstitution der im Knockout-Tier reduzierten NK- und fehlenden MZ B-Zellen geführt hatte. Abbildung 14 zeigt, dass trotz vorhandenem LTβR im Transplantat die Population der NK-Zellen weiterhin kaum vorhanden war. Verglichen mit der WT-Kontrolle, bei der die NK-Zellen deutlich nachweisbar waren, war sowohl in der LTβR^{-/-}-Kontrolle als auch bei WT → LTβR^{-/-} der Anteil NK1.1 positiver Zellen um über 90 Prozent reduziert.

Ein völlig anderes Ergebnis lieferte die Untersuchung der Marginalzonen-B-Zellen (Abbildung 15). Innerhalb der B Lymphozyten der Milz von WT-Kontrolltieren konnten die MZ-B-Zellen klar als CD21 positive, CD23 negative Population abgegrenzt werden (Abbildung 15, links), während in der Milz von LTβR^{-/-}-Kontrolltieren diese Zellen völlig fehlten (Abbildung 15, Mitte).

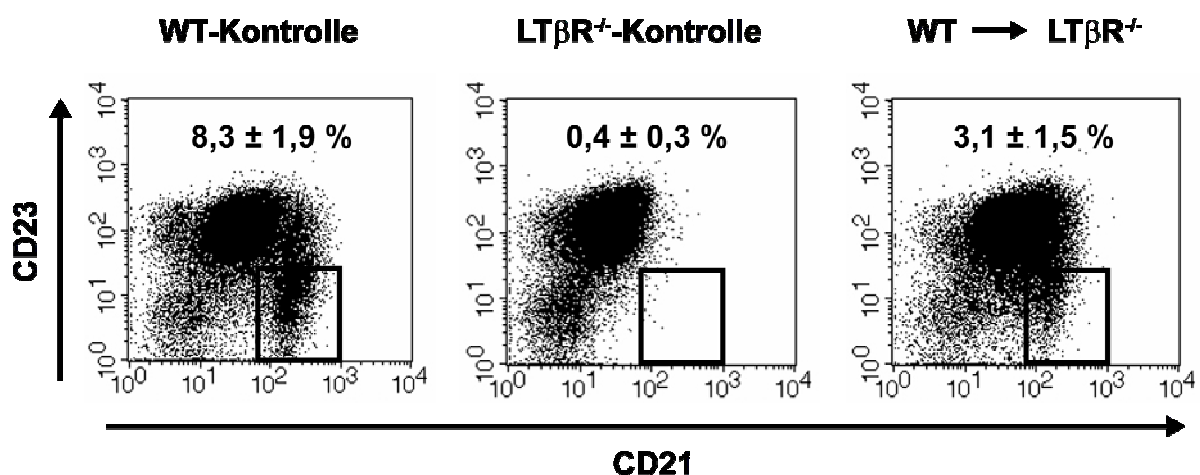


Abbildung 15: Entwicklung von MZ-B-Zellen durch Expression des LTβR im Milzgewebe des adulten Organismus

Nachweis der CD21⁺CD23⁻ Marginalzonen-B-Zellen (Rechteck) innerhalb der B-Zellen von nativen WT- (WT-Kontrolle, links) und LTβR^{-/-}-Milzen (LTβR^{-/-}-Kontrolle, Mitte) sowie WT-Transplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte LTβR^{-/-}-Tiere (WT → LTβR^{-/-}, rechts) im Durchflusszytometer. Prozentzahlen sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 3 bis 7 Tieren.

Im Transplantat von WT → LTβR^{-/-} (Abbildung 15, rechts) waren dagegen eindeutig MZ-B-Zellen in einer Menge nachweisbar, die der von WT → WT entsprach (siehe 3.1.4). Die Expression von LTβR im Milzgewebe hatte also im adulten Tier zur Bildung dieser ursprünglich nicht vorhandenen Zellpopulation geführt. Die durchflusszytometrische

Analyse der anderen Lymphozytensubpopulationen ergab, bis auf die hier genannten, keine weiteren Unterschiede zwischen WT-Kontrolle, $LT\beta R^{-/-}$ -Kontrolle und $WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$. Obwohl, wie bereits gezeigt, das Transplantat nach der nekrotischen Phase und Anschluss an das Blutgefäßsystem von den Leukozyten neu besiedelt wird (3.1.1), sollte insbesondere wegen der Entwicklung von MZ-B-Zellen bei $WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$ geklärt werden, ob Leukozyten aus der Spendermilz zur Regeneration beitragen. Zu diesem Zweck wurde Milzgewebe von C57BL/6-Ly5.1-Mäusen (kongen für CD45) in $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse transplantiert. Die Leukozyten des Spenders konnten hierbei über den kongenen Marker CD45.1 von den Zellen des Empfängers im Durchflusszytometer unterschieden werden.

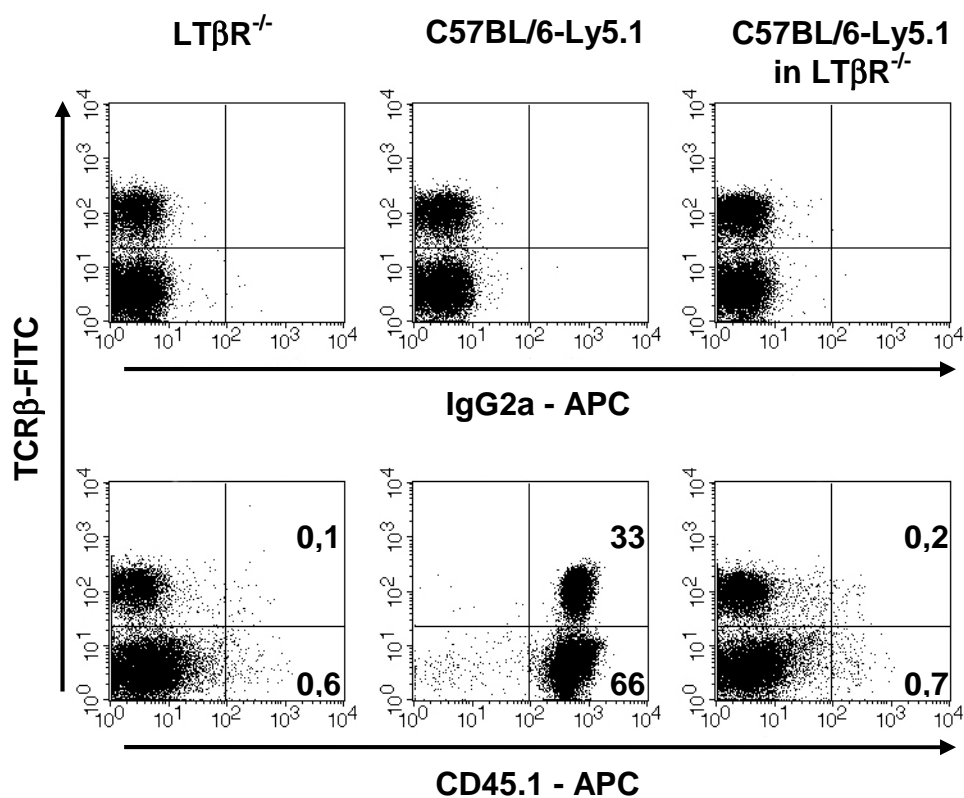


Abbildung 16: Regeneration des Transplantats erfolgt durch Lymphozyten des Empfängers

CD45.1-positive Leukozyten in der Milz von unbehandelten $LT\beta R^{-/-}$ (links), unbehandelten, kongenen C57BL/6-Ly5.1-Tieren (Mitte) und C57BL/6-Ly5.1-Transplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger (C57BL/6-Ly5.1 in $LT\beta R^{-/-}$, rechts). Die isolierten Leukozyten wurden mit anti-TCR β und entweder IgG2a-Isotypkontrolle (obere Reihe) oder anti-CD45.1 (untere Reihe) angefärbt und anschließend im FACS gemessen. Die Zahlen stellen die Mittelwerte für CD45.1 positive Zellen in Prozent dar mit $n = 3$ für alle Gruppen.

Obschon der Antikörper gegen den kongenen Marker CD45.1 trotz der Blockierungsschritte im Färbeprotokoll eine leichte unspezifische Bindung zeigte (Abbildung 16, links), konnten dennoch die kongenen Zellen eindeutig identifiziert werden (Abbildung 16, Mitte). Dabei stellte sich heraus, dass 8 Wochen nach der Transplantation nur noch Leukozyten des Empfängers im Regenerat zu finden waren (Abbildung 16, rechts). Dieses Resultat belegt, dass die Präsenz von Marginalzonen-B-Zellen im Transplantat von WT \rightarrow LT β R^{-/-} nicht auf dem Überleben der eingebrachten Zellen beruhte, sondern tatsächlich eine Neubildung dieser Zellen im Knockout-Tier stattgefunden hatte.

3.2.3. Kompartimente und Keimzentren sind abhängig von LT β R in der Milz

Nachfolgend sollte immunhistologisch geklärt werden, ob und inwieweit die strukturellen und die damit verbundenen funktionalen Defizite in der Milz von LT β R^{-/-}-Tieren durch die Expression des Rezeptors im adulten Tier beseitigt werden konnten (Abbildung 17). Der Nachweis von FDCs in WT \rightarrow LT β R^{-/-}-Transplantaten zeigte, dass für WT-Kontrollen typische Strukturen, die in LT β R^{-/-}-Tieren fehlen, durch LT β R-Expression wieder hergestellt werden können (Abbildung 17, oben). In der Milz von WT-Tieren waren Rote und Weiße Pulpa deutlich durch die Marginalzone und die metallophilen Makrophagen voneinander getrennt. Innerhalb der Weißen Pulpa konnten PALS und Follikel klar unterschieden werden und nach Stimulation mit Schaferythrozyten (SRBCs) bildeten sich in den Follikeln gut erkennbare Keimzentren (Abbildung 17, unten links). Bei LT β R^{-/-}-Tieren konnten Bereiche mit Anhäufungen von Lymphozyten von mehr unstrukturierten Bereichen unterschieden werden, die als Weiße und Rote Pulpa bezeichnet wurden. Es gab jedoch keine Abgrenzung durch eine Marginalzone mit metallophilen Makrophagen, die völlig fehlten. T- und B-Lymphozyten waren stark durchmischt anstatt in Kompartimenten organisiert zu sein (Abbildung 17, unten Mitte). Die Stimulation mit SRBCs führte zu keinen erkennbaren Anzeichen von Keimzentren. Im Transplantat von WT \rightarrow LT β R^{-/-} waren Weiße und Rote Pulpa dagegen deutlich voneinander getrennt und die metallophilen Makrophagen waren klar an deren Grenze nachzuweisen (Abbildung 17, unten rechts). T- und B-Zellen waren innerhalb der Weißen Pulpa in PALS und Follikel organisiert und nach Injektion von SRBCs hatten sich Keimzentren gebildet, die in Größe und Position mit denen der WT-Kontrollen vergleichbar waren.

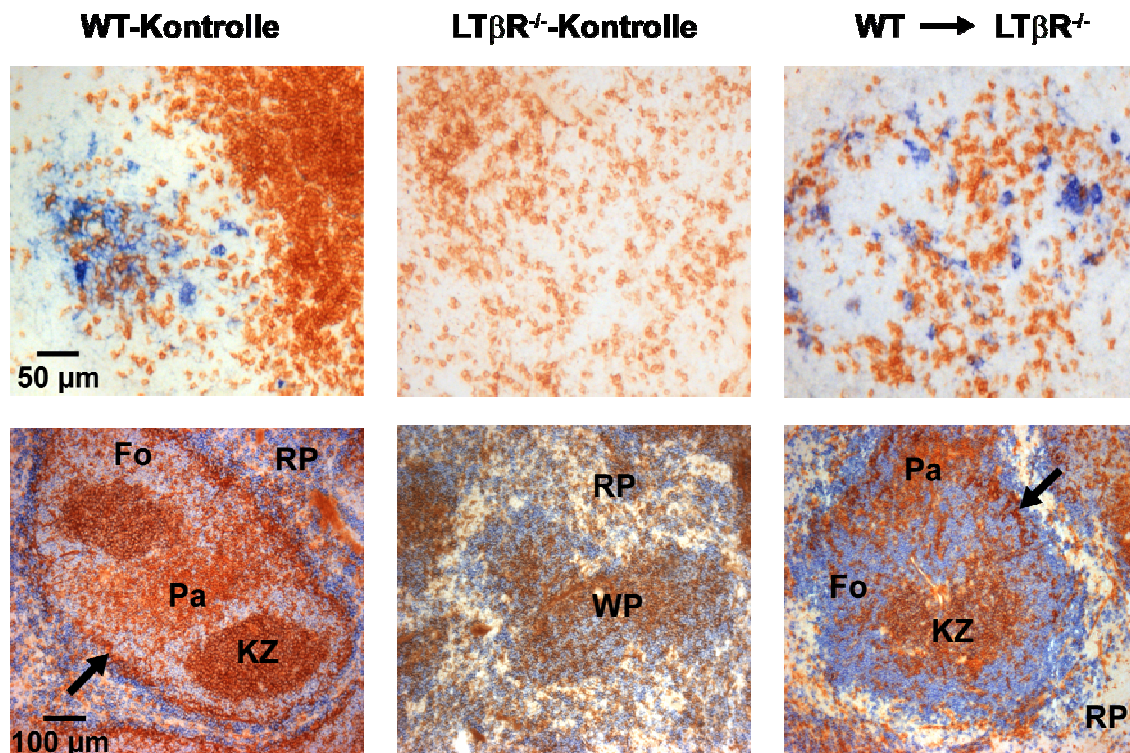


Abbildung 17: Struktur und Funktion von Milzgewebe im adulten Organismus sind abhängig von $LT\beta R$

Immunhistologisch gefärbte Kryostatschnitte von Milzgewebe einer WT-Maus (links), $LT\beta R^{-/-}$ -Maus (Mitte) und eines WT-Transplantats 8 Wochen nach der Transplantation in ein splenektomiertes $LT\beta R^{-/-}$ -Tier ($WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$, rechts). Zehn Tage vor der Organentnahme wurden den Tieren i.v. SRBCs injiziert.

oben: blau: FDCs (anti-FDC-M1), hellbraun: T-Zellen (anti-TCR β)

unten: blau: B-Zellen (anti-B220), hellbraun: T-Zellen (anti-TCR β), dunkelbraun: metallophile Makrophagen (anti-MOMA-1) und B-Zellen im Keimzentrum (PNA)

Fo: Follikel, KZ: Keimzentrum, Pa: Periarterioläre Lymphozytenscheide (PALS), RP: Rote Pulpa, Pfeile zeigen auf die Marginalzone mit MOMA-1-positiven Makrophagen.

Größenverhältnisse für jede Bildreihe sind jeweils im linken Bild angegeben.

Die Präsenz des $LT\beta R$ im Milzgewebe hatte also nicht nur zur Entwicklung der MZ B-Zellen geführt, sondern auch die Struktur und Funktionalität zeigten sich von ihm abhängig.

$LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse zeichnen sich durch eine eingeschränkte humorale Immunantwort aus. Die Untersuchung des basalen Zytokinmilieus sollte zeigen, ob hier schon vor der Aktivierung spätere Defekte in der Immunantwort sichtbar werden. IL-15 ist darüber hinaus essentiell für das Überleben der NK-Zellen und daher sollte auch geklärt werden, ob ein erniedrigter IL-15-Spiegel zumindest teilweise dafür verantwortlich sein könnte, dass NK-Zellen in

LTβR^{-/-}-Mäusen fehlen. Durch Überprüfung der Zytokinexpression des WT → LTβR^{-/-}-Transplantats sollte geprüft werden, ob etwaige Unterschiede zwischen WT- und LTβR^{-/-}-Kontrollen durch LTβR in der Milz korrigierbar waren.

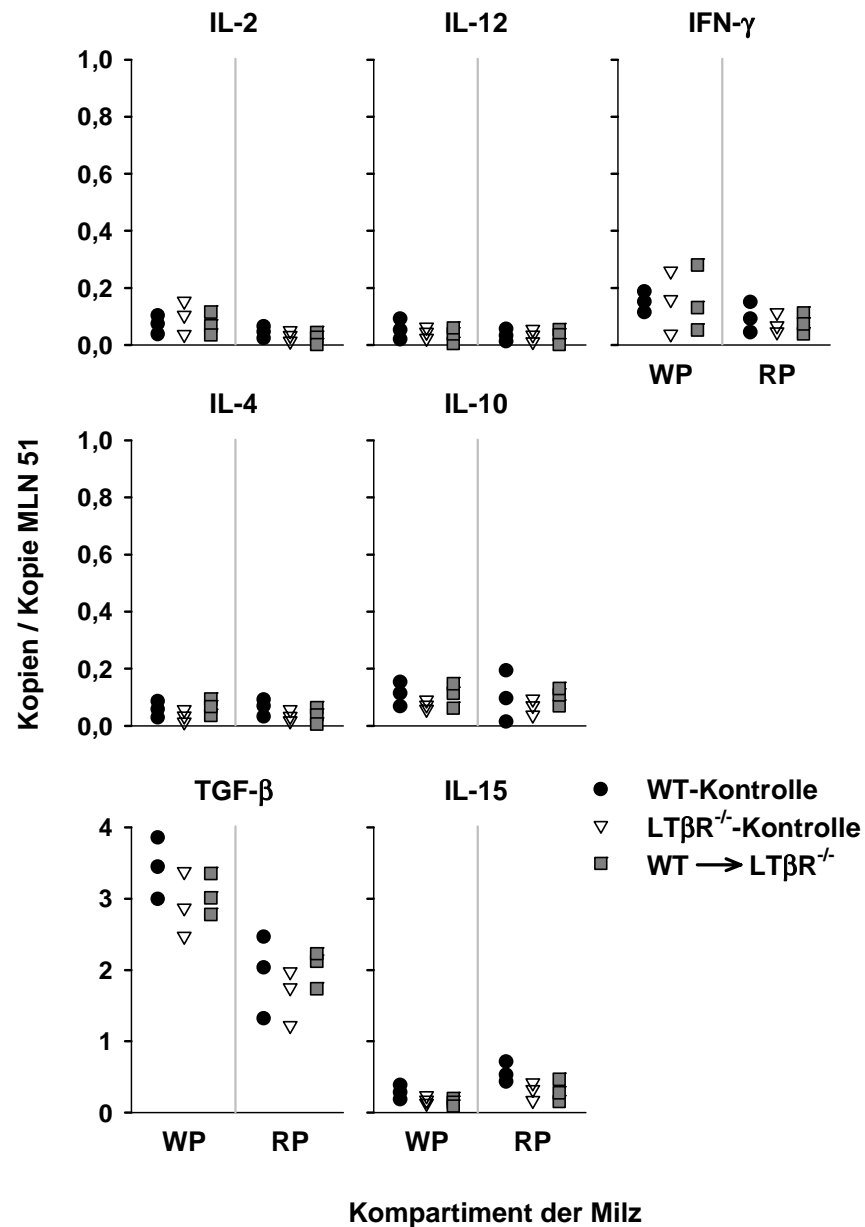


Abbildung 18: LTβR im Milzgewebe hat keinen Einfluss auf die basale Zytokinexpression

Expression von Zytokinen in den Kompartimenten von unstimulierten, nativen WT- (WT-Kontrolle) und LTβR^{-/-}-Milzen (LTβR^{-/-}-Kontrolle) sowie WT-Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte LTβR^{-/-}-Tiere (WT → LTβR^{-/-}). Die Einzelwerte der mRNA-Expression von IL-2, IL-12, IFN-γ, IL-4, IL-10, TGF-β und IL-15 sind in Kopien pro Kopie MLN51 für n = 3 Tiere pro Gruppe angegeben. WP = Weiße Pulpa, RP = Rote Pulpa

Da $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere keine Trennung von T- und B-Zell-Areal aufwiesen, dichtere Ansammlungen aber als Weiße Pulpa identifizierbar waren (Abbildung 17), wurden Weiße und Rote Pulpa von WT- und $LT\beta R^{-/-}$ -Kontrollen sowie von WT \rightarrow $LT\beta R^{-/-}$ mit der Mikrodissektion ausgeschnitten und die Zytokinexpression analysiert. Abbildung 18 macht deutlich, dass für keines der untersuchten Zytokine Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellbar waren. Im Vergleich zu WT-Kontrollen war die Zytokinexpression in $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren und WT \rightarrow $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantaten in beiden untersuchten Kompartimenten gleich hoch. Es konnten also keine Hinweise dafür gefunden werden, dass eine verringerte basale Expression von Zytokinen die eingeschränkte Immunantwort oder das Fehlen der NK-Zellen andeutete.

Die Transplantation von WT-Milzgewebe in $LT\beta R^{-/-}$ -Empfängertiere zeigte, dass für die Entwicklung von NK-Zellen nicht die $LT\beta R$ -Expression innerhalb, sondern außerhalb der Milz wichtig ist. Im Gegensatz dazu beruhte die Entwicklung der MZ B-Zellen und Keimzentren nur auf der Expression des $LT\beta R$ in der Milz. Aus der Expression der untersuchten Zytokine ließ sich keine Bedeutung für die Struktur und, umgekehrt aus der Struktur, keine Bedeutung für die Zytokinexpression ableiten. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Lymphotoxin- β -Rezeptor auf den Stromazellen der Spendermilz sowohl für die Entwicklung der MZ-B-Zellen als auch für die lymphatische Struktur und Funktionalität des Regenerats verantwortlich war. Die Bedeutung des $LT\beta R$ für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus wurde daraufhin eingehend anhand des etablierten Modells untersucht.

3.3. Der Lymphotoxin- β -Rezeptor ermöglicht und begrenzt die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus

Die zentrale Frage dieser Arbeit, welche Rolle der LT β R im Milztransplantat für dessen Regeneration spielt, wurde nun über die Transplantation von Milzgewebe aus LT β R^{-/-}-Tieren in splenektomierte WT-Mäuse und deren Vergleich mit den korrespondierenden WT-Transplantaten beurteilt. Andererseits wird der Rezeptor aber auch außerhalb des Transplantats (z.B. in Lymphknoten) exprimiert. Inwieweit diese Expression von LT β R die Regeneration des Transplantats beeinflusst, wurde durch den Vergleich mit WT-Transplantaten in splenektomierte LT β R^{-/-}-Mäuse ermittelt.

Bereits bei der Organentnahme wurde deutlich, dass sowohl die Präsenz des LT β R im Transplantat als auch im Empfänger erheblichen Einfluss auf das Ergebnis hatte (Abbildung 19).

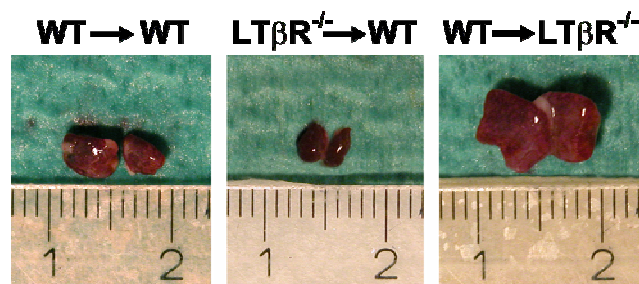


Abbildung 19: Unterschiedliche Größe der Milztransplantate in Abhängigkeit von LT β R

Entnommene Milztransplantate der verschiedenen Versuchsgruppen 8 Wochen nach der Operation. WT \rightarrow WT bedeutet WT-Transplantat in splenektomiertem WT-Empfänger. Die gleiche Lesart gilt auch für die anderen Gruppen. Die zum Vergleich abgebildete Skala ist in cm angegeben.

War der Rezeptor sowohl im Transplantat als auch im Empfänger vorhanden (WT \rightarrow WT), dann erreichte das Regenerat eine mittlere Größe. Fehlte der Rezeptor im Transplantat, war aber im Empfänger vorhanden (LT β R^{-/-} \rightarrow WT), war das gefundene Gewebe sehr klein. Im umgekehrten Fall (WT \rightarrow LT β R^{-/-}) wuchs das Transplantat dagegen zu einer erstaunlichen Größe heran. Abbildung 20 zeigt, dass sich die Größenunterschiede sowohl im Gewicht als auch in der Leukozytenzahl widerspiegeln. Im Vergleich zum WT-Transplantat erreichte das LT β R^{-/-}-Transplantat im WT-Empfänger nur 40 Prozent des Gewichts. Betrachtet man

die Leukozytenzahl, dann wird die mangelnde Fähigkeit zur Regeneration noch deutlicher. Das Knockout-Transplantat erreichte hier nur etwa 6 Prozent des Werts des WT-Transplantats. Fehlte der Rezeptor im Transplantat, war die Regeneration offensichtlich nicht möglich. Ein völlig anderes Bild ergibt sich bei der Betrachtung im $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger. Fehlte der Rezeptor im Empfänger, war im Transplantat aber vorhanden ($WT \rightarrow LT\beta R$), wurde das Regenerat mit 115 mg etwa zweieinhalb mal so groß wie bei $WT \rightarrow WT$ und übertraf sogar die WT-Kontrollmilz (91 mg; $p < 0,05$; s. Anhang Tabelle 8). Die Leukozytenzahl war absolut betrachtet zwar höher, bezogen auf das Gewicht erreichten aber beide WT-Transplantate den gleichen Wert (ca. 4×10^5 Leukozyten/mg). Die Besiedlung mit Leukozyten fand also in den WT-Transplantaten in gleicher Dichte statt, aber die Präsenz des Lymphotoxin- β -Rezeptors im Empfänger beeinflusste das Wachstum des Milzgewebes.

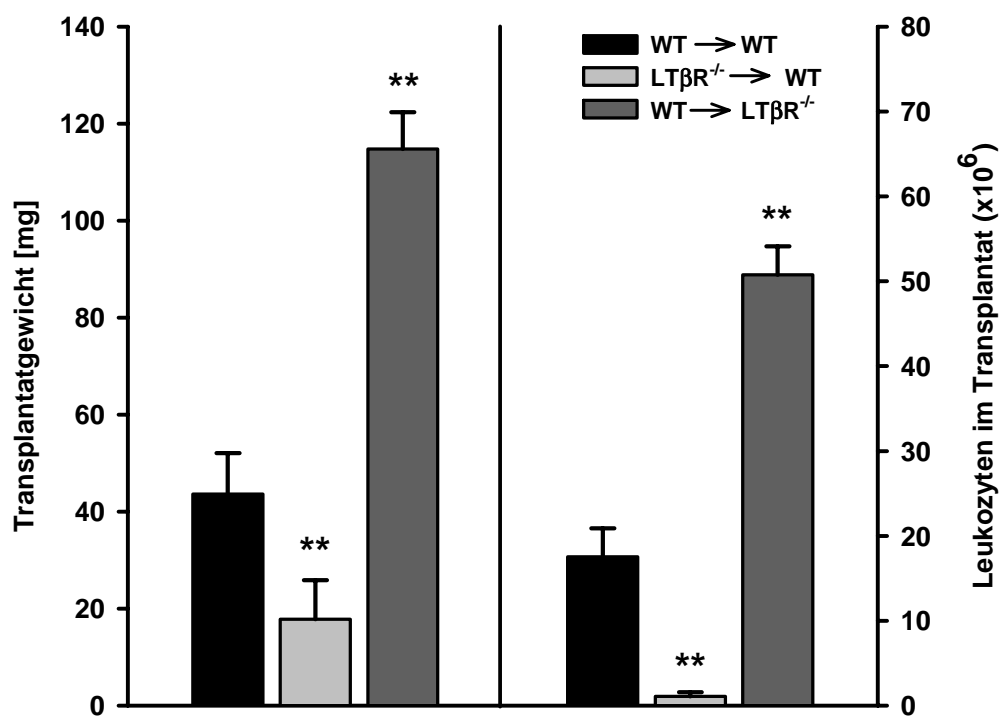


Abbildung 20: Transplantatgewicht und Leukozytenzahl in Abhängigkeit von $LT\beta R$

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) von Milztransplantaten 8 Wochen nach Transplantation in splenektomierte Empfängertiere. $WT \rightarrow WT$ bedeutet WT-Transplantat in WT-Empfänger. Die gleiche Lesart gilt auch für die anderen Gruppen. Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 4$ bis 9 Tieren. ** = $p < 0,01$ gegen $WT \rightarrow WT$

Transplantiertes Milzgewebe konnte sich im WT-Empfänger also nur regenerieren, wenn der Lymphotoxin- β -Rezeptor in ihm exprimiert wurde. Sowohl die Transplantation von WT \rightarrow WT als auch WT \rightarrow LT β R^{-/-} zeigte, dass es dann zur Wiederherstellung der Struktur und Funktion des lymphatischen Gewebes kam (siehe 3.1.2, Abbildung 17). Offensichtlich hing die Entwicklung des Gewebes nach Transplantation aber auch von der Expression von LT β R im Empfänger ab, da das Fehlen des Rezeptors hier eine positive Auswirkung auf Gewicht und Leukozytenzahl des Transplantats hatte. Das heißt umgekehrt, dass der im Empfänger exprimierte LT β R die Entwicklung von lymphatischem Gewebe hemmte. Offensichtlich bestand die Aufgabe des LT β R also nicht nur in der Gewährleistung der Struktur und Funktion von lymphatischem Gewebe, sondern auch in dessen Begrenzung.

3.4. Hemmung der Milzregeneration durch LT β R

Die Beobachtung, dass die Expression von LT β R im Empfänger einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von lymphatischem Gewebe hat, führte zu der Hypothese, dass eine vorhandene WT-Milz die Regeneration eines zusätzlich eingefügten Milztransplantats unterdrücken würde, während dies bei der LT β R^{-/-}-Milz nicht der Fall wäre. Um dies zu überprüfen, wurden WT-Transplantate sowohl in WT-Empfänger als auch in LT β R^{-/-}-Empfänger eingebracht und mit den Ergebnissen verglichen, die bei Transplantation in die entsprechenden, vorher splenektomierten Empfänger erhoben wurden.

3.4.1. Hemmung durch LT β R in eigener Milz

Die Ergebnisse zeigten, dass die eigene Milz die Regeneration des Transplantats unterdrückte (Abbildung 21). Im Vergleich zur Transplantation nach Splenektomie erreichte das WT-Transplantat im WT-Empfänger, dem die eigene Milz belassen, wurde nur ein Viertel des Gewichts. Bei den Leukozyten wurden nur knapp 10 Prozent der Anzahl von Transplantaten aus splenektomierten Tieren erreicht. Die eigene Milz des Empfängers verhinderte also das Wachstum eines zusätzlichen Organs, obwohl der LT β R im Transplantat vorhanden war.

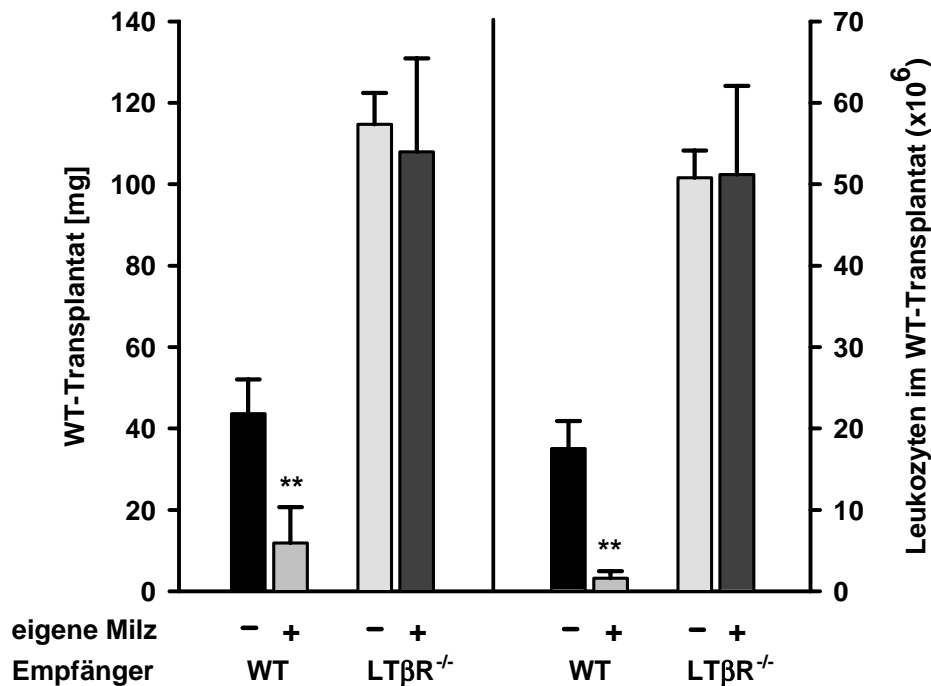


Abbildung 21: Unterdrückung von lymphatischem Gewebe durch Expression von LTβR in eigener Milz

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) von Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation splenektomierte (eigene Milz -) und nicht splenektomierte (eigene Milz +) WT- und LTβR^{-/-}-Empfängertiere. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 4 bis 9 Tieren pro Gruppe. ** = p < 0,01

Die Frage, ob dieser Mechanismus vom Lymphotoxin-β-Rezeptor in der eigenen Milz abhängt, konnte ebenfalls beantwortet werden. Die WT-Transplantate im LTβR^{-/-}-Empfänger erreichten das gleiche Gewicht und die identische Leukozytenzahl, unabhängig davon, ob dem Empfänger seine eigene Milz belassen wurde oder nicht (Abbildung 21). Die eigene Milz der LTβR^{-/-}-Maus beeinflusste die Regeneration des Transplantats also nicht; damit konnte gezeigt werden, dass der Lymphotoxin-β-Rezeptor in der eigenen Milz von WT-Tieren für deren hemmenden Einfluss auf das Transplantat verantwortlich war.

3.4.2. Hemmung durch LTβR in Milz und Lymphknoten

Aus dem Nachweis, dass der LTβR in der Milz das Wachstum von lymphatischem Gewebe hemmt, folgte – zusammen mit dem Befund, dass ein WT-Transplantat im LTβR^{-/-}-Empfänger wesentlich größer wurde als im WT-Empfänger – die Hypothese, dass die Expression des Rezeptors in anderen Organen ebenfalls einen unterdrückenden Effekt auf sich entwickelndes, lymphatisches Gewebe hatte. Neben der Milz wird der LTβR vor

allem in Lymphknoten exprimiert. Im Folgenden sollte deshalb die Regeneration von WT-Milztransplantaten in vier verschiedenen Gruppen analysiert werden, bei denen die Empfänger den LT β R jeweils unterschiedlich in Milz und Lymphknoten exprimierten (Abbildung 22). Erstens, in solchen Empfängern, die den Rezeptor sowohl in der Milz als auch im Lymphknoten besaßen. Dies entsprach den WT-Tieren, denen die eigene Milz bei Einsatz des Transplantats belassen wurde (Abbildung 22, ganz links). Zweitens, in den Tieren, die den Rezeptor in den Lymphknoten, nicht aber in der Milz exprimierten, was den splenektomierten WT-Empfängern entsprach (Abbildung 22, 2. von links). Drittens, in solchen Empfängern, die den LT β R zwar in der Milz, nicht aber in den Lymphknoten exprimierten. Um diese zu erhalten, wurden mit der Transplantation von WT-Milz in LT β R^{-/-}-Mäuse Hybridtiere geschaffen, die nach 8 Wochen der Regeneration als Empfängertiere dienten (Abbildung 22, 2. von rechts). Viertens, in den Tieren, die weder in der Milz noch im Lymphknoten den Rezeptor exprimierten, was den LT β R^{-/-}-Tieren entsprach (Abbildung 22, ganz rechts). In Abbildung 22 lässt sich ablesen, dass die Bildung von lymphatischem Gewebe in Abhängigkeit von bereits vorhandenem LT β R exprimierendem Gewebe gehemmt wurde. Die maximale Hemmung wurde erreicht, wenn sowohl Milz als auch Lymphknoten den Rezeptor exprimierten. Die Präsenz des Rezeptors in der Milz oder den Lymphknoten allein ermöglichte das Wachstum von lymphatischem Gewebe in etwa dem gleichen Ausmaß. Die Gewichte der Transplantate in splenektomierte WT-Empfänger (Abbildung 22, 2. von links) und in die Hybridtiere (Abbildung 22, 2. von rechts) zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die maximale Ausdehnung, die transplantiertes Milzgewebe annehmen konnte, wurde durch das Gewicht der Transplantate repräsentiert, die in einem Empfänger ohne LT β R-Expression gewachsen waren. Dabei entsprach die Summe der Gewichte der Transplantate, die entweder in Gegenwart LT β R-exprimierender Milz (67 mg) oder Lymphknoten (44 mg) gewachsen waren, dem Gewicht des Transplantats, das im Empfänger ohne LT β R-Expression (115 mg) gewachsen war.

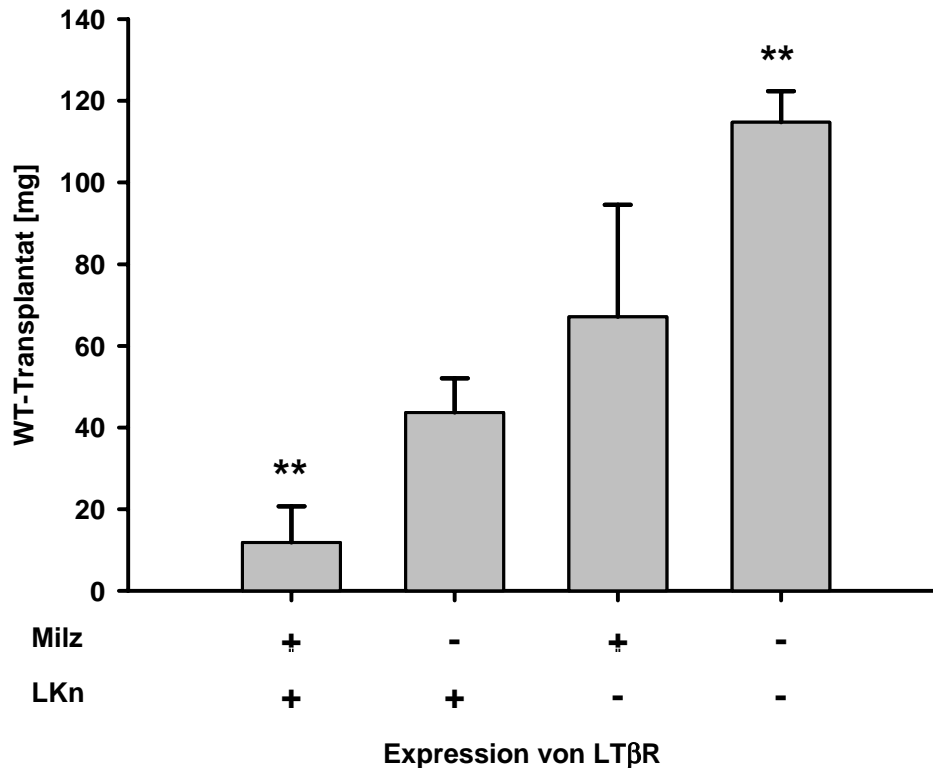


Abbildung 22: Die Gesamtmenge an bereits vorhandenem LTβR bestimmt das Ausmaß der Regeneration

Gewicht von Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in Abhängigkeit von der Präsenz des LTβR in Milz und Lymphknoten (LKn) des Empfängers. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 4 bis 9 pro Gruppe. ** = p < 0,01 gegenüber beiden mittleren Gruppen.

Dies ließ den Schluss zu, dass die Gesamtmenge an LTβR exprimierendem, lymphatischem Gewebe eine konstante Größe darstellte, die sehr strikt reguliert wurde. Wenn dies der Fall war, dann spielte es für die Größe des Regenerats keine Rolle wie viel Milzgewebe für die Transplantation verwendet wurde, denn letztlich wäre das Gewicht durch das bereits vorhandene LTβR exprimierende Gewebe vorherbestimmt und würde auch bei unterschiedlichsten Mengen an Transplantat zur etwa gleichen Größe des Regenerats führen. Das heißt, die eingesetzte Menge an Transplantat und die Größe des erhaltenen Regenerats würden nicht korrelieren.

3.4.3. Das Endgewicht des Transplantats ist unabhängig von der transplantierten Menge

Die Hypothese, dass die transplantierte Menge an Milzgewebe nicht mit dem Endgewicht des Regenerats korreliert, wurde durch die Transplantation definierter Mengen an Milzgewebe in splenektomierte WT-Empfänger überprüft. Bei der Organentnahme 8 Wochen nach der Operation zeigte sich, dass kein Zusammenhang zwischen der transplantierten Menge und dem Endgewicht des Transplantats bestand (SPEARMAN $\rho = -0,10$). Sowohl die geringste (36 mg) als auch die größte Einsatzmenge (63 mg) führte zu einem Endgewicht von etwa 47 mg (Abbildung 23).

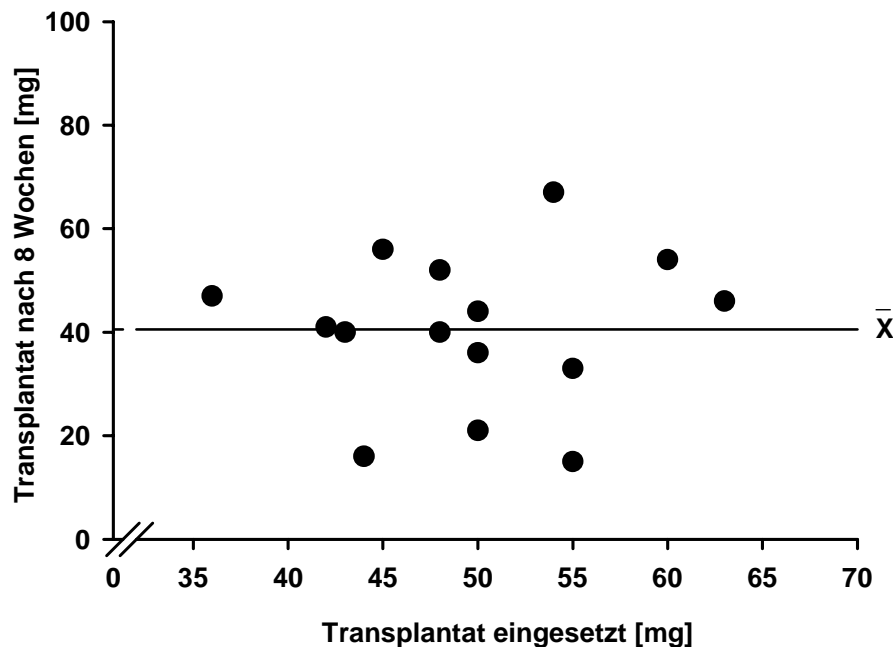


Abbildung 23: Kein Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge und Endgewicht des Transplantats

Gewichte von WT-Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte WT-Tiere in Abhängigkeit von der transplantierten Menge. Jeder Punkt stellt ein Transplantat dar, dessen Koordinaten durch das Anfangsgewicht (Abszisse) und Endgewicht (Ordinate) bestimmt sind. Der Korrelationskoeffizient nach SPEARMAN betrug $\rho = -0,10$. Die Hilfslinie stellt den Mittelwert ($n = 15$) dar.

Die eingesetzten Transplantatmengen, die zwischen diesen beiden Extremen lagen, führten zu Regeneraten, die mit ihrem Gewicht eng um den Mittelwert streuten. Dieser entsprach mit 41 mg dem Mittelwert der Regenerate, der für die gleiche Versuchsgruppe (WT → WT, 44 mg) ohne Kontrolle der transplantierten Menge erzielt wurde. Es konnte

also klar gezeigt werden, dass die Menge an transplantiertem Milzgewebe nicht mit dessen Endgewicht korrelierte, sondern vielmehr von der Menge an vorhandenem $LT\beta R$ -exprimierendem Gewebe abhing (Abbildung 22). Da diese aber nur über das Blutgefäßsystem verbunden waren, konnte daraus geschlossen werden, dass es einen Faktor geben musste, der direkt von der Expression des $LT\beta R$ abhing, ins Blut abgegeben wurde und so die Bildung von lymphatischem Gewebe unterdrückte.

Wenn also der hemmende Faktor über den Blutkreislauf verteilt wurde, sollte dieser im Blutplasma von WT-Tieren vorhanden sein, während er in $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren fehlen müsste. Mit einem weiteren Versuch sollte deshalb geklärt werden, ob die hemmende Wirkung durch Injektionen von WT-Plasma vermittelt werden konnte. Hierzu wurde WT-Milzgewebe in splenektomierte $LT\beta R^{-/-}$ -Empfängertiere transplantiert und während der 8wöchigen Regenerationsphase zweimal wöchentlich entweder WT- oder $LT\beta R^{-/-}$ -Plasma intraperitoneal injiziert.

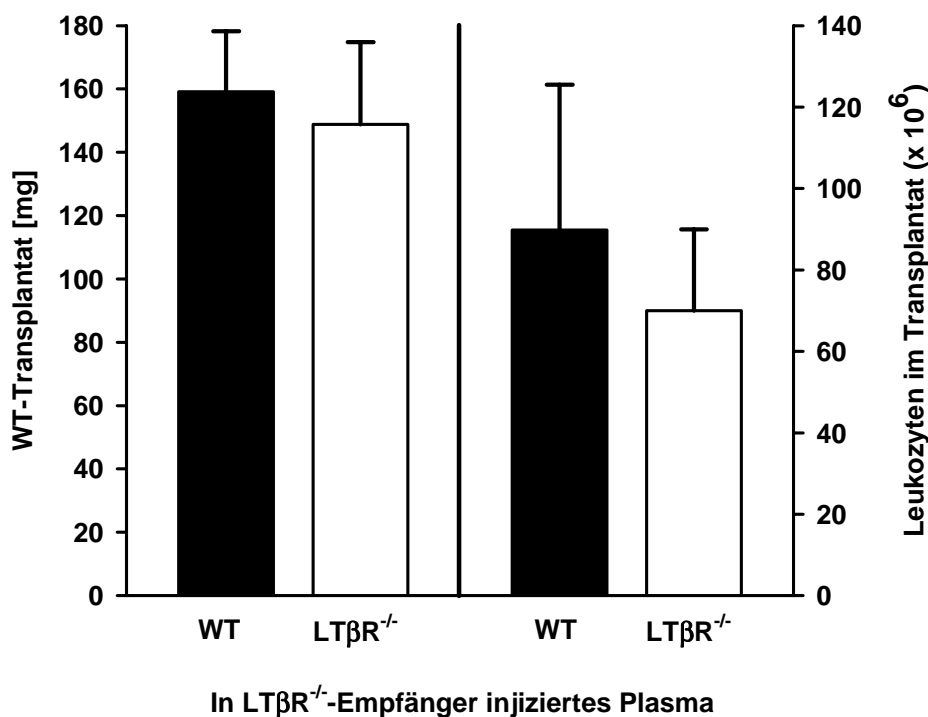


Abbildung 24: Milzregeneration unter Einfluss von WT- oder $LT\beta R^{-/-}$ -Plasma

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) von WT-Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in splenektomierte $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger, die zweimal pro Woche Blutplasma von entweder WT- oder $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren erhielten. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 5 bzw. 6 Tieren.

Bei gegebener Übertragbarkeit des hemmenden Faktors war die Erwartung, dass Gewicht und Leukozytenzahl des Regenerats unter Einwirkung von WT-Plasma geringer ausfallen würden als unter Einfluss von $LT\beta R^{-/-}$ -Plasma. Abbildung 24 zeigt, dass mit der hier angewandten Versuchsanordnung keine hemmende Wirkung durch WT-Plasma übertragen werden konnte. Sowohl das Gewicht als auch die Leukozytenzahl waren in beiden Versuchsgruppen gleich. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die injizierte Menge an Plasma zu gering war, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob die über das Blut vermittelte, von $LT\beta R$ abhängige Hemmung durch einen Faktor im Plasma oder durch ein wie auch immer geartetes Signal von hämatopoietischen Zellen vermittelt wurde. Ein anderer Ansatz, den hemmenden Faktor zu übertragen, bestand, wie in 3.4.2 beschrieben, in der Transplantation von $LT\beta R$ -exprimierendem Milzgewebe.

Wenn die Hemmung von $LT\beta R$ exprimierendem Gewebe ausging und über das Blut seine Wirkung auf lymphatisches Gewebe entfaltete, musste konsequenterweise auch ein WT-Transplantat eine hemmende Wirkung auf das im Empfänger vorhandene lymphatische Gewebe haben. Wenn die Hemmung durch Leukozyten vermittelt wurde, sollte die Gesamtleukozytenzahl von Transplantat und vorhandener Milz in etwa der von unbehandelten Kontrollmilzen entsprechen. Diese Hypothese wurde nachfolgend an der Transplantation von WT-Milzgewebe in WT-Empfänger, denen die eigene Milz belassen wurde, überprüft.

3.4.4. Zugabe von $LT\beta R$ exprimierendem Gewebe führt zum Rückgang von etabliertem lymphatischem Gewebe

Es wurde bereits beschrieben, dass die Transplantation von WT-Milzgewebe in eine WT-Maus, dem die eigene Milz belassen wurde, nur zu einem sehr kleinen Regenerat führt (12 mg, siehe 3.4.1) und dies auf die bereits vorhandene Menge an $LT\beta R$ exprimierendem Gewebe zurückgeführt werden kann (siehe 3.4.2). Obwohl also das Transplantat in seinem Wachstum unterdrückt wurde, wurde mit ihm zusätzliches Gewebe in den Empfänger gegeben, das den Rezeptor exprimierte. Auch diese Expression von $LT\beta R$ musste nach den bisherigen Ergebnissen einen hemmenden Einfluss ausüben. Die Transplantation von $LT\beta R^{-/-}$ -Gewebe würde dagegen keine Wirkung auf die vorhandene Milz haben. Aus diesem Grunde wurden die eigenen Milzen, die im WT-Empfänger verblieben waren, entnommen und mit Milzen von unbehandelten Kontrolltieren verglichen (Abbildung 25).

Dabei stellte sich heraus, dass transplantiertes Milzgewebe, welches den $LT\beta R$ exprimiert, tatsächlich einen hemmenden Einfluss auf die eigene Milz des Empfängers hatte. Die WT-Milz, zu der ein WT-Transplantat gegeben wurde, war mit 75 mg gegenüber der WT-Kontrolle (92 mg) um fast 20 Prozent kleiner (Abbildung 25, links). Die Differenz von 17 mg entspricht dabei dem Gewicht des WT-Transplantats (siehe 3.4.1), was die bisherigen Ergebnisse einer konstanten Menge an $LT\beta R$ exprimierendem Gewebe bestätigt. Dass die hemmende Wirkung auf die eigene Milz des Empfängers dabei von $LT\beta R$ im Transplantat ausgeübt wurde, zeigte sich daran, dass die Implantation von $LT\beta R^{-/-}$ -Milzgewebe keinen Einfluss auf die vorhandene Milz hatte.

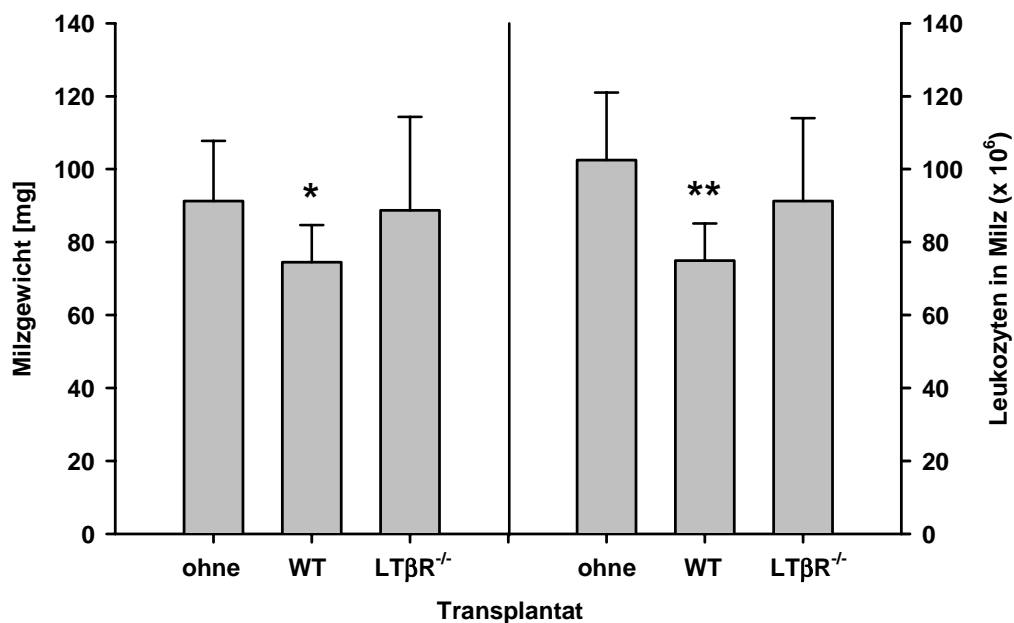


Abbildung 25: Zugabe von $LT\beta R$ -exprimierendem Milzgewebe führt zur Verkleinerung der eigenen Milz im WT-Empfänger

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) der eigenen Milzen von WT-Tieren, die ohne vorherige Splenektomie kein (ohne = Kontrolltiere), ein WT- oder ein $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantat erhalten hatten. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 5 bis 11 Tieren. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Die vorhandene WT-Milz enthielt darüber hinaus nach Zugabe des WT-Transplantats gegenüber der WT-Kontrolle 25 Prozent weniger Leukozyten (Abbildung 25, rechts). Die Abnahme der Leukozytenzahl in der vorhandenen Milz war nicht darauf zurückzuführen, dass diese in das Transplantat eingewandert waren, denn dieses enthielt nur eine sehr geringe Anzahl Leukozyten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Bilanz der Gesamtleukozyten in Milz und Transplantat

	Gesamtleukozyten im Milzgewebe von WT-Tieren (x 10⁶)	
	ohne	mit WT-Transplantat
Eigene Milz	100 ± 19	75 ± 10
WT-Transplantat	—	1,6 ± 0,8
Gesamt	100 ± 19	76,6 ± 11

Tabelle 7 verdeutlicht, dass auch nach Addition der Leukozyten von eigener Milz und WT-Transplantat eine Differenz von fast 25 Prozent gegenüber der WT-Kontrolle bestehen blieb. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Leukozyten ergab keine Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen der Milz von WT-Kontrollen und der Milz von Tieren, die ein WT-Transplantat erhalten hatten (Anhang Tabelle 9). Aus diesen Ergebnissen konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens, dass der durch LTβR im WT-Transplantat induzierte Faktor einen hemmenden Einfluss auf die Stromazellen der vorhandenen Milz ausübte, der in der Folge zu einer Abnahme der Leukozytenzahl führte. Zweitens, dass der Kontrollmechanismus für die Gesamtmenge an LTβR exprimierendem Gewebe nicht nur bei der Bildung, sondern auch in bereits vorhandenem lymphatischem Gewebe wirksam war. Lymphatisches Gewebe unterliegt in seiner Ausdehnung also auch im adulten Organismus ständiger Regulierung.

Schließlich blieb die Frage nach der Wirkungsweise des hemmenden Faktors. Die bis hierher durchgeführten Versuche hatten gezeigt, dass seine Freisetzung der Kontrolle des LTβR auf Stromazellen des lymphatischen Gewebes unterlag. Seine Effektorfunktion übte er wiederum auf Stromazellen des lymphatischen Gewebes aus, das er über den Blutstrom erreichte. Zusammengefasst ergab sich also der Charakter einer negativen Rückkopplung und so stellte sich die Frage, ob die hemmende Wirkung auch über den LTβR exekutiert wurde.

3.4.5. Hemmung wird nicht über $LT\beta R$ exekutiert

Eine erste Prüfung, ob die negative Rückkopplung direkt auf den Lymphotoxin- β -Rezeptor im lymphatischen Gewebe wirkte, konnte durch die Transplantation von WT-Milzgewebe in $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse, die ihre eigene Milz behielten, erfolgen. Wenn die Hemmung über den $LT\beta R$ vermittelt würde, hätte das WT-Transplantat keinen Einfluss auf die vorhandene Knockout-Milz, anderenfalls würde auch die eigene Milz des $LT\beta R^{-/-}$ -Empfängers kleiner werden.

Abbildung 26 zeigt, dass die Implantation eines WT-Transplantats zu einer deutlichen Verkleinerung der $LT\beta R^{-/-}$ -Milz führte. Mit 77 mg war sie um mehr als 30 Prozent leichter als die Milz der $LT\beta R^{-/-}$ -Kontrolle (113 mg). $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantate vermochten dagegen keinen hemmenden Einfluss auf die Milz des $LT\beta R^{-/-}$ -Empfängers auszuüben (Abbildung 26, links).

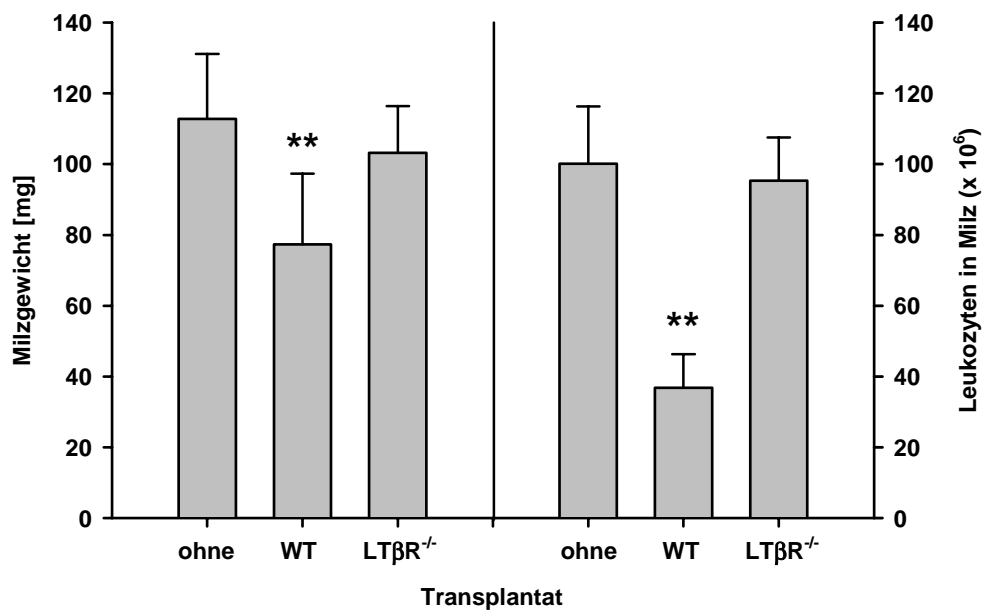


Abbildung 26: WT-Transplantat entfaltet hemmende Wirkung auf eigene Milz des $LT\beta R^{-/-}$ -Empfängers

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) der eigenen Milzen von $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren, die ohne vorherige Splenektomie kein (ohne = Kontrolltiere), ein WT- oder ein $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantat erhalten hatten. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 5 bis 11 Tieren. ** = $p < 0,01$

Die Reduktion der Leukozyten fand in erheblich größerem Ausmaß statt, denn die im $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger verbliebene Milz hatte durch die Gegenwart des WT-Transplantats fast zwei Drittel ihrer Leukozyten eingebüßt (Abbildung 26, rechts). Obwohl in Tabelle 7 gezeigt wurde, dass der Verlust an Leukozyten in der bereits vorhandenen Milz nicht durch die Aufnahme dieser Leukozyten in das Transplantat bedingt war, sollte ein weiterer Versuch eindeutig klären, dass es sich um einen hemmenden Einfluss auf die Stromazellen handelte. Dafür wurde Milzgewebe von $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren einerseits in $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger mit ihrer eigenen Milz und andererseits in Hybridtiere ($LT\beta R^{-/-}$ -Tiere mit WT-Transplantat) transplantiert. Wenn sich das $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantat im Empfänger ohne Rezeptorexpression trotz fehlender Förderung des Wachstums besser entwickelte als im Empfänger mit WT-Transplantat, so wäre damit gezeigt, dass die Hemmung nicht über den $LT\beta R$ vermittelt würde.

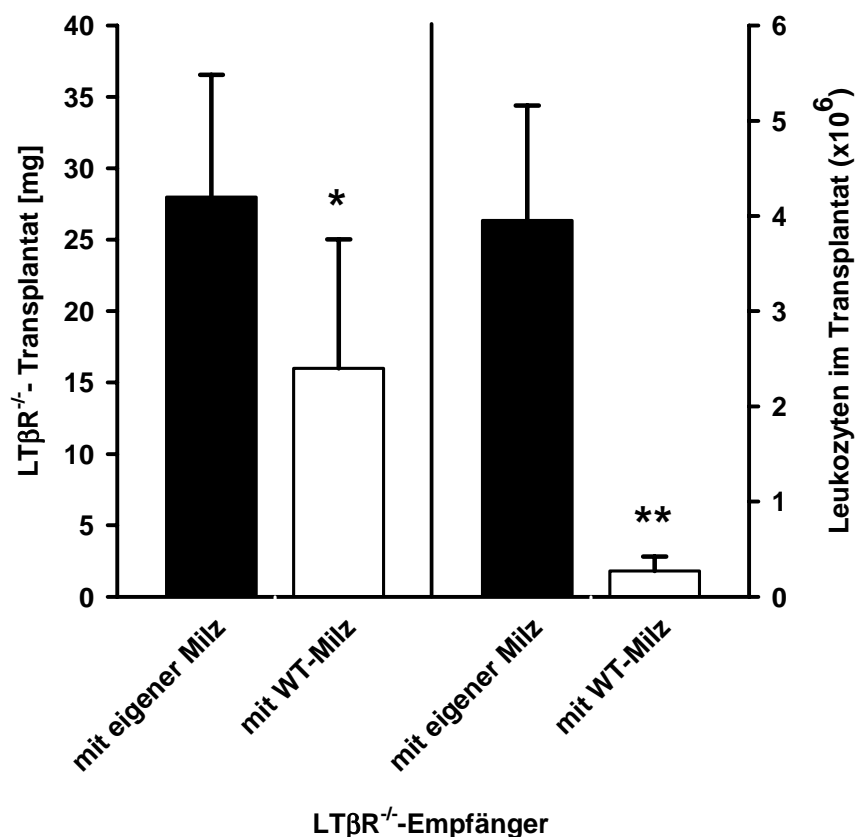


Abbildung 27: Hemmung wird nicht über $LT\beta R$ exekutiert

Gewicht (links) und Gesamtleukozyten (rechts) von $LT\beta R^{-/-}$ -Milztransplantaten 8 Wochen nach der Transplantation in $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger, die entweder ihre eigene Milz behielten oder denen 8 Wochen vor dem Einbringen des $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantats ein WT-Transplantat eingesetzt wurde. Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 5 bzw. 7 Tieren. * = p < 0,05; ** = p < 0,01

Abbildung 27 zeigt, dass der hemmende Einfluss des im Knockout-Tier vorhandenen WT-Transplantats nicht über den Lymphotoxin- β -Rezeptor exekutiert wurde. Während bei fehlender Hemmung das Knockout-Transplantat immerhin 28 mg schwer wurde, erreichte es in Gegenwart des WT-Transplantats mit 16 mg nur etwa die Hälfte des Gewichts (Abbildung 27, links). Die Besiedlung mit Leukozyten wies noch größere Unterschiede auf. Die hemmende Wirkung des WT-Transplantats reduzierte die Besiedlung mit Leukozyten um beinahe 90 Prozent (Abbildung 27, rechts). Dieses Experiment zeigte abschließend, dass durch Lymphotoxin- β -Rezeptor exprimierendes Gewebe ein hemmender Faktor induziert und über den Blutstrom verteilt wird. Seine Effektorfunktion übt er auf die Stromazellen von sich entwickelndem und bestehendem, lymphatischem Gewebe aus, die nicht über den LT β R exekutiert wird.

4 Diskussion

Die Liganden und Rezeptoren der TNF Superfamilie sind zentrale Steuerelemente des Immunsystems. Über sie werden Prozesse der Zellproliferation und -differenzierung, Überleben, Apoptose, Koordination der Immunabwehr und die Organogenese von lymphatischen Organen kontrolliert (Übersichten in 76; 77). Die Entstehung von lymphatischem Gewebe rückte dabei in den letzten Jahren ins Blickfeld, weil lymphatische Organe einerseits für die Generierung einer adaptiven Immunantwort unverzichtbar, andererseits aber viele Autoimmunerkrankungen mit der Bildung von ektopem lymphatischem Gewebe verbunden sind, welches für einen progressiven Krankheitsverlauf verantwortlich gemacht wird (Übersichten in 31; 56). Untersuchungen zur Entwicklung von lymphatischem Gewebe wurden bislang mit Hilfe von Knockout-Mäusen, antagonistischen Rezeptorfusionsproteinen, transgener Expression von Lymphotoxin bzw. Chemokinen oder der Transplantation von Knochenmark durchgeführt (27; 39; 58; 60; 61; 64; 65; 78; 79). Alle aufgeführten Methoden haben jedoch den Nachteil, entweder Prozesse der Ontogenese mit der Homöostase zu vermischen, den ganzen Organismus zu beeinflussen oder Effekte hervorzurufen, die durch die Methode selbst bedingt sind. Die transgene, konstitutive Expression von Chemokinen führt beispielsweise immer zu einer Infiltration mit Lymphozyten, weil sie nicht von endogenen Mechanismen reguliert werden kann. Die Bildung von lymphatischem Gewebe im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen findet aber vor allem im adulten Organismus und lokal begrenzt statt (32). In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der avaskulären Milztransplantation in adulten Mäusen gewählt, um sowohl eine klare Trennung von Ontogenese und Vorgängen im adultem Organismus zu erreichen, als auch die Bildung von lymphatischem Gewebe lokal studieren zu können. Als Ort der Implantation wurde hierbei das *Omentum majus* gewählt. Dies erwies sich als sehr erfolgreich, denn alle eingesetzten Transplantate konnten ortsnah wieder gefunden werden und waren deutlich sichtbar an das Blutgefäßsystem angeschlossen (Abbildung 3). Der Anschluss an den Blutkreislauf stellt aufgrund des Sauerstoffmangels nach der Implantation einen kritischen Faktor dar und obwohl die subkutane Implantation in Einzelfällen als erfolgreicher beschrieben wurde (70), zeigte sich in der Mehrzahl der Untersuchungen, dass die intraperitoneale Einbringung des Transplantats eine bessere Regeneration gewährleistet (69).

Die Milztransplantation als Modell für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus

Eine Kinetik sollte Aufschluss darüber geben, wann in dem hier angewandten Modell die Bildung von lymphatischem Gewebe abgeschlossen war. Dabei zeigte sich, dass die Regeneration des Milzgewebes in mehreren Phasen verlief, die bereits in früheren Arbeiten beobachtet werden konnten (69). Die erste Woche war geprägt von einem geringen Gewicht (Abbildung 4), kaum vorhandenen Leukozyten (Abbildung 5) und einem histologischen Bild, das einen nekrotischen Kern mit einem schmalen Rand aus Bindegewebe zeigte, in dem nur wenige B-Zellen dargestellt werden konnten (Abbildung 8). Diese Phase ist als eine durch Sauerstoffmangel bedingte Nekrose beschrieben, die nur ein schmaler Ring retikulärer Zellen übersteht (70; 80). Der Anschluss an das Blutgefäßsystem nimmt etwa 3 Tage in Anspruch (81), wonach die Regeneration von außen nach innen fortschreitet und mit der Neubildung von Roter Pulpa beginnt, in der nach 5 bis 7 Tagen erste Anhäufungen von Lymphozyten beobachtet werden können (70; 82). Die zweite Phase erstreckte sich bis zur fünften Woche nach der Transplantation, in der das Regenerat sein endgültiges Gewicht erreichte (Abbildung 4) und die Leukozytenzahl im Vergleich zur ersten Woche zwar sprunghaft anstieg, dann aber konstant blieb (Abbildung 5). Die Histologie zeigt, dass in dieser Phase der nekrotische Kern verschwand und nachfolgend der Neuaufbau der Weißen Pulpa stattfand (Abbildung 8). Dies entspricht den bisher beschriebenen Befunden, in denen der Wiederaufbau der Roten Pulpa dem der Weißen Pulpa voranschreitet (70; 71; 80). Die konstante Anzahl an Leukozyten über diesen Zeitraum könnte in dem, verglichen mit einer nativen Milz, schlechteren Blutfluss im Transplantat liegen (83). Eine Konsequenz dieser schlechteren Durchblutung wäre eine längere Dauer für die vollständige Besiedlung des Regenerats mit Leukozyten. Diese fand offensichtlich in der letzten Phase bis 8 Wochen nach der Transplantation statt, in der außer einer Verdreifachung der Leukozytenzahl (Abbildung 5), weder für das Gewicht (Abbildung 4) noch für den histologischen Aufbau (Abbildung 8) Unterschiede zum Zustand nach fünf Wochen gefunden wurden. Obwohl ein Zeitraum von 8 Wochen bereits als ausreichend beschrieben wurde, um die Regeneration von transplantiertem Milzgewebe zu gewährleisten (71), sollte der Vergleich mit Milzen von Kontrolltieren zeigen, dass dies auch in dem hier angewandten Modell der Fall war.

Ein Vergleich der Transplantate nach achtwöchiger Regeneration mit nativen WT-Milzen zeigte, dass tatsächlich eine Neubildung von lymphatischem Gewebe stattgefunden hatte. Die Regenerate erreichten die Hälfte des Gewichts und 20 Prozent der Leukozytenzahl von nativen Milzen (Abbildung 9), aber in der zellulären Zusammensetzung (Abbildung 10) zeigten sich dagegen nur wenig und in der Expression von Oberflächenmolekülen (Abbildung 11) gar keine Unterschiede. Geringeres Gewicht und weniger Leukozyten sind eine bei Milztransplantaten bekannte Erscheinung bei verschiedenen Spezies (69; 84). In dieser Arbeit entsprach das Gewicht der Regenerate immerhin der eingesetzten Menge der Implantate. Im Regenerat vorhandenes fibrotisches Gewebe (69) könnte darüber hinaus für die geringere Leukozytenzahl verantwortlich sein, da durch seine feste Struktur eventuell nicht alle Zellen aus dem Transplantat isoliert werden konnten. Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen ergab keine Unterschiede im Anteil von B-, CD8- und CD4-T-Zellen sowie NK-Zellen. Lymphatische Organe weisen eine gegenüber dem Blut typisch veränderte Verteilung von Lymphozyten auf (10), die im Vergleich mit der nativen Milz sowohl während (Abbildung 7A) als auch nach Abschluss der Regeneration des Transplantats erhalten blieb (Abbildung 10A). Die für eine schnelle Immunantwort gegen erneute Infektionen wichtigen memory CD4-T-Zellen (85) und in den IgD negativen enthaltenen memory B-Zellen (86) zeigten ebenfalls keine Abweichungen. Nur die regulatorischen CD4-T-Zellen und NK-T-Zellen, die beide eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunantworten spielen (87-89), waren im Transplantat um 40 Prozent erniedrigt (Abbildung 10B). Für das Transplantat wäre also nur eine eventuell beeinträchtigte Regulation der Immunantwort anzunehmen, die aber bisher nur bei völliger Abwesenheit dieser Populationen beobachtet wurde und deshalb nicht sehr wahrscheinlich ist (74; 88). Stattdessen konnte sogar die Regeneration der MZ B-Zellen beobachtet werden (Abbildung 10B), die in dieser Größenordnung nur in der Milz vorkommen und deren Wiederherstellung damit unterstreichen (90). Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder $\alpha 4\beta 7$ für die Einwanderung von Lymphozyten in die Weiße Pulpa und deren Lokalisation in der Marginalzone ist mehrfach belegt (91-93). Die Hochregulation von Oberflächenmarkern wie CD69 und CD44 steht dagegen für eine Aktivierung von Lymphozyten (94). Bei keinem der untersuchten Oberflächenmoleküle waren Unterschiede in der Expression zwischen nativen Milzen und Transplantaten feststellbar, womit keine Abweichungen von der Homöostase anzunehmen waren (Abbildung 11). In der Immunhistologie zeigte sich schließlich am deutlichsten,

dass sich im Transplantat ein voll funktionsfähiges lymphatisches Gewebe gebildet hatte (Abbildung 12). Alle Kompartimente einer nativen Milz bestehend aus Roter und Weißer Pulpa mit PALS, Follikeln und Marginalzone waren im Transplantat vorhanden (Abbildung 12A). Die deutlich abgesetzte Marginalzone mit metallophilen Makrophagen ist dabei besonders erwähnenswert. Bei Transplantationen von Milzgewebe spielt insbesondere das Alter der Spendertiere eine Rolle für die Qualität der Regeneration (95), und bei Milzgewebe aus adulten Mäusen wurde die Regeneration der Marginalzone schon bestritten (70). Allerdings wurde in diesem Versuch die Regeneration bei intraperitonealer Implantation nur über vier Wochen dokumentiert. In dieser und anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Wiederherstellung der Milzarchitektur und Funktion einen längeren Zeitraum benötigt und das Erscheinen der Marginalzone den Endpunkt der Regeneration markiert (71). In dem hier benutzten Modell waren darüber hinaus die Netzwerke aus FDCs, die über den spezifischen Marker FDC-M1 nachgewiesen wurden (19), gut entwickelt und nach Injektion von SRBCs, die bei intravenöser Injektion eine thymusabhängige Immunantwort in der Milz auslösen (96), hatten sich deutlich PNA⁺ Keimzentren gebildet (Abbildung 12B). Für die Induktion und Regulation der Immunreaktion sind dabei Zytokine von essentieller Bedeutung (3; 4). Die T_H1-Zytokine IL-2, IL-12 und IFN- γ sind Mediatoren der zellvermittelten und die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 der humoralen Immunantwort (5). TGF- β und IL-15 sind dagegen für die Regulation verantwortlich bzw. gewährleisteten das Überleben der NK-Zellen (6; 7). Die Methode der Mikrodissektion ermöglichte die quantitative Analyse der mRNA-Expression auf der Ebene von einzelnen Kompartimenten, wobei sich weder Unterschiede zwischen Kontrollmilzen und Transplantaten noch zwischen den Kompartimenten PALS, Follikel und Roter Pulpa fanden (Abbildung 13). Auch hier bestanden also keine Anhaltspunkte für eine Abweichung von der Homöostase. Acht Wochen nach der Implantation hatte sich aus dem Transplantat ein voll funktionsfähiges und einer nativen Milz entsprechendes lymphatisches Gewebe gebildet. Hierbei handelt es sich um eine Neubildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus. Das Modell der avaskulären Milztransplantation bietet deshalb eine geeignete Grundlage, um die Bedeutung einzelner Moleküle in diesem Prozess auf lokaler Ebene zu untersuchen.

Der Lymphotoxin- β -Rezeptor ist auch im adulten Organismus für Struktur und Funktion von lymphatischem Gewebe verantwortlich

Der Lymphotoxin- β -Rezeptor nimmt in der Organogenese der lymphatischen Organe eine zentrale Rolle ein (Übersichten in 34; 46; 57). Dies wird vor allem an $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen deutlich, die weder Lymphknoten noch Peyersche Platten besitzen. In der Milz sind T- und B-Lymphozyten nicht in Follikeln und PALS organisiert, sondern stark durchmischt. Die Marginalzone mit MZ B-Zellen und metallophilen Makrophagen sowie FDCs fehlen. Nach Antigenstimulation findet keine Keimzentrumsbildung statt (Abbildung 15; Abbildung 17) (37). Darüber hinaus sind NK-Zellen in diesen Tieren zu über 90 Prozent reduziert (Abbildung 14) (55). Die in dieser Arbeit verwendeten $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse wurden auf einem gemischten 129Sv/J und C57BL/6 Hintergrund generiert (37). Obwohl sie etwa sieben Mal auf C57BL/6 rückgekreuzt waren, wurde durch einen Isohistogenitätstest mittels Hauttransplantation (73) eine allogene Abstoßungsreaktion zwischen Wildtyp und $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren ausgeschlossen. In einem Zeitraum von 100 Tagen kam es dabei zu keinen Anzeichen einer Abstoßung (siehe Tabelle 6). Die Fähigkeit von $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren allogene Transplantate abzustößen, wurde bereits gezeigt und folglich konnte davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Stämme untereinander isogen waren (97). Anhand des etablierten Modells konnte durch die Transplantation von WT-Milzgewebe in $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere gezeigt werden, dass die Entwicklung von Natürlichen Killer Zellen nicht an die Expression von $LT\beta R$ in der Milz gekoppelt ist (Abbildung 14). Bisherige Untersuchungen hatten bereits nachgewiesen, dass $LT\beta R$ exprimierende Stromazellen aus dem Knochenmark die Störung der NK-Zell-Entwicklung beheben können und der in den Knockout-Tieren beobachtete Defekt auf eine Reifungsstörung der Stromazellen wegen des fehlenden $LT\beta R$ -Signals zurückzuführen ist (55; 88). Eine Beteiligung der Stromazellen in der Milz konnte allerdings mit den angewandten Verfahren nicht untersucht und erst durch den hier verfolgten Ansatz ausgeschlossen werden. Neben den fehlenden NK-Zellen gibt es in $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren immunologische Defekte, die a priori nicht durch die Milztransplantation behoben werden können. So ist die Immunität von $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen gegen intrazelluläre Erreger wie Mycobakterien und Listerien aufgrund der fehlenden Rezeptorexpression auf den Makrophagen stark eingeschränkt (98). Die Expression inflammatorischer Cytokine von Mastzellen wird durch aktivierte T-Zellen über den $LT\beta R$ induziert, wodurch sich für $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere eine eingeschränkte Abwehr von

Parasiten ergeben könnte (44). Da die hämatopoietischen Zellen in diesem Modell alle vom Empfänger stammen (Abbildung 16), blieben diese Defekte aber erhalten. Dies ist weniger ein Mangel des Modells als ein Ausblick auf seine Möglichkeiten für zukünftige Experimente. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die anderen für $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse typischen Defekte als durchweg abhängig von der $LT\beta R$ -Expression in der Milz (Abbildung 15; Abbildung 17). Erstens, entwickelten sich durch die Implantation von $LT\beta R$ exprimierendem Milzgewebe die sonst in $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen fehlenden Marginalzonen B-Zellen (Abbildung 15). Zweitens, waren im histologischen Aufbau des Regenerats Rote und Weiße Pulpa klar voneinander getrennt und im Gegensatz zur $LT\beta R^{-/-}$ -Kontrolle mit PALS, Follikeln und Marginalzone alle Kompartimente der Weißen Pulpa vorhanden. Zum Dritten, grenzten metallophile Makrophagen die Marginalzone zum Follikel hin ab und viertens, entwickelten sich bei klar erkennbaren Netzwerken von FDCs nach Stimulation mit SRBCs große, im Follikel platzierte Keimzentren (Abbildung 17). Die quantitative Analyse der mRNA-Expression der beschriebenen Zytokine in Weißer und Roter Pulpa ergab hier ebenfalls keine Unterschiede zwischen der WT-Kontrolle und dem WT \rightarrow $LT\beta R^{-/-}$ -Transplantat. Allerdings zeigten sich in der $LT\beta R^{-/-}$ -Kontrolle die gleichen Werte (Abbildung 18), was auf den ersten Blick erstaunlich ist, da für diese Tiere eine eingeschränkte Immunantwort gut beschrieben ist (37; 98). Eine geringere IL-4 und IL-10-Produktion wird allerdings bei Aktivierung aus der Milz isolierter Lymphozyten von $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren beobachtet (55), während die IFN- γ -Produktion bei der Abwehr von Mycobakterien in $LT\beta R^{-/-}$ -Tieren in der Lunge nicht eingeschränkt ist. Hier ist wahrscheinlich die fehlende Expression von $LT\beta R$ auf den Makrophagen für den tödlichen Verlauf der Infektion verantwortlich (98). Einen direkten Einfluss scheint der $LT\beta R$ also nur im Rahmen der Immunantwort auf die Expression der T_H2 -Zytokine zu haben. Darüber hinaus zeigt die uneingeschränkte Expression von IL-15, dass die fehlenden NK-Zellen nicht auf den Mangel dieses für sie essentiellen Zytokins zurückzuführen sind, sondern tatsächlich auf die fehlende $LT\beta R$ -Expression im Knochenmark (55; 88).

Insgesamt entsprach das WT-Transplantat im $LT\beta R^{-/-}$ -Tier, abgesehen von den fehlenden NK Zellen, in seiner zellulären Zusammensetzung und seinem histologischen Aufbau dem Regenerat aus WT \rightarrow WT (Anhang Tabelle 9; Abbildung 12) Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entwicklung der MZ B-Zellen, metallophilen Makrophagen und FDCs im Gegensatz zu den NK Zellen ausschließlich von der $LT\beta R$ -Expression in der Milz abhängt.

Ebenso wie die Bildung der lymphatischen Strukturen ist hierfür der LT β R auf den Stromazellen der implantierten Milz verantwortlich, denn durch die kongene Milztransplantation konnte gezeigt werden, dass die im Transplantat befindlichen Leukozyten alle von den Empfängertieren stammten (Abbildung 16) und somit eine Beteiligung der LT β R-Expression auf Makrophagen und DCs nicht in Betracht kommt. Die Stromazellen stammen aber vom Spender, denn wenn diese vor der Implantation durch Strahlung abgetötet werden, findet keine Regeneration statt (70). Dementsprechend bildet das Regenerat eine chimäre Struktur, in der die Stromazellen des Spenders und die Leukozyten des Empfängers enthalten sind. Dies wurde bereits durch eine Chromosomenanalyse nahe gelegt (82) und konnte durch die kongene Transplantation endgültig bestätigt werden. MZ B-Zellen stellen die letzte Entwicklungsstufe der peripheren B-Zellreifung dar (90) und sind in der Lage, eine thymusunabhängige Immunantwort vom Typ 2 zu generieren (99). Ihre Entwicklung ist strikt an das LT β -LT β R-Signal gekoppelt, denn sie fehlen sowohl in LT $\beta^{-/-}$ als auch in LT β R $^{-/-}$ -Tieren (37; 100) (Abbildung 15). Dabei ist ihre Entwicklung zwar an LT β auf B-Lymphozyten gebunden (53), aber nicht an die Existenz einer ausgebildeten Marginalzone gekoppelt (47; 101), so dass unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von LT β R auf Stromazellen und nicht auf Makrophagen oder DCs in der Marginalzone entscheidend ist. Die Präsenz von MOMA-1 positiven metallophilen Makrophagen (MMMs) ist ebenfalls vom LT β -LT β R-Signal abhängig (53; 59; 100). Da in unserem Versuch die Makrophagen aber keinen LT β R exprimierten, kann LT β nicht direkt für ihre Entwicklung verantwortlich sein. Allerdings hängt die Existenz von MMMs direkt vom Vorhandensein der B-Lymphozyten ab (102). Offensichtlich ist für die Entwicklung der MMMs also der Kontakt mit B-Lymphozyten notwendig, die vorher Kontakt mit dem LT β R auf Stromazellen benötigen. Eine Vermutung wäre damit, dass die MZ B-Zellen für die Entwicklung der metallophilen Makrophagen notwendig sind, was mit diesem Versuchsaufbau zwar nicht eindeutig belegt werden kann, aber die Abwesenheit der MMMs tritt immer gemeinsam mit dem Fehlen der MZ B-Zellen auf (103). Die Wiederherstellung von Follikel, PALS und Marginalzone als Kompartimente der lymphatischen Strukturen in der Milz (Abbildung 17) kann ebenfalls auf die durch Einsetzen des Milztransplantats vorhandene LT β R-Expression auf den Stromazellen zurückgeführt werden. Die Organisation der B-Lymphozyten in Follikeln ist abhängig von der Produktion von CXCL13 durch die Stromazellen im B-Zell-Areal (51) und der Expression von CXCR5 auf den B-Zellen

(52). Die Positionierung der T-Zellen benötigt einerseits CCL19 und CCL21, das von den Stromazellen des T-Zell-Areals produziert wird (48; 104) und andererseits die Expression von CCR7 auf den T-Lymphozyten. (49). Die Expression der benötigten Chemokine durch die Stromazellen ist dabei abhängig vom $LT\beta$ - $LT\beta R$ -Signal (105). Während für die Aufrechterhaltung des Follikels allerdings ein ständiges Signal benötigt wird (60; 105), erhält das T-Zell-Stroma in der Ontogenese durch $LT\beta$ ein differenzierendes Signal, das zu einer hohen Basisexpression der T-Zell-Chemokine auch ohne weitere Stimulation führt (54; 105). Da T-Zellen $LT\beta$ nur im aktivierten Zustand exprimieren, wird so die Produktion von Chemokinen auch während der Homöostase gewährleistet (106). Diese Differenzierung ist in der Milz strikt von B-Lymphozyten abhängig und findet am Tag der Geburt statt (54). Trotzdem fand sich bei den hier durchgeführten Transplantationen eine deutlich abgrenzbare PALS (Abbildung 12; Abbildung 17). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das Überleben einiger differenzierter Stromazellen aus dem T-Zell-Areal. Eine andere Möglichkeit besteht über die Induktion der T-Zell-Chemokine durch LIGHT (,Homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM on T cells'). LIGHT wird konstitutiv von unreifen DCs exprimiert, ist auf T-Zellen durch Aktivierung induzierbar und bindet an $LT\beta R$ (107; 108). LIGHT kann über $LT\beta R$ die Expression von CCL21 durch Stromazellen des T-Zell-Areals anregen, aber nicht CXCL13 im Follikel (109). Die wichtigste Funktion von LIGHT wird allerdings über HVEM (,herpes virus entry mediator') auf T-Zellen vermittelt und ist unverzichtbar für die Homöostase und Aktivierung von T-Zellen (94; 110). Für die Organisation von lymphatischem Gewebe spielt LIGHT nur dann eine Rolle, wenn $LT\beta$ nicht exprimiert wird (111). Insofern könnte es aber an der Bildung der PALS im Regenerat beteiligt sein. Dass die Anordnung der T-Lymphozyten zwischen den Follikeln nur passiv zustande kam, weil sie nicht in die Follikel wandern konnten, ist sehr unwahrscheinlich, da bei fehlender Expression von Chemokinen im T-Zell-Areal die T-Lymphozyten überhaupt nicht in die Weiße Pulpa einwandern (104). Für die Entwicklung der Marginalzone wurde ebenfalls ein Entwicklungsfenster vorgeschlagen (103), welches mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 12; Abbildung 17). Der Grund ist wohl darin zu suchen, dass die Schlussfolgerung von Tumanov et.al. (103) aus einem Versuch gezogen wurde, in dem durch transgene Expression von LIGHT die gestörte Milzarchitektur von $LT\alpha^{-/-}$ -Tieren, die deshalb kein

Lymphotoxin- β exprimieren können, bis auf die Marginalzone wieder hergestellt werden konnte (109). In Verbindung mit unseren Ergebnissen ergibt sich daraus, dass für die Marginalzone das LT β -LT β R-Signal entscheidend ist. Follikulär Dendritische Zellen (FDCs) sind eng mit der Fähigkeit von B-Zellen verknüpft, Keimzentren zu bilden und einen Isotypwechsel durchzuführen (20). Sie gelten heute trotz einzelner gegenteiliger Befunde vor allem wegen ihrer hohen Strahlenresistenz als nicht-hämatopoietischen Ursprungs (19; 112) und stellen eine spezialisierte Form der aus retikulären Fibroblasten hervorgegangenen Stromazellen dar (113). Die Implantation von LT β R exprimierendem Milzgewebe ermöglichte sowohl die Differenzierung von FDCs als auch die Bildung von Keimzentren nach Stimulation mit SRBCs (Abbildung 17). Ohne LT β R können sich dagegen weder FDCs noch Keimzentren entwickeln (Abbildung 17) (37). Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein ständiges Signal durch LT β auf B-Lymphozyten für die Differenzierung und den Erhalt der FDC-Netzwerke notwendig ist (60; 61; 114), wobei in der Ontogenese der lymphatischen Organe der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) über den TNF-Rezeptor I (TNFR-I) ebenfalls eine große Rolle spielt. So entwickeln TNF α ^{-/-}- und TNFR-I^{-/-}-Mäuse keine FDCs und keine Follikel, sondern die B-Zellen liegen als Ring um das T-Zell-Areal, was auf eine reduzierte Produktion von CXCL13 zurückzuführen ist (105; 115; 116). Im adulten Organismus scheint aber der entscheidende Stimulus über den LT β R vermittelt zu werden und der TNFR-I nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. So kann durch Blockade des TNFR-I im adulten Organismus zwar ein Verschwinden der FDCs beobachtet werden, aber nach Immunstimulation entwickeln sich die FDC-Netzwerke und Keimzentren trotzdem, während die Blockade des LT β R dies nicht zulässt (117). Noch deutlicher zeigt sich dies bei der subkutanen Applikation von Lymphknotenzellen, die sich in TNFR-I^{-/-}-Mäusen zu voll ausgebildetem lymphatischem Gewebe mit FDCs entwickeln, während in LT α ^{-/-}-Mäusen kein lymphatisches Gewebe entsteht (118). Ferner konnte die Notwendigkeit des direkten Kontakts mit Lymphozyten und die Abhängigkeit von LT β R für Bildung und Erhalt des retikulären Netzwerks in Lymphknoten demonstriert werden (13). In der vorliegenden Arbeit konnte bis hierhin die entscheidende Bedeutung des LT β R auf den Stromazellen für die Organisation und Funktion von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus gezeigt werden. Die Ligandierung von LT β R hat dabei eine komplexe Signalkaskade zur Folge, die zur Induktion von zwei NF- κ B („nuclear factor kappa B“) Transkriptionswegen führt (119). Über den

klassischen Weg mit NF- κ B-1 werden dabei Adhäsionsmoleküle und Cytokine induziert, die typisch für Entzündungsreaktionen sind, während über den alternativen Weg mit NF- κ B-2 die Chemokine generiert werden, die die Migration von T- und B-Lymphozyten steuern (38; 120). Die genannten Signaltransduktionswege sind aber weder exklusiv für den LT β R noch für Stromazellen, sondern werden auch von anderen Rezeptoren der TNF Superfamilie in Anspruch genommen (76) und sind für die Funktion von Leukozyten bedeutsam (24). Darüber hinaus erweitern Überschneidungen in der Bindung von Liganden an Rezeptoren, insbesondere im TNF-Lymphotoxin-System, das Spektrum an möglichen Effekten, die in Knockout-Tieren auftreten können (78; 121). Aus diesem Grunde zeigen Mäuse mit Defiziten in der Liganden- und Rezeptorexpression oder Signaltransduktion dieses Systems meist einen sehr komplexen Phänotyp, in dem sich verschiedenste Defekte akkumulieren (34; 46; 57). Mit dem hier angewandten Modell lässt sich die Rolle einzelner Moleküle auf lokaler Ebene bestimmen und bietet damit die Möglichkeit, bisher nur unzureichend geklärte Fragen in der Bildung von lymphatischem Gewebe zu beantworten. So wurde zum Beispiel die Ligation von LT β R durch LT β auf B-Zellen am Tag der Geburt als essentiell für die Entwicklung des T-Zell-Stromas in der Milz beschrieben (54). Andererseits führte die Transplantation von Knochenmark aus WT-Tieren in LT $\beta^{-/-}$ -Tiere zur vollständigen Wiederherstellung der Milzarchitektur (61). Die Transplantation von Milzgewebe aus LT $\beta^{-/-}$ /LIGHT $^{-/-}$ -Tieren in WT-Tiere würde die Frage klären, ob tatsächlich ein Entwicklungsfenster existiert, denn diese Milz exprimiert den LT β R, der aber noch nie Kontakt mit einem seiner Liganden hatte. Ob LIGHT bei der Induktion der T-Zell-Chemokine LT β auch im adulten Organismus ersetzen kann und nicht nur, wie gezeigt, bei transgener Expression (109), würde die Transplantation von WT-Milzgewebe aus LT $\beta^{-/-}$ -Tieren zeigen, denn nur wenn LIGHT in diesen Tieren die T-Zell-Chemokine während der Ontogenese induzieren kann, wird das Regenerat eine PALS ausbilden.

Der Lymphotoxin- β -Rezeptor reguliert die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus

Da die Rolle des Lymphotoxin- β -Rezeptors bei der Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus ebenfalls nicht eindeutig geklärt ist (31), sollte seine Bedeutung für diesen Prozess durch Überkreuz-Transplantation von Milzgewebe zwischen WT- und LT β R $^{-/-}$ -Tieren näher untersucht werden. Die fundamentale Bedeutung des LT β R wird

bereits in der Größe der nach 8 Wochen entnommenen Transplantate deutlich (Abbildung 19) und setzt sich fort im Gewicht und der Leukozytenzahl (Abbildung 20). Ohne den LT β R auf den Stromazellen ist die Bildung von lymphatischem Gewebe nicht möglich, denn das Regenerat von LT β R \rightarrow WT war nicht nur um 60 Prozent kleiner, sondern es enthielt auch nur 6 Prozent der Leukozyten eines WT \rightarrow WT Transplantats. Die Rolle des LT β R für die Organisation von lymphatischem Gewebe wurde bereits ausführlich diskutiert (siehe oben). Aus dem hier erhaltenen Ergebnis lässt sich darüber hinaus erkennen, dass der LT β R auch für die Induktion der Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus und nicht nur in der Ontogenese verantwortlich ist. In der Vergangenheit wurde berichtet, dass die Expression der Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21 ausreicht, um die Bildung von ektopem lymphatischem Gewebe zu induzieren. Allerdings wurde diese Expression über den Ratten Insulinpromotor (RIP) erzwungen und führte lediglich zu massiven Infiltrationen mit T- und B-Lymphozyten (64; 65). Andere Versuche, die mit RIP-LT $\alpha\beta$ arbeiteten, erreichten dagegen die Bildung von echtem lymphatischem Gewebe mit FDCs (66). Modelle, die sich mehr an homöostatischen Bedingungen orientierten, verwendeten die transgene Expression von Antigen oder Mäuse, die spontan Diabetes entwickeln. Im ersten Fall konnte gezeigt werden, dass die Bildung von lymphatischem Gewebe die Präsentation von Antigen durch DCs über einen längeren Zeitraum benötigt (122). Im zweiten Fall konnte sowohl durch transgene Expression als auch durch Injektion von LT β R-Fusionsproteinen die Bildung von lymphatischem Gewebe und sogar die Infiltration mit Lymphozyten im Pankreas verhindert werden (27; 123). Sowohl die beschriebenen Chemokine als auch die Aktivierungssignale und verschiedene Cytokine führen zur Induktion von LT β auf T- und B-Lymphozyten (52; 65; 106). Darüber hinaus stellte sich bei der Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis heraus, dass zwar sowohl CXCL13 als auch LT β die Existenz von Keimzentren in der Synovia vorhersagen, aber LT β der zuverlässigere Wert ist (26). Die Bildung von lymphatischem Gewebe scheint letztlich mit den gleichen Mechanismen reguliert zu sein wie die Organogenese der lymphatischen Organe (124). Sowohl in dem hier beschriebenen Modell als auch bei früheren Versuchen kam es zuerst zur Neubildung der Roten Pulpa, bevor sich erste Follikel formierten (Abbildung 8) (70). Dieser Prozess findet auch in der Ontogenese der Milz in dieser Reihenfolge statt (125). Darüber hinaus sind alle an der Organogenese beteiligten Liganden und Rezeptoren auch im adulten Organismus an der Entstehung von

lymphatischem Gewebe beteiligt (56; 63). Sogar die Funktionalität von ektope lymphatischem Gewebe gleicht der von lymphatischen Organen und ist nur dann vollständig vorhanden, wenn T- und B-Zellen richtig organisiert und FDCs vorhanden sind (31; 126). Die Bedeutung der $LT\beta$ - $LT\beta R$ -Achse in diesem Prozess konnte auch in einem anderen Modell mit der subkutanen Injektion von Lymphknotenzellen gezeigt werden (118). Insgesamt lässt sich in Verbindung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen sagen, dass der Lymphotoxin- β -Rezeptor den entscheidenden Faktor für die Bildung von lymphatischem Gewebe auch im adulten Organismus darstellt.

Die in dieser Arbeit ermittelte und in der Literatur gut nachvollziehbare Abhängigkeit der Bildung von lymphatischem Gewebe von der $LT\beta R$ -Expression im Transplantat, wird durch den hemmenden Einfluss ergänzt, den die $LT\beta R$ -Expression in lymphatischen Organen des Empfängers ausübt. Der Vergleich von Größe, Gewicht und Leukozytenzahl der Transplantate $WT \rightarrow WT$ und $WT \rightarrow LT\beta R^{-/-}$ zeigte, dass die Expression von $LT\beta R$ im Empfänger massiven Einfluss auf die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus nimmt (Abbildung 19; Abbildung 20). Während das WT -Transplantat im $LT\beta R^{-/-}$ -Empfänger mit 115 mg sogar schwerer wurde als eine native WT -Milz (Anhang Tabelle 8), erreichte das gleiche Transplantat im WT -Empfänger weniger als 40 Prozent dieses Gewichts. Die Besiedlung mit Leukozyten, bezogen auf das Gewicht, war dabei vergleichbar (Anhang Tabelle 8), und in beiden Fällen kam es zur vollen Ausbildung von lymphatischem Gewebe (siehe oben). Es konnte schließlich gezeigt werden, dass die Menge an lymphatischem Gewebe, die neu gebildet werden kann, davon abhängt, wie viel $LT\beta R$ -exprimierendes Gewebe im Empfänger bereits vorhanden ist (Abbildung 21; Abbildung 22). Die Gesamtmenge an lymphatischem Gewebe wird so in einem engen Bereich reguliert (Abbildung 23) und die Zugabe von $LT\beta R$ -exprimierendem Gewebe führt konsequenterweise zu einer Verringerung des vorhandenen lymphatischen Gewebes, um die ursprüngliche Gesamtmenge wieder herzustellen (Abbildung 25). Die hemmende Wirkung der Expression von $LT\beta R$ in Milz und Lymphknoten ist dabei etwa gleich stark (Abbildung 22) und muss über einen Faktor im Serum vermittelt werden, der $LT\beta R$ -abhängig produziert wird, da Transplantat und vorhandenes lymphatisches Gewebe nur über den Blutkreislauf verbunden sind. Dass der Faktor nicht durch Injektion von Plasma übertragen werden konnte (Abbildung 24), lässt darauf schließen, dass er ständig produziert und in ausreichender Menge vorhanden sein muss. Dabei deuten die Ergebnisse

darauf hin, dass es sich um einen Faktor im Serum handelt, der seine hemmende Wirkung auf die Stromazellen von lymphatischem Gewebe entfaltet. Dies lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass bei Zugabe von WT-Milzgewebe in einen WT-Empfänger mit seiner eigenen Milz zwar die Menge an LT β R-exprimierendem Milzgewebe konstant gehalten wird (Abbildung 25), aber die Anzahl Leukozyten im gesamten Milzgewebe um 25 Prozent gegenüber der Kontrolle zurückgeht (Tabelle 7). Es gibt demnach keine konstante Anzahl von Leukozyten in lymphatischem Gewebe, was eine Beteiligung der Leukozyten an der Hemmung eher unwahrscheinlich macht. Der hemmende Einfluss der vorhandenen Lymphknoten und der Milz verhindert, dass sich der induktive Impuls des LT β R im Transplantat voll entfalten kann. Andererseits wird durch LT β R im Transplantat aber der hemmende Faktor induziert, wodurch dessen Spiegel im Blut ansteigt und vorhandenes lymphatisches Gewebe reduziert wird. Die Hemmung des über LT β R induzierten Faktors wird dabei nicht über den LT β R exekutiert, denn sie wirkt auch auf Stromazellen, die den Rezeptor nicht exprimieren (Abbildung 26; Abbildung 27). Das Wachstum des LT β R^{-/-}-Transplantats im LT β R^{-/-}-Tier lässt hier allerdings die Frage aufkommen, ob im Knockout-Tier tatsächlich ein Hemmstoff fehlt oder ein Induktor induziert ist, weil sich der LT β R im Transplantat eigentlich als essentiell für die Regeneration erwiesen hatte (Abbildung 20; Abbildung 27). Dass es sich um einen fehlenden Hemmstoff handeln muss, zeigt das Ergebnis im Hybrid-Tier. Wenn im Knockout-Tier tatsächlich ein Induktor hochreguliert wäre, müsste das zweite Transplantat ebenso groß werden wie das erste. Dies ist aber nicht der Fall, sondern stattdessen bewirkt der hemmende Einfluss des ersten Transplantats ein geringeres Wachstum des zweiten (Abbildung 22). Analog zu der für die Follikelbildung verantwortlichen positiven Rückkopplung (52) existiert also eine negative Rückkopplung, die die Menge an lymphatischem Gewebe im adulten Organismus kontrolliert. Dieses Phänomen in Abhängigkeit des Lymphotoxin- β -Rezeptors wird in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Übereinstimmend mit den hier dargestellten Ergebnissen wurde in anderen Studien bereits festgestellt, dass eine vorhandene Milz die Regeneration von implantiertem Milzgewebe hemmt und die Transplantation von verschiedenen Mengen Milzgewebes zu einer konstanten Menge an Regenerat führt (67). Metcalf (67) zog schon aus seinen Versuchen im Jahr 1964 die Schlussfolgerung, dass es einen Mechanismus geben müsse, der die Größe der Milztransplantate reguliert, zog aber eine Beteiligung der Lymphknoten nicht in Betracht. Er konnte damals auch keinen Effekt der Transplantate auf

die vorhandene Milz feststellen, was daran gelegen haben könnte, dass er Milzgewebe von Tieren transplantierte, die weniger als einen Tag alt waren. Da die Besiedlung der lymphatischen Organe in der Maus erst nach der Geburt beginnt und erste Follikel nach 3 Tagen erkennbar werden (125), war das transplantierte Gewebe wohl nicht differenziert genug, um eine inhibitorische Wirkung zu entfalten. Die hier beschriebene Regulation ist zudem nur auf Gewebe beschränkt, das in seinem Aufbau den sekundär lymphatischen Organen entspricht, denn bei multipler Transplantation von Thymusgewebe entwickelt jedes Regenerat etwa das gleiche Gewicht und somit kann die Gesamtmenge an Thymusgewebe nahezu beliebig gesteigert werden (127). Dass der hemmende Einfluss der Rezeptorexpression neben der Milz vor allem von Lymphknoten ausgeübt wird, muss insofern eingeschränkt werden, als dass der Lymphotoxin- β -Rezeptor im adulten Organismus auch in anderen Organen, wie zum Beispiel Niere und Leber, exprimiert wird (43). Ein möglicher Nachweis, dass die Hemmung nur von lymphatischem Gewebe ausgeht, liegt in dem Phänotyp von Tieren, denen selektiv Lymphknoten fehlen, deren Expression von LT β R in Milz und anderen Organen aber nicht beeinträchtigt ist. Dies ist zum Beispiel in RANK (‘receptor activator of NF- κ B’) Knockout-Tieren der Fall, da hier selektiv die Bildung der Lymphknoten ausgeschaltet ist. Bei fehlenden Lymphknoten ist die Milz dieser Tiere, trotz einer Störung der B-Zell-Reifung und, abgesehen von den Follikeln, normaler Histologie, doppelt so groß wie bei entsprechenden Kontrolltieren (128; 129). In einer anderen Arbeit konnte durch die Blockade der Lymphknotenbildung in utero die Anzahl der lymphoiden Follikel im Darm um das Dreifache gesteigert werden, da sich diese erst nach der Geburt entwickeln (130). Beide Ergebnisse bestätigen, dass die Lymphknoten entscheidenden Anteil an der Hemmung von lymphatischem Gewebe haben. Dies erklärt auch, warum das Transplantat WT \rightarrow WT nur die Hälfte des Gewichts einer normalen Milz erreicht. Milz und Lymphknoten werden embryonal angelegt (39; 40), aber die Besiedlung mit Lymphozyten beginnt erst nach der Geburt (125). Während sich Milz und Lymphknoten also embryonal nahezu ungestört parallel entwickeln können, stört die Hemmung durch die voll entwickelten Lymphknoten im adulten Organismus die Regeneration der Milz von Beginn an.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebenen hemmenden Einfluss der LT β R-Expression lässt sich die bekannte positive Rückkopplung (46; 52) um eine negative Rückkopplung erweitern. Damit kann ein Modell für die Regulation von lymphatischem

Gewebe im adulten Organismus abgeleitet werden (Abbildung 28).

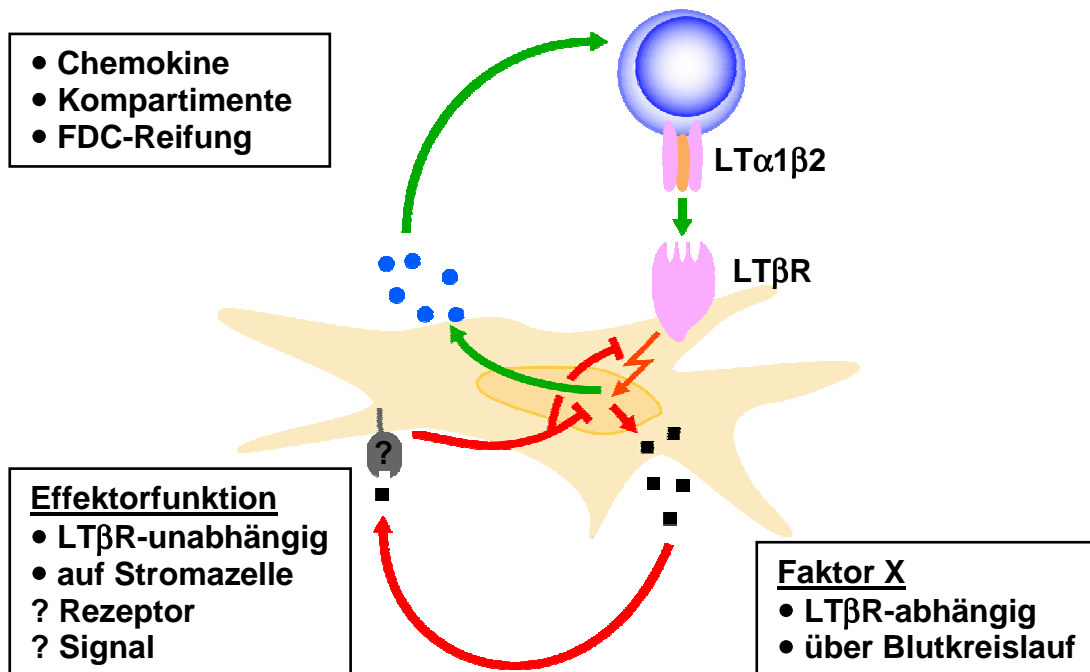


Abbildung 28: Modell für die Regulation von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus

Durch die Ligation von LTβR werden in Stromazellen sowohl eine positive als auch eine negative Rückkopplung in Gang gesetzt. Die Ausschüttung von Chemokinen führt zur Bildung von T- und B-Zell-Kompartimenten und mit der LTβR-abhängigen Reifung Follikulär Dendritischer Zellen (FDCs) erreicht lymphatisches Gewebe seine höchste Organisationsform (oberer Teil). Der über denselben Weg induzierte Faktor X hemmt über den Blutkreislauf LTβR-unabhängig die Stromazellen und kann sowohl die Neubildung als auch bestehendes lymphatisches Gewebe reduzieren (unterer Teil).

Dabei führt die Ligation des Lymphotoxin-β-Rezeptors zur Ausschüttung von Chemokinen, wodurch Lymphozyten angezogen und in Kompartimenten organisiert werden. So werden in einer positiven Feedback-Schleife die Differenzierung der Follikulär Dendritischen Zellen und der Aufbau lymphatischen Gewebes vorangetrieben. Andererseits wird gleichzeitig die Expression eines Faktors induziert, der in das Blut abgegeben und mit dem Kreislauf im Körper verteilt wird. Dieser unterdrückt und reduziert LTβR-unabhängig die Differenzierung von Stromazellen in sich entwickelndem und bestehendem lymphatischem Gewebe. Da die Wirkung des Faktors sich auch auf Milzgewebe von LTβR^{-/-}-Tieren erstreckt, ist sehr unwahrscheinlich, dass er seine hemmende Funktion durch direkte Inhibition des LTβR oder seiner Effektormoleküle

ausübt. Denkbar wäre dagegen ein Einfluss auf die Transkription von Genen oder die Hemmung von Proteinen der Signaltransduktion, die für das Wachstum und die Differenzierung von Stromazellen essentiell sind. Hierdurch wird die Menge an lymphatischem Gewebe in einem engen Bereich konstant gehalten und es kann vermutet werden, dass der Spiegel des Faktors im Serum mit der Menge an lymphatischem Gewebe im Körper korreliert.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die avaskuläre Milztransplantation ein gutes Modell darstellt, um die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus nachzubilden. Mit diesem Modell konnte nicht nur der Einfluss des Lymphotoxin- β -Rezeptors auf die Architektur von lymphatischem Gewebe bestätigt und erweitert, sondern darüber hinaus auch seine substantielle Bedeutung für die Neubildung von lymphatischen Gewebe im adulten Organismus nachgewiesen werden. Schließlich wurde ein bis dahin unbekannter negativer Rückkopplungsmechanismus aufgedeckt, der die Gesamtmenge an lymphatischem Gewebe im adulten Organismus kontrolliert und begrenzt. Dabei wird ein Hemmstoff über LT β R auf Stromazellen in lymphatischem Gewebe induziert, der über den Blutstrom verteilt wird und LT β R-unabhängig einen hemmenden Einfluss auf Stromazellen anderer lymphatischer Gewebe ausübt. Die Regulation von lymphatischem Gewebe muss um diesen Aspekt erweitert werden. Dabei kann angenommen werden, dass die Menge an Hemmstoff im Serum, der von den lymphatischen Geweben generiert wird, dessen Menge reguliert und somit eine direkte Beziehung zwischen diesen beiden Größen besteht. Eine differentielle Genexpressionsanalyse der lymphatischen Organe von WT- und LT β R^{-/-}-Tieren sollte mögliche Kandidaten für den Hemmstoff aufzeigen, deren Wirkung dann in nachfolgenden Versuchen direkt getestet werden kann. Dieser Wirkstoff könnte sich in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen als sehr nützlich erweisen, da er lokal verabreicht, vorhandenes ektopisches lymphatisches Gewebe durch Inhibition der organisierenden Stromazellen zurückdrängen und damit sowohl die Zerstörung des Gewebes als auch die Bildung autoreaktiver Antikörper vermindern könnte.

5 Zusammenfassung

Die effektive Immunantwort gegen Krankheitserreger wird durch die sekundär lymphatischen Organe gewährleistet, deren Entstehung in der Ontogenese an den Lymphotoxin- β -Rezeptor gekoppelt ist. Seine Bedeutung im adulten Organismus für die Bildung von ektope lymphatischem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen ist dagegen unklar, da bisherige Modelle diesen Prozess nur unzureichend nachstellen konnten.

In dieser Arbeit wurde die avaskuläre Milztransplantation bei Mäusen als Modell für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus etabliert, mit dem die Rolle einzelner Moleküle auf lokaler Ebene untersucht werden kann. Das Transplantat stimmte nach 8 Wochen bei der im Durchflusszytometer bestimmten Zusammensetzung der Lymphozyten, der immunhistologischen Darstellung von Follikeln, PALS, Marginalzone und FDCs sowie der Bildung von Keimzentren nach SRBC-Stimulation mit der Kontrollmilz überein. Die mit Mikrodissektion und RT-PCR untersuchte mRNA-Expression der Zytokine IL-2, -4, -10, -12 und -15 sowie TGF- β und IFN- γ wies ebenfalls keine Unterschiede auf.

LT β R^{-/-}-Mäuse besitzen weder Lymphknoten noch Peyersche Platten und die Weiße Pulpa der Milz weist zahlreiche Defekte auf. Durch Überkreuz-Transplantation von Milzgewebe bei WT- und LT β R^{-/-}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Neubildung von lymphatischem Gewebe sowie die Entwicklung von MZ B-Zellen, metallophilen Makrophagen, FDCs und Keimzentren auch im adulten Tier substantiell von der LT β R-Expression auf Stromazellen in der Milz abhängt. Erstmals konnte hierbei ein hemmender Einfluss der LT β R-Expression gezeigt werden, der die Gesamtmenge an lymphatischem Gewebe im adulten Organismus reguliert. Abhängig von der Menge an LT β R-exprimierendem Gewebe wird dabei nicht nur die Neubildung eingeschränkt, sondern auch bereits vorhandenes lymphatisches Gewebe reduziert. Die Ergebnisse deuten an, dass die Hemmung über einen LT β R-induzierten Faktor erfolgt, der mit dem Blutkreislauf zu den lymphatischen Geweben gelangt und dort auf die Stromazellen wirkt. Die Hemmung erfolgt nicht über den LT β R und erfordert einen gleichmäßig hohen Spiegel des Faktors.

Die Isolierung dieses Faktors könnte neue Möglichkeiten in der Therapie von Autoimmunkrankheiten bieten, da mit ihm lokal, ektope lymphatisches Gewebe gezielt zurückgedrängt und die Zerstörung des Gewebes vermindert werden könnte.

6 Literatur

1. Medzhitov R. and Janeway C., Jr.
Innate immunity
N Engl J Med, 2000, 343:338-344
2. Delves P. J. and Roitt I. M.
The immune system. Second of two parts
N Engl J Med, 2000, 343:108-117
3. Hugues S., Fetler L., Bonifaz L., Helft J., Amblard F. and Amigorena S.
Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity
Nat Immunol, 2004, 5:1235-1242
4. Trinchieri G.
Cytokines and cytokine receptors
Immunol Rev, 2004, 202:5-7
5. Abbas A. K., Murphy K. M. and Sher A.
Functional diversity of helper T lymphocytes
Nature, 1996, 383:787-793
6. Fehniger T. A. and Caligiuri M. A.
Interleukin 15: biology and relevance to human disease
Blood, 2001, 97:14-32
7. Gorelik L. and Flavell R. A.
Transforming growth factor-beta in T-cell biology
Nat Rev Immunol, 2002, 2:46-53
8. Crivellato E., Vacca A. and Ribatti D.
Setting the stage: an anatomist's view of the immune system
Trends Immunol, 2004, 25:210-217
9. Delves P. J. and Roitt I. M.
The immune system. First of two parts
N Engl J Med, 2000, 343:37-49
10. Westermann J. and Pabst R.
Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body
Clin Investig, 1992, 70:539-544
11. Westermann J., Bode U., Sahle A., Speck U., Karin N., Bell E. B., Kalies K. and Gebert A.
Naive, effector, and memory T lymphocytes efficiently scan dendritic cells in vivo: contact frequency in T cell zones of secondary lymphoid organs does not depend on LFA-1 expression and facilitates survival of effector T cells
J Immunol, 2005, 174:2517-2524

12. Cyster J. G.
Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs
Annu Rev Immunol, 2004
13. Katakai T., Hara T., Sugai M., Gonda H. and Shimizu A.
Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes
J Exp Med, 2004, 200:783-795
14. Nolte M. A., Belien J. A., Schadee-Eestermans I., Jansen W., Unger W. W., Van R. N., Kraal G. and Mebius R. E.
A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp
J Exp Med, 2003, 198:505-512
15. Witmer M. D. and Steinman R. M.
The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node, and Peyer's patch
Am J Anat, 1984, 170:465-481
16. Leenen P. J., Radosevic K., Voerman J. S., Salomon B., Van R. N., Klatzmann D. and van E. W.
Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover
J Immunol, 1998, 160:2166-2173
17. Kraal G.
Cells in the marginal zone of the spleen
Int Rev Cytol, 1992, 132:31-74
18. Shortman K. and Liu Y. J.
Mouse and human dendritic cell subtypes
Nat Rev Immunol, 2002, 2:151-161
19. Balogh P., Aydar Y., Tew J. G. and Szakal A. K.
Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen
Cell Immunol, 2001, 214:45-53
20. Kosco-Vilbois M. H.
Are follicular dendritic cells really good for nothing?
Nat Rev Immunol, 2003, 3:764-769
21. Zlotnik A. and Yoshie O.
Chemokines: a new classification system and their role in immunity
Immunity, 2000, 12:121-127

22. Cyster J. G.
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs
Science, 1999, 286:2098-2102
23. Reif K., Ekland E. H., Ohl L., Nakano H., Lipp M., Forster R. and Cyster J. G.
Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position
Nature, 2002, 416:94-99
24. Karrer U., Althage A., Odermatt B., Hengartner H. and Zinkernagel R. M.
Immunodeficiency of alymphoplasia mice (aly/aly) in vivo: structural defect of secondary lymphoid organs and functional B cell defect
Eur J Immunol, 2000, 30:2799-2807
25. Saß W., Dohrmann P., Löhnert M., Seifert J. and Mengel W.
Klinische und experimentelle Befunde zu den Folgen des Milzverlustes
Chirurgische Gastroenterologie, 2003, 9:58-61
26. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P. J., Cofield R. H., O'Fallon W. M., Goronzy J. J. and Weyand C. M.
Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis
J Immunol, 2001, 167:1072-1080
27. Ettinger R., Munson S. H., Chao C. C., Vadeboncoeur M., Toma J. and McDevitt H. O.
A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice
J Exp Med, 2001, 193:1333-1340
28. Armengol M. P., Juan M., Lucas-Martin A., Fernandez-Figueras M. T., Jaraquemada D., Gallart T. and Pujol-Borrell R.
Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers
Am J Pathol, 2001, 159:861-873
29. Salomonsson S., Jonsson M. V., Skarstein K., Brokstad K. A., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. and 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, 48:3187-3201
30. Mackay F. and Kalled S. L.
TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update
Curr Opin Immunol, 2002, 14:783-790
31. Weyand C. M., Kurtin P. J. and Goronzy J. J.
Ectopic lymphoid organogenesis: a fast track for autoimmunity
Am J Pathol, 2001, 159:787-793

32. 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
33. Cupedo T. and Mebius R. E.
Cellular interactions in lymph node development
J Immunol, 2005, 174:21-25
34. Weih F. and Caamano J.
Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway
Immunol Rev, 2003, 195:91-105
35. Vinuesa C. G. and Cook M. C.
The molecular basis of lymphoid architecture and B cell responses: implications for immunodeficiency and immunopathology
Curr Mol Med, 2001, 1:689-725
36. Ware C. F.
NETWORK COMMUNICATIONS: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF
Annu Rev Immunol, 2005, 23:787-819
37. Fütterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M. H. and Pfeffer K.
The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues
Immunity, 1998, 9:59-70
38. Dejardin E., Droin N. M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C., Li Z. W., Karin M., Ware C. F. and Green D. R.
The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways
Immunity, 2002, 17:525-535
39. Rennert P. D., James D., Mackay F., Browning J. L. and Hochman P. S.
Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor
Immunity, 1998, 9:71-79
40. Kanzler B. and Dear T. N.
Hox11 acts cell autonomously in spleen development and its absence results in altered cell fate of mesenchymal spleen precursors
Dev Biol, 2001, 234:231-243
41. Rennert P. D., Browning J. L., Mebius R., Mackay F. and Hochman P. S.
Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs
J Exp Med, 1996, 184:1999-2006

42. Rennert P. D., Browning J. L. and Hochman P. S.
Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization
Int Immunol, 1997, 9:1627-1639
43. Browning J. L. and French L. E.
Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos
J Immunol, 2002, 168:5079-5087
44. Stopfer P., Mannel D. N. and Hehlhans T.
Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells
J Immunol, 2004, 172:7459-7465
45. Browning J. L., Sizing I. D., Lawton P., Bourdon P. R., Rennert P. D., Majeau G. R., Ambrose C. M., Hession C., Miatkowski K., Griffiths D. A., Ngam-Ek A., Meier W., Benjamin C. D. and Hochman P. S.
Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes
J Immunol, 1997, 159:3288-3298
46. Mebius R. E.
Organogenesis of lymphoid tissues
Nat Rev Immunol, 2003, 3:292-303
47. Muller G., Hopken U. E. and Lipp M.
The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity
Immunol Rev, 2003, 195:117-135
48. Luther S. A., Tang H. L., Hyman P. L., Farr A. G. and Cyster J. G.
Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse
Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97:12694-12699
49. Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E. and Lipp M.
CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs
Cell, 1999, 99:23-33
50. Forster R., Mattis A. E., Kremmer E., Wolf E., Brem G. and Lipp M.
A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen
Cell, 1996, 87:1037-1047
51. Gunn M. D., Ngo V. N., Ansel K. M., Eklund E. H., Cyster J. G. and Williams L. T.
A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1
Nature, 1998, 391:799-803

52. Ansel K. M., Ngo V. N., Hyman P. L., Luther S. A., Forster R., Sedgwick J. D., Browning J. L., Lipp M. and Cyster J. G.
A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles
Nature, 2000, 406:309-314
53. Tumanov A., Kuprash D., Lagarkova M., Grivennikov S., Abe K., Shakhov A., Drutskaya L., Stewart C., Chervonsky A. and Nedospasov S.
Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues
Immunity, 2002, 17:239-250
54. Ngo V. N., Cornall R. J. and Cyster J. G.
Splenic T zone development is B cell dependent
J Exp Med, 2001, 194:1649-1660
55. Wu Q., Sun Y., Wang J., Lin X., Wang Y., Pegg L. E., Fütterer A., Pfeffer K. and Fu Y. X.
Signal via lymphotoxin-beta R on bone marrow stromal cells is required for an early checkpoint of NK cell development
J Immunol, 2001, 166:1684-1689
56. Gommerman J. L. and Browning J. L.
Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease
Nat Rev Immunol, 2003, 3:642-655
57. Fu Y. X. and Chaplin D. D.
Development and maturation of secondary lymphoid tissues
Annu Rev Immunol, 1999, 17:399-433
58. Ettinger R., Browning J. L., Michie S. A., van E. W. and McDevitt H. O.
Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble lymphotoxin-beta receptor-IgG1 fusion protein
Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93:13102-13107
59. Mackay F., Majeau G. R., Lawton P., Hochman P. S. and Browning J. L.
Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice
Eur J Immunol, 1997, 27:2033-2042
60. Gonzalez M., Mackay F., Browning J. L., Kosco-Vilbois M. H. and Noelle R. J.
The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles
J Exp Med, 1998, 187:997-1007
61. Endres R., Alimzhanov M. B., Plitz T., Fütterer A., Kosco-Vilbois M. H., Nedospasov S. A., Rajewsky K. and 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, 189:159-168

62. Fu Y. X., Molina H., Matsumoto M., Huang G., Min J. and Chaplin D. D.
Lymphotoxin-alpha (LTalpha) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses
J Exp Med, 1997, 185:2111-2120
63. Muller G., Hopken U. E., Stein H. and Lipp M.
Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors
J Leukoc Biol, 2002, 72:1-8
64. Luther S. A., Lopez T., Bai W., Hanahan D. and Cyster J. G.
BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis
Immunity, 2000, 12:471-481
65. Luther S. A., Bidgol A., Hargreaves D. C., Schmidt A., Xu Y., Paniyadi J., Matloubian M. and Cyster J. G.
Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis
J Immunol, 2002, 169:424-433
66. Drayton D. L., Ying X., Lee J., Lesslauer W. and Ruddle N. H.
Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase
J Exp Med, 2003, 197:1153-1163
67. Metcalf D.
Restricted growth capacity of multiple spleen grafts
Transplantation, 1964, 84:387-392
68. van E. W. and Nieuwenhuis P.
Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp
Experientia, 1985, 41:199-208
69. Pabst R., Westermann J. and Rothkotter H. J.
Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants
Int Rev Cytol, 1991, 128:215-260
70. Johnson J. and Weiss L.
Electron microscopic study of subcutaneous and intraperitoneal splenules in the mouse
Am J Anat, 1989, 185:89-100
71. Claassen E., Ott A., Boersma W. J., Deen C., Schellekens M. M., Dijkstra C. D., Kors N. and Van R. 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

72. Bailey D. W. and Usama B.
A rapid method of grafting skin on tails of mice
Transplant Bull, 1960, 7:424-425
73. Hedrich H. J.
Testing for Isohistogeneity (Skin Grafting)
in Genetic monitoring of inbred strains of rats, 1990, Gustav Fischer Verlag:102-114
74. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. and Toda M.
Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases
J Immunol, 1995, 155:1151-1164
75. Philpott N. J., Turner A. J., Scopes J., Westby M., Marsh J. C., Gordon-Smith E. C., Dagleish A. G. and Gibson F. M.
The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques
Blood, 1996, 87:2244-2251
76. Ware C. F.
The TNF superfamily
Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14:181-184
77. Hehlhans T. and 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
78. Tumanov A. V., Kuprash D. V. and Nedospasov S. A.
The role of lymphotoxin in development and maintenance of secondary lymphoid tissues
Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14:275-288
79. Ettinger R., Mebius R., Browning J. L., Michie S. A., van T. S., Kraal G., van E. W. and McDevitt H. O.
Effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on peripheral lymphoid tissue development
Int Immunol, 1998, 10:727-741
80. Westermann J., Pabst R. and Claassen E.
Histophysiology of autotransplanted splenic tissue
Res Immunol, 1991, 142:321-325
81. Alves H. J., Viana G., Magalhaes M. M., Arantes R. M., Coelho P. M. and Cunha-Melo J. R.
Kinetics of neovascularisation of splenic autotransplants in mice
J Anat, 1999, 195 (Pt 3):387-392

82. Tavassoli M. and Khademi R.
The origin of hemopoietic cells in ectopic implants of spleen and marrow
Experientia, 1980, 36:1126-1127
83. Willfuhr K. U., Westermann J. and Pabst R.
Absolute numbers of lymphocyte subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen
Eur J Immunol, 1990, 20:903-911
84. Westermann J. and Pabst R.
Autotransplantation of splenic fragments: lymphocyte subsets in blood, lymph nodes and splenic tissue
Clin Exp Immunol, 1986, 64:188-194
85. Campbell D. J. and Butcher E. C.
Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues
J Exp Med, 2002, 195:135-141
86. Carsetti R., Rosado M. M. and Wardmann H.
Peripheral development of B cells in mouse and man
Immunol Rev, 2004, 197:179-191
87. Belkaid Y., Piccirillo C. A., Mendez S., Shevach E. M. and Sacks D. L.
CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity
Nature, 2002, 420:502-507
88. Elewaut D., Brossay L., Santee S. M., Naidenko O. V., Burdin N., De W. H., Matsuda J., Ware C. F., Cheroutre H. and Kronenberg M.
Membrane lymphotoxin is required for the development of different subpopulations of NK T cells
J Immunol, 2000, 165:671-679
89. Gregori S., Giarratana N., Smiroldo S. and Adorini L.
Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development
J Immunol, 2003, 171:4040-4047
90. Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres R., Lamers M. C. and Carsetti R.
B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals
J Exp Med, 1999, 190:75-89
91. Kraal G., Schornagel K., Streeter P. R., Holzmann B. and Butcher E. C.
Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen
Am J Pathol, 1995, 147:763-771
92. Lo C. G., Lu T. T. and Cyster J. G.
Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp
J Exp Med, 2003, 197:353-361

93. Lu T. T. and Cyster J. G.
Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone
Science, 2002, 297:409-412
94. Wang J., Lo J. C., Foster A., Yu P., Chen H. M., Wang Y., Tamada K., Chen L. and Fu Y. X.
The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT
J Clin Invest, 2001, 108:1771-1780
95. Westermann J., Peschel P. and Pabst R.
Immunoarchitecture of regenerated splenic transplants: influence of donor and host age on the regeneration of splenic compartments
Cell Tissue Res, 1988, 254:403-413
96. Van den Eertwegh A. J., Boersma W. J. and Claassen E.
Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen
Crit Rev Immunol, 1992, 11:337-380
97. Zhou P., Hwang K. W., Palucki D., Kim O., Newell K. A., Fu Y. X. and Alegre M. L.
Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses
Am J Transplant, 2003, 3:259-266
98. Ehlers S., Holscher C., Scheu S., Tertilt C., Hehlhans T., Suwinski J., Endres R. and Pfeffer K.
The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*
J Immunol, 2003, 170:5210-5218
99. Oliver A. M., Martin F. and Kearney J. F.
IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells
J Immunol, 1999, 162:7198-7207
100. Alimzhanov M. B., Kuprash D. V., Kosco-Vilbois M. H., Luz A., Turetskaya R. L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S. A. and Pfeffer K.
Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94:9302-9307
101. Ohl L., Henning G., Krautwald S., Lipp M., Hardtke S., Bernhardt G., Pabst O. and Forster R.
Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs
J Exp Med, 2003, 197:1199-1204

102. Nolte M. A., Arens R., Kraus M., van Oers M. H., Kraal G., van Lier R. A. and Mebius R. E.
B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone
J Immunol, 2004, 172:3620-3627
103. Tumanov A. V., Grivennikov S. I., Shakhov A. N., Rybtsov S. A., Koroleva E. P., Takeda J., Nedospasov S. A. and Kuprash D. V.
Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting
Immunol Rev, 2003, 195:106-116
104. Gunn M. D., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L. T. and Nakano H.
Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization
J Exp Med, 1999, 189:451-460
105. Ngo V. N., Korner H., Gunn M. D., Schmidt K. N., Riminton D. S., Cooper M. D., Browning J. L., Sedgwick J. D. and Cyster J. G.
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, 189:403-412
106. Ware C. F., Crowe P. D., Grayson M. H., Androlewicz M. J. and Browning J. L.
Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells
J Immunol, 1992, 149:3881-3888
107. Mauri D. N., Ebner R., Montgomery R. I., Kochel K. D., Cheung T. C., Yu G. L., Ruben S., Murphy M., Eisenberg R. J., Cohen G. H., Spear P. G. and Ware C. F.
LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator
Immunity, 1998, 8:21-30
108. Tamada K., Shimozaki K., Chapoval A. I., Zhai Y., Su J., Chen S. F., Hsieh S. L., Nagata S., Ni J. and Chen L.
LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response
J Immunol, 2000, 164:4105-4110
109. Wang J., Foster A., Chin R., Yu P., Sun Y., Wang Y., Pfeffer K. and Fu Y. X.
The complementation of lymphotoxin deficiency with LIGHT, a newly discovered TNF family member, for the restoration of secondary lymphoid structure and function
Eur J Immunol, 2002, 32:1969-1979
110. Granger S. W. and Rickert S.
LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity
Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14:289-296

111. Scheu S., Alferink J., Potzel T., Barchet W., Kalinke U. and 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, 195:1613-1624
112. Kapasi Z. F., Qin D., Kerr W. G., Kosco-Vilbois M. H., Shultz L. D., Tew J. G. and Szakal A. K.
Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues
J Immunol, 1998, 160:1078-1084
113. Cyster J. G., Ansel K. M., Reif K., Ekland E. H., Hyman P. L., Tang H. L., Luther S. A. and Ngo V. N.
Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles
Immunol Rev, 2000, 176:181-193
114. Koni P. A., Sacca R., Lawton P., Browning J. L., Ruddle N. H. and Flavell R. A.
Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice
Immunity, 1997, 6:491-500
115. Korner H., Cook M., Riminton D. S., Lemckert F. A., Hoek R. M., Ledermann B., Kontgen F., Fazekas de St G. B. and Sedgwick J. D.
Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue
Eur J Immunol, 1997, 27:2600-2609
116. Pasparakis M., Alexopoulou L., Grell M., Pfizenmaier K., Bluethmann H. and 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
117. Mackay F. and Browning J. L.
Turning off follicular dendritic cells
Nature, 1998, 395:26-27
118. Cupedo T., Jansen W., Kraal G. and Mebius R. E.
Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin
Immunity, 2004, 21:655-667
119. Muller J. R. and Siebenlist U.
Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways
J Biol Chem, 2003, 278:12006-12012
120. Weih D. S., Yilmaz Z. B. and Weih F.
Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines
J Immunol, 2001, 167:1909-1919

121. Schneider K., Potter K. G. and Ware C. F.
Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes
Immunol Rev, 2004, 202:49-66
122. Ludewig B., Odermatt B., Landmann S., Hengartner H. and Zinkernagel R. M.
Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue
J Exp Med, 1998, 188:1493-1501
123. Wu Q., Salomon B., Chen M., Wang Y., Hoffman L. M., Bluestone J. A. and Fu Y. X.
Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor
J Exp Med, 2001, 193:1327-1332
124. Ruddle N. H.
Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development
Immunol Res, 1999, 19:119-125
125. Sasaki K. and Matsumura G.
Spleen lymphocytes and haemopoiesis in the mouse embryo
J Anat, 1988, 160:27-37
126. Baddoura F. K., Nasr I. W., Wrobel B., Li Q., Ruddle N. H. and Lakkis F. G.
Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection
Am J Transplant, 2005, 5:510-516
127. Matsuyama M., Wiadrowski M. N. and Metcalf D.
Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts
J Exp Med, 1966, 123:559-576
128. Kong Y. Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H. L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A. J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C. R., Lacey D. L., Mak T. W., Boyle W. J. and Penninger J. M.
OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis
Nature, 1999, 397:315-323
129. Dougall W. C., Glaccum M., Charrier K., Rohrbach K., Brasel K., De S. T., Daro E., Smith J., Tometsko M. E., Maliszewski C. R., Armstrong A., Shen V., Bain S., Cosman D., Anderson D., Morrissey P. J., Peschon J. J. and Schuh J.
RANK is essential for osteoclast and lymph node development
Genes Dev, 1999, 13:2412-2424
130. Kweon M. N., Yamamoto M., Rennert P. D., Park E. J., Lee A. Y., Chang S. Y., Hiroi T., Nanno M. and Kiyono H.
Prenatal blockage of lymphotoxin beta receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine
J Immunol, 2005, 174:4365-437

Anhang

Tabelle 8: Übersicht der Gewichte und Gesamtleukozyten von Milzen und Transplantaten

Spender	Empfänger	Milz des Empfängers		Transplantat	
		Gewicht [mg]	Leukozyten ($\times 10^6$)	Gewicht [mg]	Leukozyten ($\times 10^6$)
—	WT-Kontrolle	91 \pm 16 (n = 11)	102 \pm 19 (n = 11)	—	—
—	LT β R ^{-/-} -Kontrolle	113 \pm 18 (n = 8)	100 \pm 16 (n = 8)	—	—
WT	WT (splenekt.)	—	—	44 \pm 8 (n = 9)	18 \pm 3 (n = 9)
WT	LT β R ^{-/-} (splenekt.)	—	—	115 \pm 8 (n = 4)	51 \pm 3 (n = 4)
LT β R ^{-/-}	WT (splenekt.)	—	—	18 \pm 8 (n = 6)	1,0 \pm 0,5 (n = 6)
WT	WT mit Milz	75 \pm 10 (n = 6)	75 \pm 10 (n = 6)	12 \pm 9 (n = 5)	1,6 \pm 0,8 (n = 5)
LT β R ^{-/-}	WT mit Milz	89 \pm 26 (n = 4)	91 \pm 23 (n = 4)	13 \pm 11 (n = 5)	0,8 \pm 0,5 (n = 5)
WT	LT β R ^{-/-} mit Milz	77 \pm 20 (n = 7)	37 \pm 10 (n = 7)	108 \pm 23 (n = 8)	51 \pm 11 (n = 8)
LT β R ^{-/-}	LT β R ^{-/-} mit Milz	103 \pm 13 (n = 5)	95 \pm 12 (n = 5)	28 \pm 9 (n = 5)	4 \pm 1 (n = 5)
WT	LT β R ^{-/-} mit WT-Milz	—	—	67 \pm 27 (n = 8)	26 \pm 11 (n = 8)
LT β R ^{-/-}	LT β R ^{-/-} mit WT-Milz	—	—	16 \pm 9 (n = 7)	0,3 \pm 0,2 (n = 7)

Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts und der Gesamtleukozytenzahl von eigenen Milzen und Transplantaten mit Angabe der Anzahl der Versuchstiere in Klammern unter den entsprechenden Werten.

Tabelle 9: Übersicht der im Durchflusszytometer bestimmten Lymphozyten Subpopulationen

Spender	Empfänger	Prozent von Gesamtlmphozyten							Prozent von CD4-T-Zellen		Prozent von B-Zellen
		B-Zellen	T-Zellen	CD 8 T-Z.	CD4 T-Z.	NK-Z.	NK-T-Z.	CD4 mem.	CD4 reg.	IgD neg.	
—	<u>WT-Kontrolle</u> (n = 6)	69 ± 3	25 ± 3	10 ± 2	16 ± 2	3 ± 0,5	1 ± 0,3	25 ± 8	19 ± 2	10 ± 4	8 ± 2
—	<u>LTβR^{-/-}-Kontrolle</u> (n = 5)	77 ± 4	22 ± 4	9 ± 1	13 ± 3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	36 ± 5	15 ± 3	7 ± 2	0,4 ± 0,3
WT	<u>WT mit Milz</u> (n = 6)	61 ± 3	33 ± 3	14 ± 1	19 ± 2	3 ± 1	1 ± 0,2	21 ± 1	17 ± 2	14 ± 3	9 ± 2
<u>WT</u> (n = 3)	WT (splenektomiert)	73 ± 6	22 ± 5	8 ± 3	15 ± 3	3 ± 1	0,5 ± 0,1	24 ± 6	12 ± 2	12 ± 1	5 ± 0,4
<u>WT</u> (n = 4)	LTβR ^{-/-} (splenektomiert)	76 ± 5	23 ± 5	6 ± 1	17 ± 4	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	35 ± 9	14 ± 5	16 ± 4	3 ± 2
<u>WT</u> (n = 7)	LTβR ^{-/-} mit eigener Milz	75 ± 4	24 ± 4	7 ± 2	17 ± 4	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	32 ± 9	16 ± 5	12 ± 5	4 ± 2
<u>WT</u> (n = 5)	LTβR ^{-/-} mit WT-Milz	71 ± 11	28 ± 2	9 ± 1	19 ± 1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	34 ± 7	15 ± 4	14 ± 5	8 ± 5

Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile der angegebenen Lymphozyten Subpopulationen. Die Werte gelten jeweils für die unterstrichenen Milzen bzw. Transplantate mit Angabe der Anzahl der Versuchstiere in Klammern.

Tabelle 10: Übersicht der im Durchflusszytometer bestimmten Expression von Oberflächenmolekülen auf T und B Lymphozyten

Spender	Empfänger	Positive Prozent von T-Zellen					Positive Prozent von B-Zellen				
		L-Selektin	ICAM-1	$\alpha 4\beta 7$	CD44	CD69	L-Selektin	ICAM-1	$\alpha 4\beta 7$	CD44	MHCII
—	<u>WT-Kontrolle</u> (n = 6)	67 ± 13	84 ± 5	36 ± 15	84 ± 4	11 ± 1	73 ± 10	99 ± 1	94 ± 6	99 ± 1	95 ± 2
—	<u>LTβR^{-/-}-Kontrolle</u> (n = 5)	53 ± 12	95 ± 2	48 ± 21	84 ± 4	19 ± 2	68 ± 9	100 ± 0	96 ± 1	100 ± 0	96 ± 1
WT	<u>WT mit Milz</u> (n = 6)	62 ± 14	85 ± 4	42 ± 11	85 ± 2	9 ± 1	64 ± 18	100 ± 0	92 ± 6	100 ± 0	95 ± 2
<u>WT</u> (n = 3)	WT (splenektomiert)	62 ± 13	81 ± 1	32 ± 16	80 ± 2	9 ± 3	54 ± 10	100 ± 0	90 ± 7	99 ± 0	95 ± 1
<u>WT</u> (n = 4)	LT β R ^{-/-} (splenektomiert)	40 ± 16	90 ± 3	34 ± 20	81 ± 5	25 ± 6	66 ± 16	100 ± 0	93 ± 3	100 ± 0	97 ± 1
<u>WT</u> (n = 7)	LT β R ^{-/-} mit Milz	56 ± 10	90 ± 6	40 ± 14	82 ± 4	25 ± 8	73 ± 13	100 ± 0	93 ± 7	100 ± 0	97 ± 1
<u>WT</u> (n = 5)	LT β R ^{-/-} mit WT-Milz	53 ± 11	91 ± 4	45 ± 2	83 ± 5	20 ± 5	61 ± 9	99 ± 0	71 ± 3	98 ± 1	94 ± 2

Mittelwerte und Standardabweichungen der für die angegebenen Oberflächenmoleküle positiven T- und B-Zellen in Prozent. Die Werte gelten jeweils für die unterstrichenen Milzen bzw. Transplantate mit Angabe der Anzahl der Versuchstiere in Klammern.

Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
BSA	Rindeserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
CCL	C-C Chemokin-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre (engl. <i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
ct	engl. <i>cycle of threshold</i>
CXCL	C-X-C Chemokin-Ligand
CXCR	C-X-C Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>
FDC	Follikulär Dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fo	Follikel
FSC	engl. forward scatter
g	Gramm
x g	-fache Erdbeschleunigung
ICAM	engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KZ	Keimzentrum
LIGHT	engl. <i>Homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM on Tcells</i>
l	Liter
LT β	Lymphotoxin- β
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
mg	Milligramm

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
M	Molar
Min	Minute
MLN	engl. <i>metastatic lymph node</i>
MMM	metallophile Makrophagen
mRNA	Boten (engl. <i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
MZ	Marginalzone
NF-κB	engl. <i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
nM	Nanomolar
Pa	siehe PALS
PALS	Periarterioläre Lymphozytenscheide
PE	Phycoerythrin
RANK	engl. <i>receptor activator of NF-κB</i>
RIP	Ratteninsulinpromotor
RP	Rote Pulpa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
SRBC	Schaferythrozyten (engl. <i>sheep red blood cell</i>)
SSC	engl. <i>side scatter</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i>)
TGF	engl. <i>tumor growth factor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
U	Unit
U/Min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen