

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



Der Einfluss des microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4)
auf die Entwicklung sekundär lymphatischen Gewebes
während der Ontogenese und im adulten Organismus

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Friederike Schmidt

aus Bad Oldesloe

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Karin Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung 06.09.2017
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.09.2017

– Promotionskommission der Sektion Medizin –

*„Aber hier, wie überhaupt,
kommt es anders, als man glaubt.“*

Wilhelm Busch

Meinem Großvater,
Johannes Bluhm

INHALT

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
EINLEITUNG	2
MATERIAL UND METHODEN	11
Tiere und Tierhaltung	11
Operationen	11
<i>Milztransplantation</i>	12
<i>Organentnahme</i>	13
Färbungen	13
<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	14
1. <i>Metallophile Marginalzonenmakrophagen, Makrophagen der roten Pulpa, T-Zellen, Keimzentren</i>	14
2. <i>B-Zellen, FDCs</i>	15
3. <i>MFAP4</i>	15
4. <i>Doppelfärbung: proliferierende Zellen und B-Zellen</i>	16
<i>Immunfluoreszenzfärbungen</i>	16
Auswertung der gefärbten Schnitte	18
Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
<i>RNA-Isolation und cDNA-Synthese</i>	21
<i>Quantitative real-time RT-PCR</i>	22
Statistische Auswertung und graphische Darstellung	23

ERGEBNISSE	24
MFAP4 co-lokalisiert mit Laminin in den Follikeln und der TZZ	24
Das Fehlen von MFAP4 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Milz während der Ontogenese	30
Die Regeneration der Milz im adulten Organismus ist unabhängig von MFAP4	40
MFAP4 der Milz wird innerhalb und außerhalb der Milz produziert	51
MFAP4 in Regeneraten aus KO→WT Transplantationen wird sowohl lokal von eingewanderten WT-Zellen, als auch systemisch von externen WT-Zellen des Empfängers produziert	55
DISKUSSION	58
ZUSAMMENFASSUNG	69
LITERATURVERZEICHNIS	70
ANHANG	84
Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analyse von Regeneraten aus gekreuzten Transplantationen (KO→WT und WT→KO)	84
<i>Gewicht und histologische Struktur</i>	84
<i>Keimzentrumszahl, Lymphozytenproliferation und Dichte des FDC-Netzwerkes</i>	88
DANKSAGUNG	92
CURRICULUM VITAE	93

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCR	B-Zell-Rezeptor
BZZ	B-Zell-Zone
DC	dendritische Zelle
EZM	extrazelluläre Matrix
F	Follikel
FDC	follikulär dendritische Zelle
FRC	fibroblastische Retikulumzelle
FReD	fibronogen-related domain
FReP	fibrinogen-related protein
ges. Fl.	gesamte Fläche eines Milzschnittes
Ig	Immunglobulin
Keimz.	Keimzentrum
KO	knock-out
LTi	lymphatic tissue inducer cells
LTo	lymphatic tissue organizer cells
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
MMM	metallophile Marginalzonenmakrophagen
MRC	Marginalzonen Retikulumzelle
MZ	Marginalzone
MZBZ	Marginalzonen B-Zellen
MZM	Marginalzonenmakrophagen
pBZ	proliferierende Zellen in der B-Zell-Zone
PNA	peanut agglutinin
pTZ	proliferierende T-Zellen in der T-Zell-Zone
RP	rote Pulpa
RT-PCR	Reversetranskriptase Polymerasekettenreaktion
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZZ bzw. T	T-Zell-Zone
WP	weiße Pulpa
WT	Wildtyp

EINLEITUNG

Die Entwicklung sekundär lymphatischen Gewebes ist gut reguliert und es ist vieles über diesen Regulationsprozess bekannt: Im Allgemeinen entwickelt sich lymphatisches Gewebe, indem Lymphozyten als lymphatic tissue inducer cells (LTi) die Ausbildung des Stromalen Gerüsts und Produktion der EZM-Bestandteile durch die als lymphatic tissue organizer cells (LTo) bezeichneten Stromazellen vor allem über Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ (LTi) und den Lymphotoxin- β -Rezeptor (LTo) induzieren (Roozendaal 2011, van de Pavert 2009, Schmutz 2009, Katakai 2004). Daraufhin bewirken die LTo über die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen die Einwanderung und Kompartimentierung der unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen und sichern deren Überleben (Koning 2012, Roozendaal 2011, Mueller 2009, Bajénoff 2006, Ngo 2001, Ansel 2000). Wird der positive Feedbackmechanismus dieses Wechselspiels gestört, findet keine adäquate Entwicklung statt und die Funktion des Gewebes ist eingeschränkt oder ganz aufgehoben (Rezk 2013, Koning 2012, Roozendaal 2011, Milićević and Klaperski 2011, Klaperski 2006, Nohroudi 2005, Kawabe 1994, Kapasi 1993). Fehlt zum Beispiel der Lymphotoxin- β -Rezeptor während der Entwicklung der Milz, ist dieses Organ zwar vorhanden, doch sind die Kompartimente der weißen Pulpa, die lediglich als fleckförmige Lymphozytenansammlung von einer roten Pulpa abzugrenzen ist, nicht korrekt ausgebildet (Milićević and Klaperski 2011, Klaperski 2006). Dieser Mechanismus reguliert nicht nur die Entwicklung sekundär lymphatischer Gewebe während der Ontogenese, sondern auch das Wachstum lymphatischen Gewebes im adulten Organismus, wie es am Beispiel von Milzregeneraten gezeigt wurde (Nohroudi 2005). Neben der starken Beeinträchtigung der Entwicklung der Milzregenerate bei einer Störung der LTi-LTo-Interaktion (Klaperski 2006, Nohroudi 2005) ist bei diesem Regenerationsprozess beobachtet worden, dass die Größenzunahme der Regenerate in engen Grenzen gehalten wird (Nohroudi 2005, Tavassoli 1975). Verbleibt bei der Transplantation die eigene Milz im Empfängerorganismus, ist das Wachstum der Regenerate eingeschränkt (Metcalf 1963) und auch bei der sukzessiven Implantation mehrere Milzfragmente unterdrückt

das bereits regenerierte Gewebe das Wachstum weiterer Transplantate (Tavassoli 1975). Interessanterweise supprimieren nicht nur vorhandenes Milzgewebe, sondern auch Lymphknoten als weiteres sekundär lymphatisches Gewebe das Wachstum der Milzregenerate (Nohroudi 2005), sodass dieser Regulationsmechanismus über das Milzgewebe hinaus systemisch wirkt und so die gesamte Masse sekundär lymphatischen Gewebes konstant gehalten wird (Nohroudi 2005). Der Mechanismus dieser Wachstumsregulation ist weitestgehend unbekannt. Zwar ist bekannt, dass der Lymphotoxin- β -Rezeptor ein entscheidender Faktor ist – fehlt die Lymphotoxin- β -Rezeptor-Expression im Empfängerorganismus, ist das Regenerat um ein 9,5-faches schwerer, als das Regenerat in einem Lymphotoxin- β -Rezeptor exprimierenden Organismus (12 ± 9 mg vs. 115 ± 8 mg) (Nohroudi 2005) – doch ist der Signalweg bisher unbekannt. Expressionsanalysen zeigten, dass das microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) an diesem Signalweg als weiterer Wachstumsfaktor beteiligt sein könnte (unveröffentlichte Daten).

MFAP4 ist ein extrazelluläres Protein, das aus 255 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 36 kDa hat (Schlosser 2006, Lausen 1999, Kobayashi 1994). Über Disulfidbrücken bildet es 68 kDa schwere Homodimere, die sich in Lösung über nicht kovalente Interaktionen zu Oligomeren, vorwiegend Trimeren und Hexameren, zusammenlagern (Pilecki 2016, Sækmose 2013, Schlosser 2006, Lausen 1999). Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau eines Monomers: Es besteht aus einem Signalpeptid, dem sich eine N-terminale Region anschließt, die eine RGD-Sequenz und damit eine Integrinbindungsregion enthält (Lausen 1999, Ruoslahti 1996, Kobayashi 1994). Die C-terminale Region umfasst eine Calcium-Bindungsstelle und eine Fibrinogen-ähnliche Domäne – eine sogenannte FReD – mit der es zur Gruppe der fibrinogen-related proteins (FRePs) gehört (Schlosser 2006, Lausen 1999, Kobayashi 1994). Mit dieser Sequenz hat MFAP4 strukturell Ähnlichkeit zu Proteinen, wie Fibroleukin, Angiopoietin, Ficoline, Tachylektine, Tenascin und Fibronectin und hat die Voraussetzungen, um Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Interaktionen zu vermitteln (Schlosser 2006, Toyoshima 2005, Lausen 1999, Kobayashi 1994). Es kommt sowohl gewebeständig, als auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Blutserum (Pilecki 2015, Sækmose 2013, Mölleken 2009) oder Alveolarflüssigkeit

(Pilecki 2015, Schlosser 2006, Lausen 1999) vor und bindet calciumabhängig Kollagen, Mannose, Maltose, Surfactant Protein A und D, Elastin sowie calciumunabhängig Fibrillin (Pilecki 2016, Schlosser 2006, Toyoshima 2005, Lausen 1999).

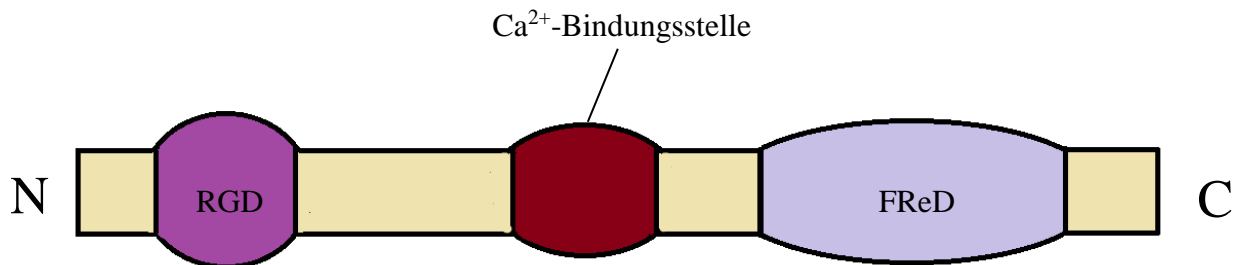


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sequenz eines MFAP4 Monomers.

MFAP4 hat N-terminal ein Signalpeptid, dem sich eine N-terminale Region anschließt, die eine RGD-Sequenz enthält. Die C-terminale Region umfasst eine Calcium-Bindungsstelle und eine Fibrinogen-ähnliche Domäne (FReD).

Erstellt nach der Aminosäuresequenz publiziert durch Niu et al. 2011

Es konnte in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, vor allem in solchen mit einem großen Anteil an elastischem Gewebe, wie Haut, Lunge, Arterienwand und Skelettmuskulatur, in denen es mit Tropoelastin und Fibrillin co-lokalisiert ist (Pilecki 2016, Pilecki 2015, Kasamatsu 2011, Toyoshima 2008, Furuichi 2000, Toyoshima 1999). Über die Verbindung von Zellen mit Bestandteilen der EZM trägt MFAP4 zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität bei und stabilisiert so vor allem die Wand großer Arterien und Atemwege sowie die Haut (Pilecki 2015, Kasamatsu 2011, Toyoshima 2005, Hirose 1998, Hirose 1997, Tilson 1996). Ferner wird die Beteiligung von MFAP4 an immunologischen Prozessen diskutiert: Beim allergischen Asthma ist die Entzündungsreaktion in Abwesenheit von MFAP4 reduziert (Pilecki 2015). Zudem ist der Plasma-MFAP4-Spiegel in Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion signifikant höher, als der in Patienten ohne oder ausgeheilte Hepatitis C Infektion (Sækmoose 2015). Es ist bekannt, dass MFAP4 wie andere FRePs bei Infektionen vermehrt exprimiert wird (Niu 2011). Andere FRePs sind pattern recognition receptor (Hanington 2012, Hanington 2011, Kilpatrick 2012, Palaniyar 2010, Gokudan 1999),

sodass MFAP4 durch seine Lektin-ähnlichen Bindungseigenschaften ebenfalls potentiell Pathogene binden kann. In der Lunge bindet es die Surfactantproteine A und D vor allem unter inflammatorischen Bedingungen und scheint durch eine gleichzeitige Bindung und Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten die angeborene Immunantwort in dem Organ zu unterstützen (Schlosser 2006, Lausen 1999). Eine wichtige Funktion von MFAP4 ist seine Beteiligung an Wachstums- und Entwicklungsprozessen: Es beeinflusst Zellproliferation und Aggregation von Tropoelastin zu Elastin (Pilecki 2016, Pilecki 2015) und in Patienten mit Smith-Magenis-Syndrom, das mit Wachstumsstörungen und Störung der mentalen Entwicklung einhergeht (Omim (Online Mendelian Inheritance of Man) Eintrag #182290), liegt eine Deletion des MFAP4-Gens auf dem kurzen Arm vom Chromosom 17 vor (Omim #600596, Zhao 1995). MFAP ist vor allem an Prozessen mit vermehrter Fibrosierung und EZM-turnover beteiligt: MFAP4 trägt durch seine Integrinbindungseigenschaft und Interaktion insbesondere mit Zellen der glatten Muskulatur maßgeblich zu Remodelingprozessen der Atemwege sowie der Blutgefäßen bei (Schlosser 2016, Pilecki 2015). Es unterstützt die Elastogenese über die Aggregation von Fibrillin zu Mikrofibrillen und es ist bekannt, dass MFAP4 das Zielmolekül von Tranilast, einem Medikament, das zur Prävention hypertrophierender Narben eingesetzt wird, ist (Kasamatsu 2011, Furuichi 2000). Während des Fibrosierungsprozesses im Rahmen einer Leberzirrhose wird MFAP4 vermehrt exprimiert (Sækmose 2015, Mölleken 2009).

Um nun den Einfluss von MFAP4 auf das Wachstum von sekundär lymphatischen Gewebe zu untersuchen wurde ein System gewählt, in dem sowohl das Wachstum während der Ontogenese als auch im adulten Organismus am gleichen Gewebe ohne dauerhafte Manipulation des Organismus analysiert werden kann. Mit der ontogenetisch entstanden Milz und Regeneraten aus Milztransplantationen steht ein solches System zur Verfügung. Die Milz ist das größte sekundär lymphatische Organ und beherbergt ca. 1/5 der gesamten Lymphozyten des Organismus (Cesta 2006). Sie wird von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, von der Trabekel in das Innere des Organs hineinziehen. Die Milz besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Bereichen: [1] Der roten und [2] der weißen Pulpa. Die Anordnung der

unterschiedlichen Bereiche ergibt sich aus dem Aufbau des Blutgefäßsystems (Cerutti 2013, Cesta 2006, Mebius 2005). Die rote Pulpa besteht aus Strängen retikulärer Fasern, die von Fibrozyten umgeben werden und enthalten viele Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Plasmazellen (del Portillo 2012, Steiniger 2011, Mebius 2005). In die Stränge ergießt sich das Blut über ein offenes Gefäßsystem (Steiniger 2011, Mebius 2005). Die murine roten Pulpa hat vier Funktionsbereiche: [1] Blutfilterung (del Portillo 2012, Cesta 2006, Mebius 2005), [2] Eisenrecycling (den Haan 2012, Knutson 2003, Kristiansen 2001), [3] Beteiligung an der angeborene und erworbene Immunabwehr (den Haan 2012, Mebius 2005, Flo 2004) und [4] extramedulläre Hämatopoiese (Cesta 2006). Die weiße Pulpa ist das sekundär lymphatische Gewebe der Milz und wird in drei Kompartimente unterteilt: [1] die T-Zell-Zone (TZZ) im Zentrum, [2] die angrenzenden Follikel und [3] die Marginalzone (MZ), die die Grenze der weißen zur roten Pulpa hin darstellt (Cesta 2006, Mebius 2005, Welsch 2006). Abbildung 2 zeigt den Aufbau der weißen Pulpa am histologischen Präparat. Die Kompartimente der weißen Pulpa bestehen jeweils aus Stromazellen und retikulären Fasern, die nicht nur das Gerüst, sondern auch das richtige Milieu für die jeweiligen Immunzellen über eine kontinuierliche Wechselbeziehung mit diesen bereitstellen (Malhotra 2013, Siegert 2012, El Shikh 2012, Roozendaal 2011, Saito 1988). Die Marginalzone besteht nach außen hin aus Marginalzonen-B-Zellen (MZBZs), dendritischen Zellen (DCs) und Marginalzonenmakrophagen (MZMs) (Hey 2012, Mueller 2009, Mebius 2005). Ihnen schließt sich der Marginalsinus als offener Gefäßabschnitt an (Cerutti 2013). Zur Ausbildung einer Immunantwort gelangt im Blut gelöstes Antigen über den Marginalsinus in die Marginalzone und wird durch die dort stationierten Zellen erkannt und phagozytiert bzw. gebunden (Cerutti 2013, den Haan 2012, Kang 2006, Mebius RE 2005). Die MZBZs als innate-like B-Lymphozyten bilden eine erste Abwehr aus, in dem sie zu extrafollikulär kurzlebige Plasmablasten differenzieren, die IgMs mit niedriger Affinität produzieren (Cerutti 2013, Pone 2012, Batisda 2009, Shapiro-Shelef 2005, Bendelac 2001). Aus der Marginalzone gelangt das Antigen auf drei Wege in die beiden anderen Kompartimente der weißen Pulpa: [1] über das conduit system, ein Rohrsystem der extrazellulären Matrix (Nolte 2003, Bajénoff

2009), [2] über ein shuttling der MZBZ (Cyster 2010, Batista 2009, Cinamon 2008, Cinamon 2004, Ferguson 2004) und [3] Über Einwanderung von DCs aus der MZ in die TZZ (Murphy 2009). In den Follikeln präsentieren FDCs die Antigene als Immunkomplexe naiven B-Zellen und in der TZZ präsentieren DCs dieses den naiven T-Zellen (Rezk 2013, El Shikh 2012, van Nierop 2002). Aktivierte B- und T-Zellen wandern in die B/T-Mischzone am Übergang der Follikel zur TZZ, in der den T-Zellen das Antigen erneut über die B-Zellen präsentiert wird (Tangye 2013, Liu 2013, Pereira 2010, Reif 2002). Gemeinsam wandern B-Zellen mit den assoziierten T-Zellen dann in die Follikel und treten in die Keimzentrumsbildung ein (Shlomchik 2012, Victora 2012, Zotos 2012). In der Keimzentrumsreaktion kommt es zunächst durch eine hohe Proliferationsrate der B-Zellen in einer dunklen Zone mit somatischer Hypermutation der V-Region des BCR-Gens zu B-Zellen, deren veränderter BCR eine veränderte Affinität aufweist (Hwang 2015, Victora 2012, Zotos 2012, Basso 2012, Yoshino 1994). Die B-Zellen konkurrieren dann untereinander um die Interaktion mit FDCs und T-Zellen in einer hellen Zone des Keimzentrums (Chan 2012, Allen 2007). Dabei kommt es zu einer Selektion der B-Zellen, in der die mit gering affinem BCR in die Apoptose eingehen und die mit hoch affinen BCRs erneut in die dunkle Zone zur Proliferation und somatischen Hypermutation gelangen (Victora 2012, Nutt 2011, Batista 2009, Schwickert 2007, Depoil 2005). Über diese Affinitätsreifung entstehen B-Zellen mit sehr hoher Affinität des BCR für das präsentierte Antigen (Victora 2012, Murphy 2009). Zudem kommt es zu einem Ig-Klassenwechsel zur Produktion von unterschiedlichen Ig-Isotypen (Hwang 2015). Die B-Zellen mit sehr hoher Affinität des BCR differenzieren zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen und verlassen die weiße Pulpa (Shlomchik 2012, Nutt 2011, Murphy 2009, Fairfax 2008, Shapiro-Shelef 2005). Während der Keimzentrumsreaktion regulieren FDCs die B-Zell-Homöostase, Lymphozytendifferenzierung und den Abbau apoptotischer Zellen durch die tingible-body Makrophagen und tragen somit maßgeblich zur Keimzentrumsreaktion bei (Rezk 2013, El Shikh 2012, Cyster 2010, Batista 2009, Mueller 2009, Kranich 2008, Allen 2007, van Nierop 2002).

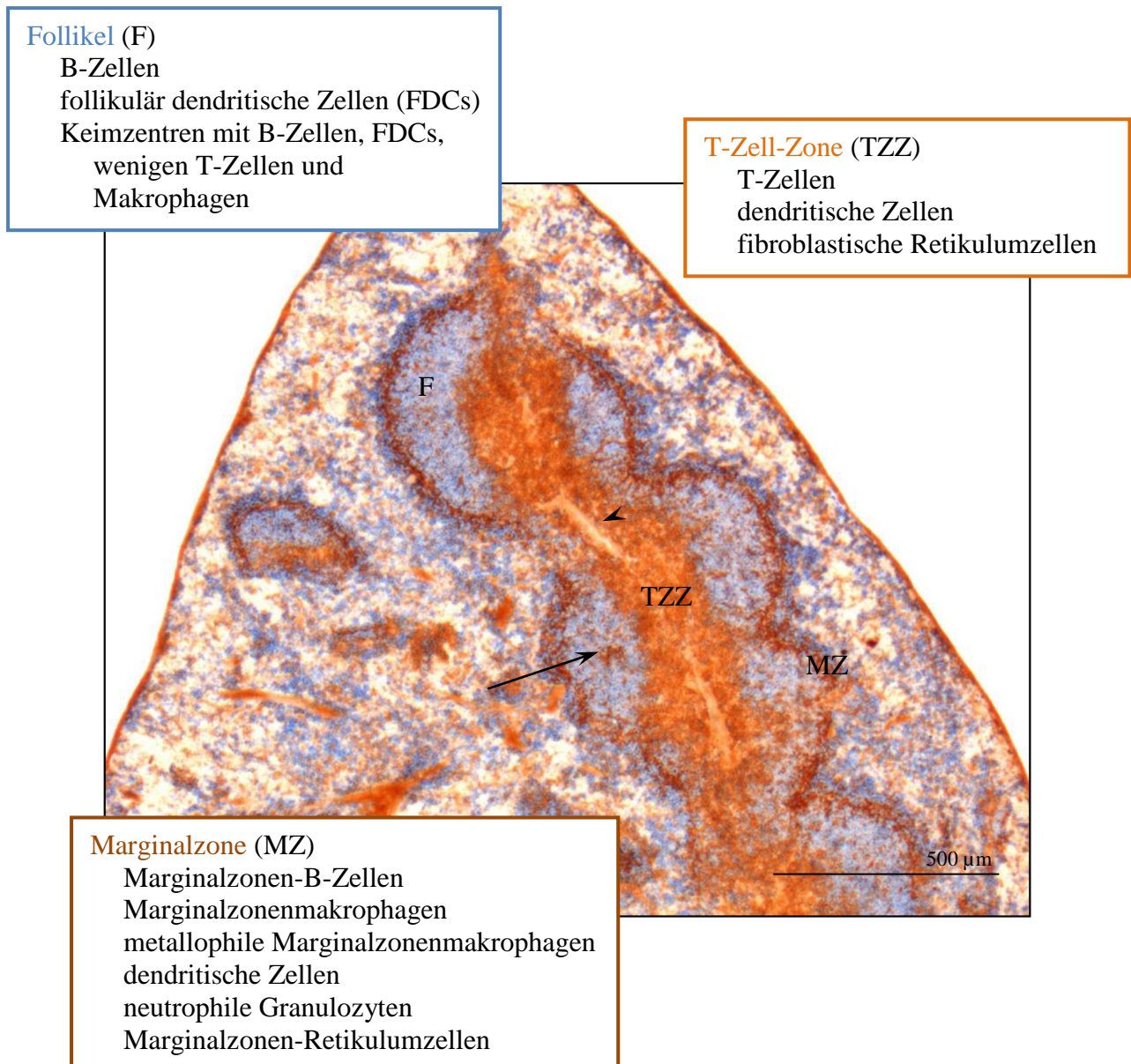


Abb. 2: Histologisches Präparat einer murinen Milz mit Kennzeichnung der Kompartimente und der jeweils vorherrschenden Zelltypen.

Immunhistochemische Darstellung von T-Zellen (TCR- β , orange), B-Zellen (B220, blau), metallophilen Marginalzonenmakrophagen (MOMA-1, braun) und Keimzentren (PNA, orange-braun) in der Milz einer Maus. In den Kästen sind die Zelltypen bzw. Strukturen der jeweiligen Kompartimente der weißen Pulpa aufgelistet. Der Pfeilkopf deutet auf die Zentralarterie und der Pfeil auf ein Keimzentrum.

TZZ = T-Zell-Zone, F = Follikel, MZ = Marginalzone, FDCs = follikulär dendritische Zellen

Um das Wachstum eines Milzregenerates zu induzieren, kann entwickeltes Milzgewebe in einen adulten Empfänger implantiert werden (Nohroudi 2005, Pabst 1991). Im Gegensatz zu Transplantationen anderer Organe, wird bei dieser

Implantation das Transplantat nicht an das Gefäßsystem angeschlossen und somit nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt (Pabst 1991). Nur ein schmaler Randsaum des Transplantates kann per Diffusion von dem umgebenen Empfängergewebe versorgt werden, sodass dort einige Fibroblasten und Stammzellen überleben, während das übrige Transplantatgewebe nekrotisch wird (Nohroudi 2005, Pabst 1991, Dijkstra 1982). Innerhalb der ersten 42 Stunden post transplantationem erhalten Blutgefäße des Empfängers Anschluss an den Bereich unterhalb des vitalen Randsaumes, sodass sich Blut in das Gewebe ergießt und sich ein vaskulärer Raum bildet (Johnson 1989). Innerhalb der ersten Woche wird dieser Raum mit Endothelzellen ausgekleidet, Fibroblasten des Randsaumes proliferieren und produzieren retikuläre Fasern, sodass der Saum zu einer roten Pulpa wächst und sich fingerartig in den vaskulären Raum ausstreckt (Leitner 1994, Pabst 1991, Johnson 1989). Aus jenem Raum ziehen Blutgefäße in das Innere des Transplantates, denen Fibroblasten folgen, um das nekrotische Gewebe innerhalb von 2 Wochen zu ersetzen (Nohroudi 2005, Pabst 1991, Johnson 1989, Dijkstra 1983b). In dieser Zeit sind erste Arterien angelegt (Johnson 1989), die von Lymphozytenansammlungen umgeben werden (Nohroudi 2005, Maesawa 1992, Dijkstra 1983b, Dijkstra 1982). 3 Wochen nach der Implantation sind alle Kompartimente der weißen Pulpa entwickelt (Maesawa 1992, Dijkstra 1983b, Dijkstra 1982). Nach 8 Wochen ist mit der Fähigkeit der weißen Pulpa, Keimzentren zu bilden, der Regenerationsprozess abgeschlossen (Nohroudi 2005, Pabst 1991, Claassen 1989, Johnson 1989). Das Zentrum der Regenerate besteht aus einer Narbe, die je nach Alter des Empfängers unterschiedlich ausgedehnt ist (Westermann 1988b). Da das Wachstum des Regenerates von der Menge des bereits vorhandenen sekundär lymphatischen Gewebes abhängig ist (Nohroudi 2005, Tavassoli 1975), wird der Empfänger vor der Transplantation splenektomiert (Pabst 1991). Funktionell bestehen Unterschiede zwischen Milzregeneraten und ontogenetisch entstandenen Milzen: Zwar findet die Phagozytose von Pathogenen statt (Marques 2003), ist die Clearance des Blutes bei verschiedenen Infektionen möglich (Pabst 1991, Westermann 1988a) und werden Antikörper gegen Thymus abhängiges sowie unabhängiges Antigen produziert (Leemans 1999, Claassen 1989), doch ist das Ausmaß dieser Vorgänge reduziert, sodass schwerere Krankheitsverläufe zu

beobachten sind (Pabst 1991, Westermann 1988a). Trotz dieser Einschränkungen entsteht nach avaskulären Transplantationen funktionsfähiges Milzgewebe unter ansonsten physiologischen Bedingungen im Empfängerorganismus (Nohroudi 2005, Pabst 1991).

Die Fragestellungen dieser Arbeit und Ansätze, um diese zu beantworten sind:

1. *Wie ist MFAP4 in der Milz exprimiert und wo ist es lokalisiert?*

Dafür wurden WT Milzen immunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenz auf MFAP4 und weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix gefärbt.

2. *Beeinflusst MFAP4 die Entwicklung sekundär lymphatischen Gewebes während der Ontogenese und im adulten Organismus?*

Dafür wurden verschiedene Wachstums- und Entwicklungsparameter in WT und MFAP4^{-/-} Milzen sowie Regenerate aus WT→WT und MFAP4^{-/-}→MFAP4^{-/-} (KO→KO) Transplantationen untersucht.

3. *Wo wird MFAP4 für die Milz produziert?*

Dafür wurde MFAP4 in ontogenetischen Milzen und Regeneraten sowohl aus ungekreuzten (WT→WT und KO→KO), als auch gekreuzten (KO→WT und WT→KO) Transplantationen immunhistochemisch dargestellt und die MFAP4 mRNA-Expression gemessen, um Informationen über die Verteilung und den Produktionsort von MFAP4 zu erhalten.

MATERIAL UND METHODEN

Tiere und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden Labormäuse vom C57BL/6 Stamm verwendet, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die MFAP4^{-/-} Tiere wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe der Syddansk Universität (Schlosser *et al.*, unveröffentlichte Daten) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in Gruppen von vier bis sechs Mäusen in Standardkäfigen (42,5 x 26,6 x 15,5 cm) aus durchsichtigem Polycarbonat mit einem Abdeckgitter aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in klimatisierten Räumen der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Trockenfutter (altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser standen den Tieren jeder Zeit zur Verfügung und die Streu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt. Bei einer Luftfeuchtigkeit von 60±5 % betrug die Umgebungstemperatur 23±1 °C. Durch eine Hellphase zwischen 05:00 und 17:00 Uhr wurde ein Tag-Nach-Rhythmus von 12:12 Stunden erzeugt. Die Tiere konnten sich vor Versuchsbeginn 1 Woche akklimatisieren. Eine Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche liegt vor (V252-72241.122-1 (24-3/02)).

Operationen

Alle chirurgischen Eingriffe erfolgten in der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck in gesonderten ebenfalls spezifisch pathogenfreien Räumen und erfolgten unter sauberen aber nicht sterilen Bedingungen. Die Tiere lagen auf sterilen Operationstüchern. Das verwendete Operationsbesteck (Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl) wurde vor jedem Operationstag autoklaviert und zwischen den Eingriffen an verschiedenen Tieren mit 70 %-igem Ethanol (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gereinigt. Injektionen erfolgten mit sterilen Einwegspritzen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Vor und nach der Operation wurden die

Mäuse gewogen. Eine Kurznarkose wurde durch die intraperitoneale Injektion einer Narkoselösung aus Ketaminhydrochlorid (12 mg/ml; Ketanest S, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (1,6 mg/ml; Rompun, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) in steriler 0,9 % NaCl-Lösung in einer Dosierung von 10 ml/kg Körpergewicht eingeleitet. Nach 10 Minuten konnte mit dem Eingriff begonnen werden.

Milztransplantation

Die Tiere wurden mit der Ventralseite nach oben gelagert. Zur Desinfektion wurde der Bauch mit 70 %-igem Ethanol (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingesprüht. Die Bauchhaut wurde mit einer Pinzette angehoben, sodass mit einer Schere ca. 1,5 cm unterhalb des Sternums ein kleiner Einschnitt vorgenommen werden konnte. Die Bauchmuskulatur und das Peritoneum wurden ebenfalls gefasst und eingeschnitten. Die Schnitte wurden anschließend bis zum Processus xiphoideus nach kranial verlängert. An die linke Seite des Einschnittes wurde ein steriler mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung getränkter Tupfer gelegt, auf die der aus der Bauchhöhle gehobene Darmabschnitt abgelegt werden konnte. Dieser wurde während der Operation regelmäßig mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung befeuchtet. Der Magen wurde angehoben, sodass das Ligamentum gastrosplenicum milznah mit einer Schere durchtrennt werden konnte. Die milzversorgenden Gefäße wurden aufgesucht, elektrisch koaguliert und durchtrennt, sodass die Milz entnommen werden konnte.

Die von den Spendertieren entnommenen Milzen wurden gewogen, in Petrischalen mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung abgelegt und jeweils in vier etwa gleich große Fragmente geteilt. Zwei der Fragmente, deren Gewicht ebenfalls bestimmt wurde, wurden dem jeweiligen Empfänger zwischen Ligamentum gastrosplenicum und Magenwand eingeschoben. Einige Tiere erhielten Fragmente der eigenen Milz (Autotransplantation). Nach einer abschließenden Lagekontrolle der Transplantate erfolgte die Reposition von Magen und Darm. Die Bauchhöhle wurde mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung befeuchtet bevor die Bauchmuskulatur und Haut mit

resorbierbarem Nahtmaterial (5-0, Ethicon Vicryl, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) fortlaufend zugenäht wurden. Die Abdeckung der Wunde erfolgte mit einem Sprühpflaster (Leukoplast[®], BSN medical GmbH & Co KG, Hamburg, Deutschland). Die Tiere wurden zurück in den Käfig gelegt und ihr Erwachen abgewartet.

Organentnahme

8 Wochen nach der Transplantation wurden die Versuchstiere in Narkose mit Kohlenstoffdioxid getötet. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Milzregenerate aufgesucht, entnommen und deren Gewicht ermittelt. Teilweise erfolgten zusätzlich eine Teilexcision des Schwanzes und eine Exstirpation des rechten poplitealen Lymphknotens. Die entnommenen Organe und Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff (−196°C) schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei −80°C gelagert.

Färbungen

Die zu färbenden Organe und Gewebe wurden bei −20°C im Einbettmedium (Tissue-Tek[®], Leica Instruments GmbH, Nußloch, Deutschland) fixiert. Mit einem Serienschmittmikrotom (HYRAX C 50, Kryostat, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) erfolgte die Herstellung von 12 µm dicken Gefrierschnitten, die auf Glasobjektträger (Superfrost, Iso-Norm 8037, Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) übertragen, bei Raumtemperatur für 2 h luftgetrocknet und anschließend bei −20°C gelagert wurden. Für jedes Organ wurden 3 Schnitte gefärbt und an einem weiteren Schnitt eine negative Kontrollfärbung durchgeführt. Diese Kontrollschnitte wurden wie die Schnitte zur positiven Färbung behandelt, mit der Ausnahme, dass die Inkubation mit dem Primärantikörper ausblieb. Informationen zu der Zusammensetzung und der Bezugsquelle der verwendeten

Lösungen und eine Auflistung der Antikörper mit weiteren Informationen zum Klon und Isotyp sowie der Bezugsquelle sind am Ende dieses Abschnittes den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

Immunhistochemische Färbungen

Zur Untersuchung der Struktur und der Entwicklung der Milzen und Milzregenerate wurden an verschiedenen Schnitten des jeweils gleichen Organs verschiedene Zellen und Strukturen gefärbt. Verwendet wurde dabei die Avidin-Biotin-Methode. Dabei werden spezifische monoklonale Primärantikörper auf den jeweiligen Schnitt gegeben, die an die zu färbenden Zellen oder Strukturen binden. Nach einer fakultativen Hinzugabe von Sekundärantikörpern und einer obligaten enzymatischen Farbreaktion werden die mit dem Primärantikörper detektierten Zellen und Strukturen sichtbar. Die Antikörper wurden – wenn nicht anders gekennzeichnet – in TBS-Tween angesetzt und die Inkubation mit diesen erfolgte bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtkammer. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte nach jedem Schritt eine Spülung der Präparate für 10 Minuten mit TBS-Tween. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Präparate mit Eindeckmedium (Aquatex[®], Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschichtet.

1. Metallophile Marginalzonenmakrophagen, Makrophagen der roten Pulpa, T-Zellen, Keimzentren

Die Schnitte wurden für 10 Minuten bei – 20°C in einem Bad aus Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1; C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Es folgte die Inkubation mit den biotinylierten Primärantikörpern anti-mouse-MOMA-1 (Verdünnung 1:500; metallophile Marginalzonenmakrophagen), anti-mouse-F4/80 (Verdünnung 1:500; Makrophagen der roten Pulpa), anti-mouse-TCR-β (Verdünnung 1:100; T-Zellen) bzw. dem ebenfalls biotinylierten Lektin PNA (= peanut Agglutinin;

Verdünnung 1:100; Keimzentren) für 1 Stunde. Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation mit 1:100 verdünntem Avidin-Peroxidase-Komplex (ExtrAvidin®-Peroxidase, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) erfolgte die Färbung mit der Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 5 Minuten.

2. *B-Zellen, FDCs*

Die Fixierung der Schnitte erfolgte ebenfalls für 10 Minuten in Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1; C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Eine Inkubation mit den Primärantikörpern anti-mouse-CD45R/B220 (Verdünnung 1:100 im Puffer für anti-mouse-CD45R/B220; B-Zellen) und anti-mouse-FDC-M1 (Verdünnung 1:100; FDCs) folgte für 1 Stunde. Anschließend wurden die Schnitte mit einem biotinylierten polyklonale Kaninchen-anti-Ratte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500, Caltag Laboratories, Burlingame, USA) für 30 Minuten inkubiert. Nach einer weiteren 30 minütigen Inkubation mit dem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Verdünnung 1:100; ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) erfolgte die Farbreaktion für 25 Minuten mit Fast Blue (Fast Blue BB Salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

3. *MFAP4*

Auch hier wurde die Fixierung der Schnitte in einem Bad aus Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Die Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Primärantikörper Hyb7-14 (Verdünnung 1:200; MFAP4) erfolgte für 1 Stunde. Anschließend wurde der biotinylierte anti-FITC Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000) für 30 Minuten hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit dem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Verdünnung 1:100; ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Steinheim, Deutschland) erfolgte die Farbreaktion für 25 Minuten mit Fast Blue (Fast Blue BB Salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

4. Doppelfärbung: proliferierende Zellen und B-Zellen

In einer weiteren immunhistochemischen Färbung wurden B- und proliferierende Zellen zusammen an jeweils dem gleichen Schnitt dargestellt. Im Gegensatz zu den anderen Färbungen erfolgte die Fixierung der Präparate bei Raumtemperatur in Chlorophorm und anschließend ohne zwischenzeitiges Spülen in Aceton (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für jeweils 10 Minuten. Nach einer Spülung mit TBS-Tween wurden sie mit Paraformaldehyd (4% PFA in PBS) für 45 Minuten inkubiert. Die Färbung der proliferierenden Zellen wurde durch die Inkubation mit dem anti-mouse-Ki-67 (Verdünnung 1:100 im Puffer für anti-mouse-Ki-67) über Nacht angeschlossen. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit den biotinylierten polyklonalen Kaninchen-anti-Ratte Sekundärantikörpern (Verdünnung 1:500 in TBS-Tween mit 5% Mausserum, Caltag Laboratories, Burlingame, USA) und einer anschließenden ebenfalls 30 minütigen Inkubation mit dem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Verdünnung 1:100; ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) erfolgte die Farbgebung mit der Zugabe von Fast Red (Fast Red TR, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) für 25 Minuten. Die Färbung der B-Zellen erfolgte im Anschluss in gleicher Weise, wie in der Einzelfärbung der B-Zellen mit dem Primärantikörper gegen CD45R/B220 beschrieben.

Immunfluoreszenzfärbungen

Mit der Immunfluoreszenz wurden in Doppelfärbungen MFAP4 und das ER-TR7 Antigen beziehungsweise Laminin und Podoplanin zusammen dargestellt. Während

der Hyb 7-14 Antikörper gegen MFAP4 mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war, wurde zur Darstellung der Antikörper gegen das ER-TR7 Antigen und Laminin ein konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Präparate mit Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen (Mowiol® 4-88, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) beschichtet.

Die Schnitte wurden in einem Bad aus Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1; C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Es folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern Hyb 7-14 (Verdünnung 1:200; MFAP4) und ER-TR7 (Verdünnung 1:500; ER-TR7 Antigen) beziehungsweise anti-Laminin (Verdünnung 1:100; Laminin) und anti-PDPN (Verdünnung 1:400; Podoplanin) für 1 Stunde. Anschließend wurde das Präparat lichtgeschützt gespült. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper gegen den ER-TR7 Antikörper (Verdünnung 1:3000) beziehungsweise den anti-Laminin (Verdünnung 1:500) und anti-PDPN Antikörper (Verdünnung 1:200) schloss sich für 1 Stunde an, bevor die Schnitte erneut lichtgeschützt gespült wurden.

Tabelle 1: Auflistung der in der Immunhistochemie verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (w/v) in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	2,5 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 140 mM NaCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; in Aqua bidest.; pH 7,25	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Puffer für anti-mouse-Ki-67 und anti-mouse-CD45R/B220	1 % BSA; 0,1 % NaN ₃ ; in PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TBS-Tween	0,05 M TRIS; 0,05% Tween®20; 0,8 % NaCl in Aqua bidest.; pH 7,6	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2: Auflistung der in den Färbungen verwendeten Antikörper

Antikörper	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
anti-FITC	Biotin	B13-DE1	Maus IgG1	L. Karawajew, Berlin, Deutschland
anti-goat	Alexa Fluor® 647	polyklonal	Esel IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA
anti-Laminin	keines	Ig-Fraktion von Antiserum aus Kaninchen		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
anti-mouse-CD45R/B220	keines	RA3-6B2	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-mouse-F4/80	Biotin	CI:A3-1	Ratte IgG2b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-mouse-FDC-M1	keines	FDC-M1	Ratte IgG2c	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-mouse-Ki-67	keines	TEC-3	Ratte IgG2a	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
anti-mouse-MOMA-1	Biotin	MOMA-1	Ratte IgG2a	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland
anti-mouse-PDPN	keines	polyklonal	Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-mouse-TCR-β	Biotin	H57-597	Hamster IgG2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-rabbit-immunglobulins	Alexa Fluor® 555	Ig-Fraktion von Antiserum aus Affen		Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
anti-rat-immunglobulins	Biotin	Ig-Fraktion von Antiserum aus Kaninchen		DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
anti-rat-immunglobulins	549 DyLight™	Ig-Fraktion von Antiserum aus Affen		Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA
ER-TR7	keines	ER-TR7	Ratte IgG2a	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland
Hyb7-14	FITC	HG-Hyb 7-14	Maus	G. L. Sørensen, Syddansk Universitet, Odense, Dänemark

Auswertung der gefärbten Milzschnitte

Die qualitative und semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte am Lichtmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Für die quantitative Analyse wurden alle drei Schnitte eines Organs für jede Färbung ausgewertet und der Mittelwert für jedes Organ

berechnet. alle Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop photographiert (Axiovert 4.2 Software, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und die Vermessung erfolgte mit dem Programm Image J (Version 1.45 für Windows XP; <http://www.pcwelt.de/downloads/ImageJ-1325332.html>, Stand: 07.01.2012). Dabei wurde zunächst die gesamte Fläche (ges. Fl.) jedes Milzschnittes vermessen und die Werte später für die Berechnung des prozentualen Anteils der Fläche der jeweiligen Kompartimente an dem gesamten Milzschnitt herangezogen. Für die Auswertung der roten (RP) und weißen Pulpa (WP) wurde die anti-F4/80-Färbung verwendet. Dabei wurde die Fläche der nicht gefärbten Areale, die der weißen Pulpa entsprach, vermessen. Die Berechnung erfolgte nach folgenden Formeln:

$$RP (mm^2) = ges. Fl. (mm^2) - Fl. WP (mm^2)$$

$$WP (\%) = 100\% - RP (\%)$$

Die Vermessung der T-Zell-Zone (TZZ) erfolgte an den mit anti-TCR- β gefärbten Schnitten.

Die B-Zell-Zone besteht aus zwei Bereichen: [1] den Follikeln und [2] den Marginalzonen B-Zellen (MZBZ) (Cesta 2006). An der anti-CD45R/B220-Färbung können diese beiden Bereiche optisch unterschieden werden. Die Marginalzone wurde hier als Summe der Fläche, in der MZBZ vorkommen, und der Fläche, die die metallophilen Marginalzonenmakrophagen (MMM) einnehmen, definiert. Daher erfolgte die Auswertung der anti-CD45R/B220-Färbung, indem die Fläche der gesamten BZZ und zusätzlich die Fläche der Follikel vermessen wurden. Die Fläche der MZBZ wurde sodann wie folgt berechnet:

$$MZBZ (mm^2) = BZZ (mm^2) - Follikel (mm^2)$$

In der Färbung mit dem Primärantikörper anti-MOMA-1 wurde die Fläche ausgemessen, die von den MMMs eingenommen wurde, sodass der prozentuale Anteil der Marginalzone (MZ) an der gesamten Schnittfläche folgendermaßen berechnet werden konnte:

$$MZ (\%) = MZBZ (\%) + MMM (\%)$$

Für die Untersuchung des FDC-Netzwerkes wurden in den mit anti-FDC-M1 gefärbten Schnitten zum Einen die Fläche, die dieses Netzwerk einnahm, ausgemessen und zum Anderen die Anzahl der FDCs bestimmt. Mit beiden Werten konnte die Dichte der FDCs als Anzahl der FDCs pro 0,5 mm² des Netzwerkes berechnet werden.

Anhand der PNA Färbungen wurden die Fläche, die die Keimzentren einnahmen, und ihre Anzahl pro Milzschnitt bestimmt.

In den doppelt gefärbten Schnitten mit Antikörpern gegen CD45R/B220 und Ki-67 wurden die BZZ und die TZZ getrennt bezüglich der Zellproliferation betrachtet. Pro Schnitt wurden jeweils zwei Areale in der BZZ und der TZZ umfahren, ihre Fläche bestimmt und die in ihr vorkommenden proliferierenden Zellen gezählt, sodass die Dichte der proliferierenden Zellen als Anzahl pro 0,5 mm² in beiden Zonen berechnet werden konnte. In der TZZ war eine Unterscheidung von proliferierenden B- und T-Zellen anhand der Doppelfärbung möglich, sodass hier nur die proliferierenden T-Zellen gezählt wurden. In der BZZ war diese Unterscheidung nicht möglich, sodass hier alle proliferierenden Zellen mitgezählt und als proliferierende B-Zellen bezeichnet wurden. In zwei Regeneraten aus WT→KO Transplantationen war die Fläche, in der proliferierende T-Zellen gezählt werden konnten, zu klein, sodass die ausgezählten Flächen beider Regenerate zusammengelegt und somit beide als ein Regenerat behandelt wurden.

Die mit der Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurden unterm Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Die Aufnahmen wurden mit CellSens[®] (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) erstellt. Für die Aufnahmen der Positivfärbungen von

MFAP4 musste die Belichtungszeit am Mikroskop im Vergleich zu den Negativkontrollfärbungen herunter reguliert werden, da das Präparat sonst überbelichtet gewesen wäre. Bei den Doppelfärbungen wurden die Färbungen einzeln abphotographiert und mit Adobe® Photoshop® CS3 Extended (Version 10.0.1, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) in verschiedenen Farbkanälen übereinandergelegt. Dabei musste der Kontrast und die Helligkeit des Originalbildes angepasst werden, um eine gemeinsame Darstellung zu ermöglichen.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Von jedem Organ wurden fünf 12 µm dicke Schnitte mit dem Serienschnittmikrotom (HYRAX C 50, Kryostat, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) hergestellt, aus denen RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben wurde. Bei der Durchführung dieser Methoden wurden Arbeitsflächen mit 1%-iger SDS-Lösung (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gereinigt, um möglichst RNase-freie Bedingungen zu schaffen. Mit der quantitativen Real-Time (RT)-PCR wurde dann die relative Genexpression von MFAP4 quantifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der Tabelle 3 am Ende dieses Abschnittes zu entnehmen.

RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur RNA-Isolation wurde das innuPREP RNA Mini Kit (Analytika Jena AG, Jena, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden mit 700 µl Lysepuffer lysiert, 1 Minute gevortext und kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Durch zehnmaliges Aufziehen mit feinen Kanülen (26 G Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden Nukleinsäuren von anderen Zellbestandteilen gelöst. Es wurden 700 µl 70 %-iges Ethanol (C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zu den Proben gegeben und diese durch zehnmaliges Aufziehen mit Pipettenspitzen gemischt. 700 µl jeder

Probe wurde in eine Spin Filter R Säule mit Receiver-Tube überführt und 2 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Die restlichen 700 µl jeder Probe wurden dann ebenfalls in die Säule pipettiert und diese erneut für 2 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Receiver-Tube gewechselt. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl Washing solution HS beziehungsweise 700 µl Washing solution LS für je 1 Minute bei einer Zentrifugation mit 12.000 rpm. Das Filtrat und Receiver-Tube wurden nach beiden Waschschrten verworfen beziehungsweise gewechselt. Durch erneute Zentrifugation mit 12.000 rpm für 2 Minuten wurde der Säuleninhalt getrocknet. Die RNA im Filter wurde mit 60 µl RNase-freiem Wasser (Analytika Jena AG, Jena, Deutschland) unter Zentrifugation (1 Minute bei 8.000 rpm) eluiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und die gelöste RNA in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 60 °C über 20 Minuten auf 8 µl eingedampft.

Für die cDNA-Synthese wurde ein cDNA-Synthese Kit (#EP 0452, Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet. Mit der Zugabe von 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I-Enzym (1 U/µl) wurde restliche genomische DNA bei 20 °C verdaut. Der Prozess wurde nach 15 Minuten mit der Zugabe von 1,5 µl EDTA-Stopplösung (Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland) beendet (10 Minuten bei 70 °C). Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert. Die RNA wurde mit der Zugabe von 8,5 µl Reverse Transkriptase Mastermix (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und weiteren 50 Minuten bei 42 °C in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde das Enzym durch 15-minütiges Erhitzen der Proben auf 70 °C inaktiviert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Quantitative real-time RT-PCR

Es wurde das ABI Prism[®] 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Je Probe wurden 0,625 µl cDNA, 2 µl Primer (jeweils forward und reverse), 10 µl 2x Mastermix und 7,4 µl destilliertes Wasser

angesetzt. Das PCR-Programm begann mit einer ersten Denaturierung (6 Minuten bei 95 °C). Im Anschluss folgten 50 Zyklen Amplifizierung der spezifischen Sequenzen (45 Sekunden bei 95 °C, 1 Minute bei 60 °C). Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit der SDS 2.2.1 RQ Software (RQ Software Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), mit der der ct-Wert (cycle of threshold) bestimmt wurde. Die relative Genexpression von MFAP4 wurde berechnet, indem die Kopienzahl von MFAP4 pro Kopie des Housekeeping Gens MLN51 mit folgender Formel berechnet wurde:

$$2^{(ct\ MLN51 - ct\ MFAP4)}$$

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde das entstandene PCR-Produkt auf ein Agarosegel (2 % Agarose, 50 ml 1x TAE-Puffer, 3 µl Ethidiumbromid zur Anfärbung von dsDNA; Probe versetzt mit 6x Gelladepuffer) aufgetragen.

Tabelle 3: Auflistung der in der PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz
MLN51 forward	5' CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG
MLN51 reverse	5' TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG
MFAP4 forward	5' TATCTACGCCAGGGCTATC
MFAP4 reverse	5' CAAAGCCCAGCTTGTAGTCG

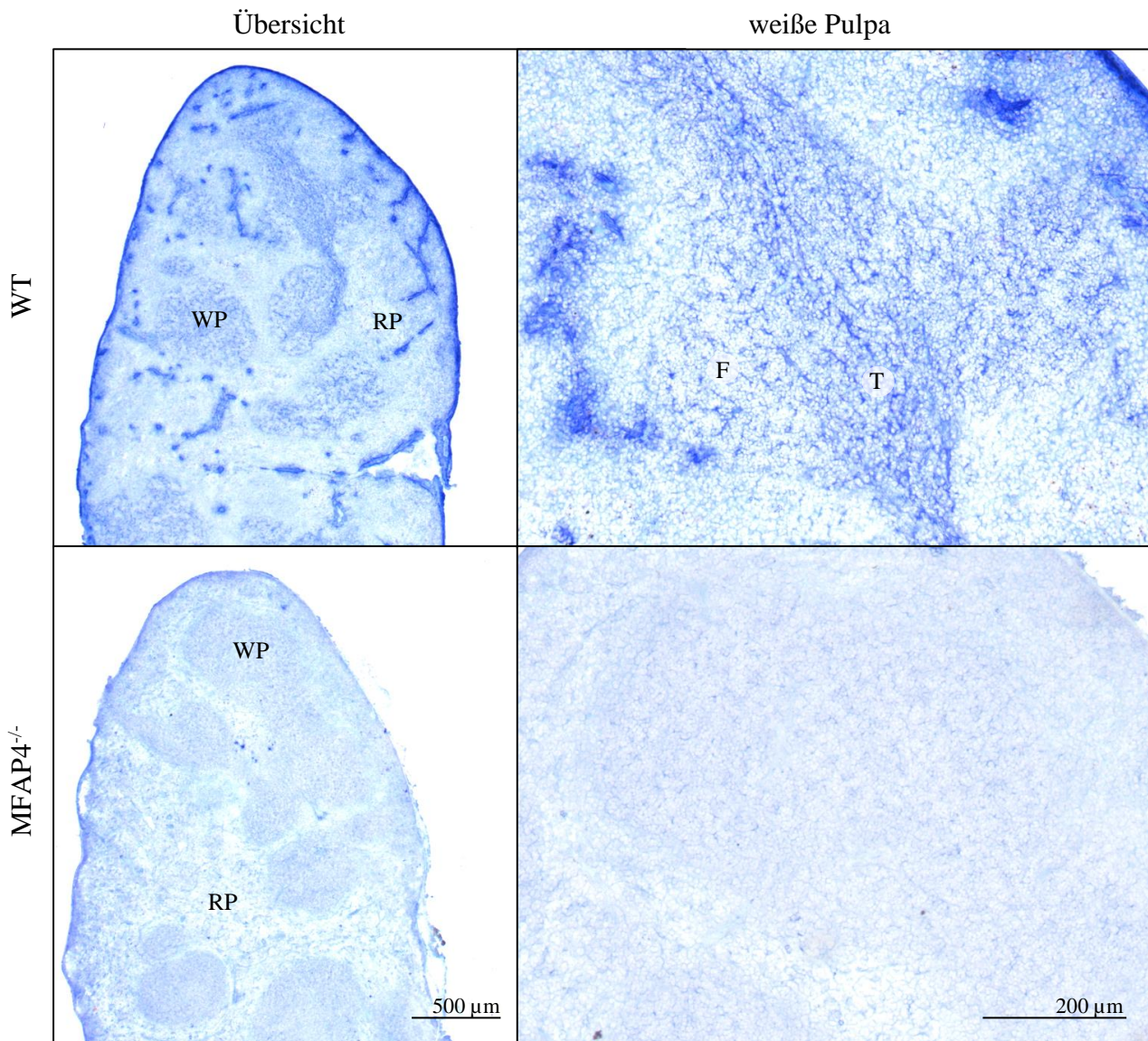
Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) Für die Daten wurden jeweils der Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Der statistische Vergleich von zwei nicht-zusammenhängenden Stichproben erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test. Die Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt.

ERGEBNISSE

MFAP4 co-lokalisiert mit Laminin in den Follikeln und der TZZ

Bevor der Einfluss von MFAP4 auf das Wachstum der Milz untersucht wurde, erfolgte die immunhistochemische Darstellung dieses Proteins, um seine Lokalisation innerhalb der einzelnen Kompartimente zu bestimmen, da diese in der Milz nur ansatzweise (Toyoshima 1999) bekannt ist. Die gefärbten MFAP4^{-/-} Milzen unterschieden sich kaum von den Kontrollfärbungen ohne primären Antikörper. In den WT Milzen herrschte folgendes Verteilungsmuster (Abb. 3): MFAP4 war stark in der Kapsel und der Wand von Trabekelgefäßen sowie Zentralarterie präsent und imponierte hier in Form von dicht und parallel gelagerten, längs zu den Gefäßlumina verlaufenden Fasern. Von beiden Strukturen zogen Stränge von MFAP4 in die rote Pulpa hinein und rarefizierten sich dabei so, dass dort vereinzelt dünne und locker verteilte Fasern vorhanden waren. Dadurch war eine deutliche Abgrenzung der weißen Pulpa möglich, in der wiederum anhand des Verteilungsmusters und der Dichte von MFAP4 die TZZ und die Follikel unterschieden werden konnten. In der TZZ war MFAP4 in näherungsweise parallel verlaufenden kräftigen Strängen angeordnet, die die gesamte TZZ durchzogen und entlang der Zentralarterie verliefen. In den Follikeln waren diese Stränge dünner und kürzer sowie bei aufgehobener Parallelität lockerer verteilt. Die Marginalzone war nicht von der roten Pulpa abzugrenzen. In der semiquantitativen Auswertung wurde die unterschiedliche Verteilung und Dichte von MFAP4 zwischen den Kompartimenten weiterführend erfasst (Abb. 3).



	WT	MFAP4 ^{-/-}
Kapsel	+++++	-
Trabekelgefäße	+++++	-
Rote Pulpa	+	-
Marginalzone	+	-
Follikel	+++	-
TZZ	+++	-

Abb. 3: MFAP4 wird stark in WT Milzen in der Kapsel, den Trabekelgefäßen sowie den Follikeln und der T-Zell-Zone exprimiert, während es in MFAP4^{-/-} Milzen nicht exprimiert wird.

Färbung von MFAP4 (Hyb 7-14) in ontogenetisch entstandenen WT und MFAP4^{-/-} Milzen in einer Übersichtsaufnahme und einer vergrößerten Aufnahme der weißen Pulpa.

F = Follikel, RP = rote Pulpa, T = T-Zell-Zone, WP = weiße Pulpa

Zur Beurteilung der Lagebeziehung von MFAP4 zu anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix erfolgten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von MFAP4 mit ER-TR7 und Laminin. Die Fluoreszenzfärbung von MFAP4 zeigte das aus der Immunhistochemie bekannte Verteilungsmuster von MFAP4 (Abb. 4).

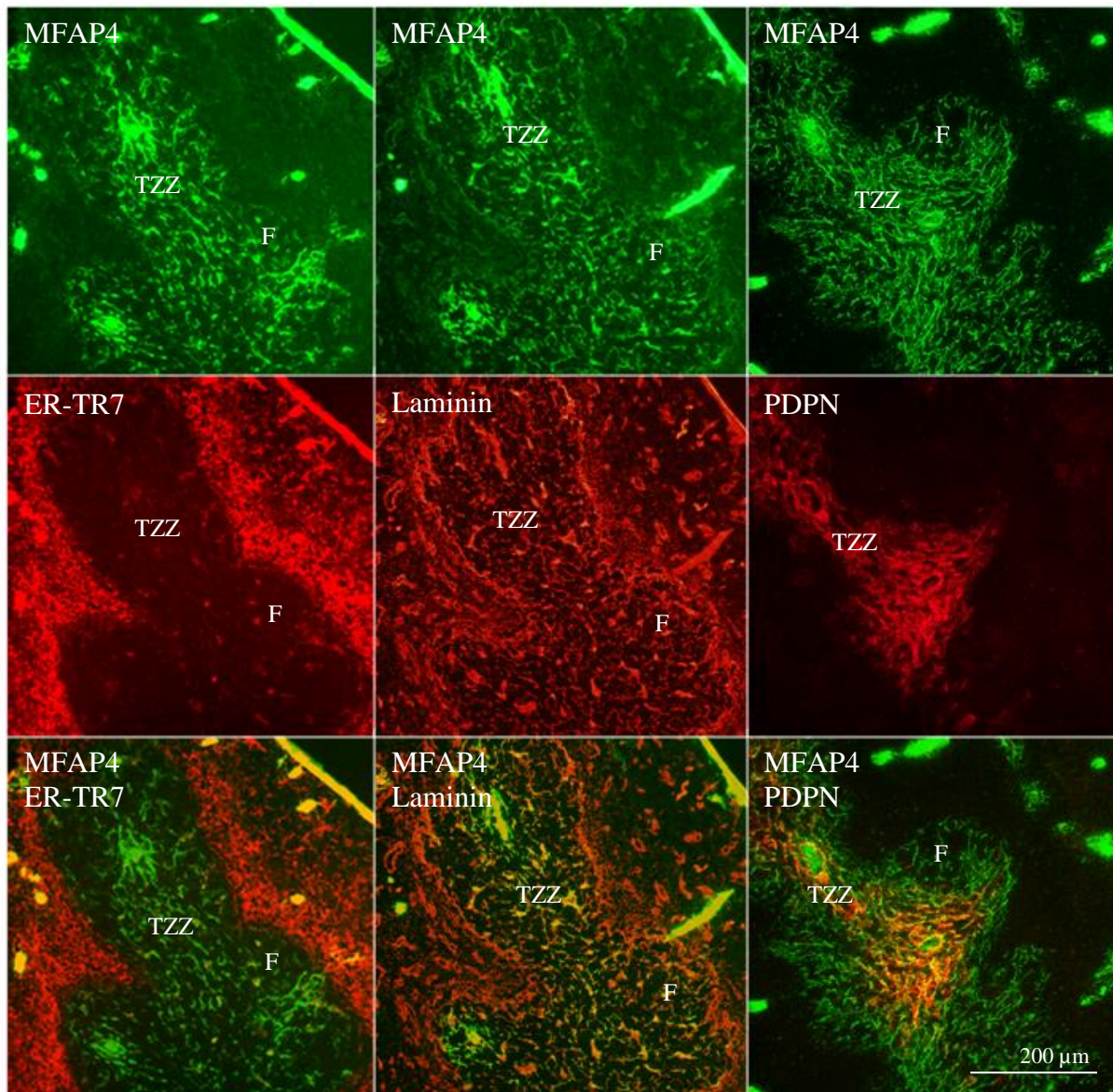
Das ER-TR7 Antigen stellte sich wie MFAP4 stark in der Kapsel, der Wand der Trabekelgefäße und der Wand der Zentralarterie dar. Eine Co-Lokalisation dieser beiden Proteine bestand in diesen Strukturen. In der roten Pulpa imponierte es, anders als MFAP4, als dichtes retikuläres Netzwerk. Innerhalb der weißen Pulpa zeigte sich zwar eine ähnliche Verteilung der MFAP4 positiven Fasern in der TZZ, eine Co-Lokalisation von ER-TR7 und MFAP4 besteht jedoch nicht (Abb. 4 und 5). Anders, als in der MFAP4 Färbung kamen in den Follikeln kaum ER-TR7 positive Strukturen zur Darstellung und die Marginalzone wurde von einem dichten Netz ER-TR7 positiver Fasern durchzogen (Abb. 4).

In der Lamininfärbung fiel ebenfalls eine starke Anfärbung der Kapsel und der Wand der Trabekelgefäße auf (Abb. 4). Hier zeigte sich ebenfalls eine Co-Lokalisation mit MFAP4. Ähnlich wie das ER-TR7 Antigen wurde die rote Pulpa durch ein dichtes Laminin positives retikuläres Netzwerk durchzogen, wobei zusätzlich kleinere Gefäße als voluminösere Strukturen vom retikulären Netzwerk abgegrenzt werden konnten (Abb. 4). In der TZZ zeigte sich das aus der MFAP4 Färbungen bekannte Fasersystem, das sich auch hier in die Follikel fortsetzte. Sowohl in der TZZ, als auch in den Follikeln besteht eine Co-Lokalisation von Laminin und MFAP4 (Abb. 4 und 5). Auch in der Lamininfärbung kam die Marginalzone durch ein grobes Netzwerk aus Laminin positiven Strukturen zur Darstellung (Abb. 4).

Eine semiquantitative Auswertung ergänzte die qualitativen Befunde der einzelnen Färbungen und verdeutlicht die Verteilung und Dichte der gefärbten Strukturen (Abb. 4).

In Zusammenschau der Befunde besteht eine Co-Lokalisation von MFAP4 mit ER-TR7 und Laminin sowohl in der Kapsel, als auch in den Gefäßwänden. Innerhalb der TZZ und den Follikeln besteht eine Co-Lokalisation mit Laminin.

Weiterführend erfolgte eine simultane Darstellung von MFAP4 und Podoplanin, einem Marker für fibroblastische Retikulumzellen (FRCs). Dabei zeigte sich eine Co-Lokalisation von MFAP4 in der Kapsel und der TZZ. Follikel, Marginalzone und rote Pulpa sowie die Gefäßwände kamen kaum bzw. nicht zur Darstellung (Abb. 4).



	MFAP4	ER-TR7	Laminin	Podoplanin
Kapsel	+++++	+++++	+++++	+++++
Trabekelgefäße	+++++	+++++	+++++	+
Rote Pulpa	+	++++	+++	+
Marginalzone	+	+++++	++++	-
Follikel	+++	-	+++	-
TZZ	+++	++	+++	++++

Abb. 4: MFAP4 ist in den Follikeln mit Laminin und in der TZZ mit Laminin und Podoplanin co-lokalisiert.

Immunfluoreszenzfärbung von MFAP4 (Hyb 7-14, grün) mit dem ER-TR7 Antigen (ER-TR7, rot) beziehungsweise Laminin (anti-Laminin, rot) und Podoplanin (PDPN, anti-Podoplanin, rot).

F = Follikel, TZZ = T-Zell-Zone

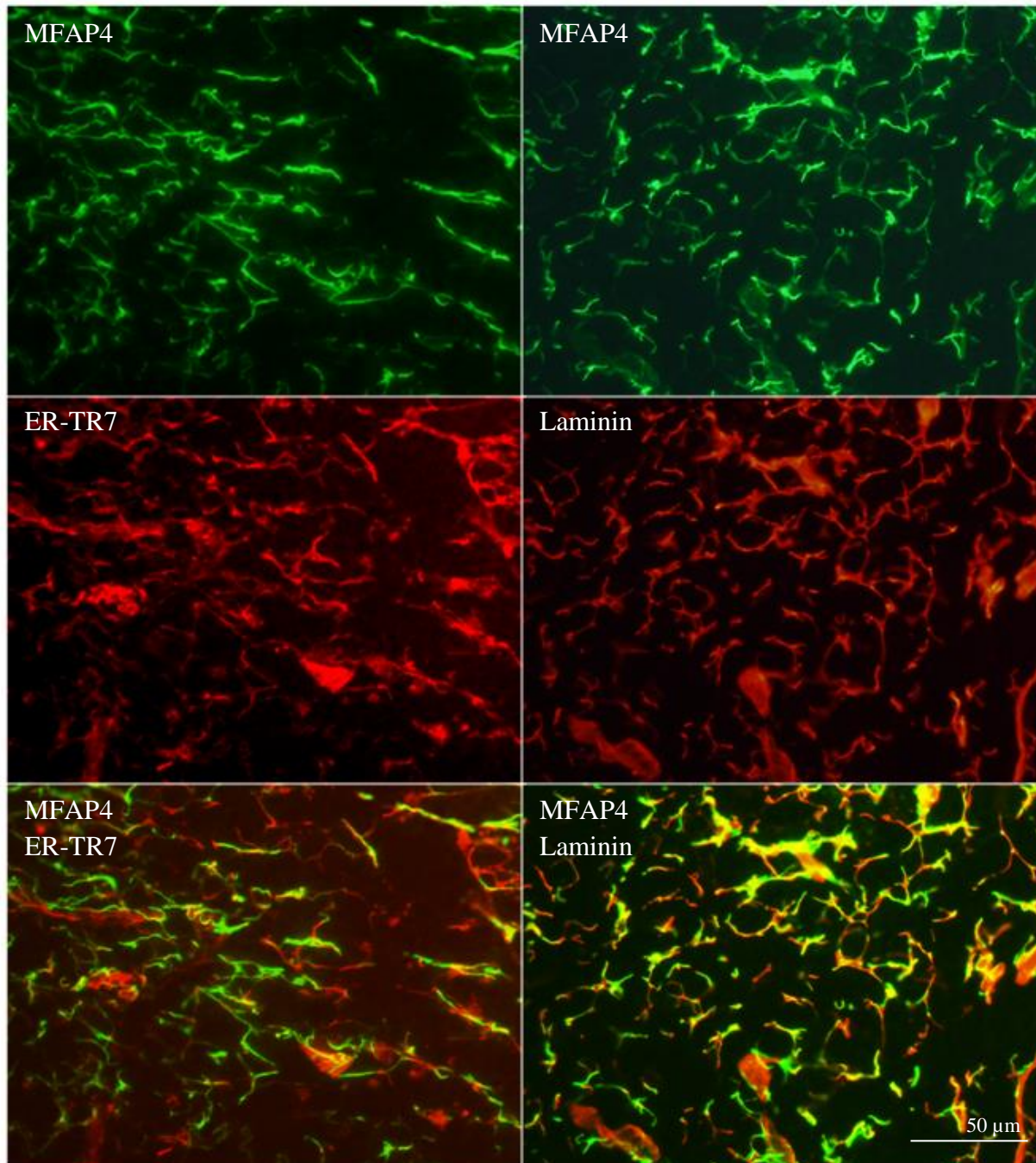


Abb. 5: MFAP4 ist in der TZZ mit Laminin, nicht aber ER-TR7 co-lokalisiert.

Immunfluoreszenzfärbung von MFAP4 (Hyb 7-14, grün) mit dem ER-TR7 Antigen (ER-TR7, rot) beziehungsweise Laminin (anti-Laminin, rot) und Podoplanin (PDPN, anti-Podoplanin, rot). Vergrößerte Aufnahme der TZZ.

Das Fehlen von MFAP4 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Milz während der Ontogenese

Um den Einfluss von MFAP4 auf das Wachstum und die Entwicklung der Milz während der Ontogenese zu beurteilen, wurden das Gewicht von WT und MFAP4^{-/-} Milzen bestimmt. Serienschnitte dieser Organe wurden immunhistochemisch zur Darstellung der einzelnen Kompartimente gefärbt und qualitativ sowie morphometrisch analysiert.

Nach der Organentnahme war bei der makroskopischen Betrachtung kein Unterschied zwischen WT und MFAP4^{-/-} Milzen erkennbar. Auch im Hinblick auf das Gewicht stellte sich kein Unterschied zwischen den WT und MFAP4^{-/-} Milzen heraus (Abb. 6).

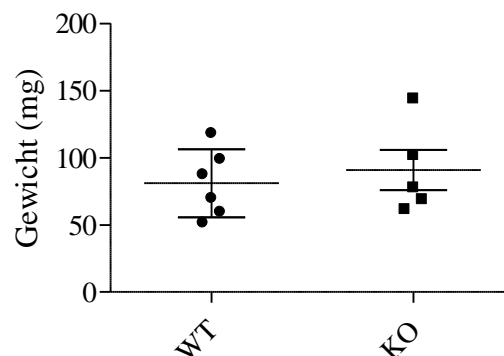


Abb. 6: WT und MFAP4^{-/-} (KO) Milzen unterscheiden sich im Gewicht nicht.

Quantitative Darstellung des Gewichtes der ontogenetisch entstandenen Milzen von WT und MFAP4^{-/-} (KO) Mäusen (Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung, WT n=6, MFAP4^{-/-} n=5)

In der Analyse der histologischen Struktur wurde zunächst die Anlage und Ausdehnung der roten und weißen Pulpa anhand der Färbung der Makrophagen der roten Pulpa bestimmt. In den WT Milzen kam die weiße Pulpa deutlich als Summe mehrerer ungefärbter Areale zur Darstellung, die, ohne Kontakt zur Kapsel zu haben, über den gesamten Milzschnitt verteilt angeordnet waren. Diese Anordnung fand sich

unverändert ebenfalls in den gefärbten Schnitten der MFAP4^{-/-} Milzen. Auch in der morphometrischen Analyse stellte sich kein Unterschied in der Ausdehnung der beiden Kompartimente zwischen den beiden Tiergruppen heraus (Abb. 7).

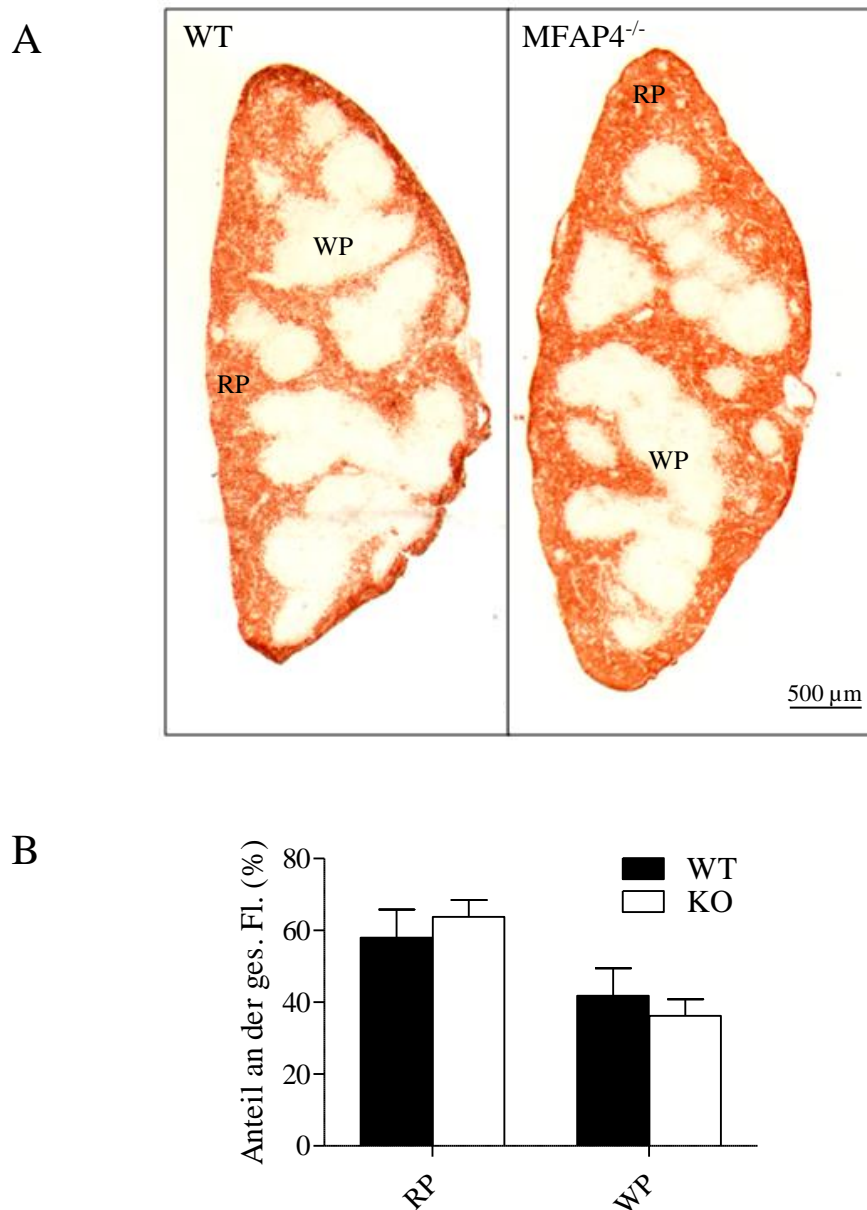


Abb. 7: MFAP4 beeinflusst die Anlage und Ausdehnung der roten und weißen Pulpa nicht.

A Immunhistochemische Darstellung der Makrophagen der roten Pulpa (F4/80) einer WT und MFAP4^{-/-} Milz. *B* quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der roten und weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)
 RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa

Durch die Färbung von MOMA-1⁺ Marginalzonenmakrophagen sowie von B- und T-Zellen an unterschiedlichen Schnitten desselben Organs konnten die unterschiedlichen Zonen und Kompartimente der weißen Pulpa untersucht werden. Die Schnitte der WT Milzen wurden girlandenförmig und Areale begrenzend, die der weißen Pulpa entsprachen, von MOMA-1⁺ Marginalzonenmakrophagen durchzogen. Die gefärbten B-Zellen waren dicht zu einer B-Zell-Zone (BZZ) zusammengelagert und nahmen die Peripherie der weißen Pulpa ein. Follikel konnten hier als Gebiete dichter B-Zell-Ansammlungen von einem Saum noch dichter gelagerter Marginalzonen-B-Zellen an der Grenze zur roten Pulpa unterschieden werden. Im Zentrum der weißen Pulpa stellte sich die TZZ als eine Ansammlung dicht gelagerter T-Zellen dar. Alle drei Kompartimente – Marginalzone, Follikel und TZZ – waren somit vorhanden und abgrenzbar und nahmen in der quantitativen Analyse mit jeweils ca. 15 % einen ähnlichen Flächenanteil an der gesamten Schnittfläche ein (Abb. 8).

Die Anordnung und Ausdehnung der Kompartimente der weißen Pulpa fanden sich in gleicher Weise sowohl qualitativ, als auch quantitativ in den MFAP4^{-/-} Milzen wieder (Abb. 8).

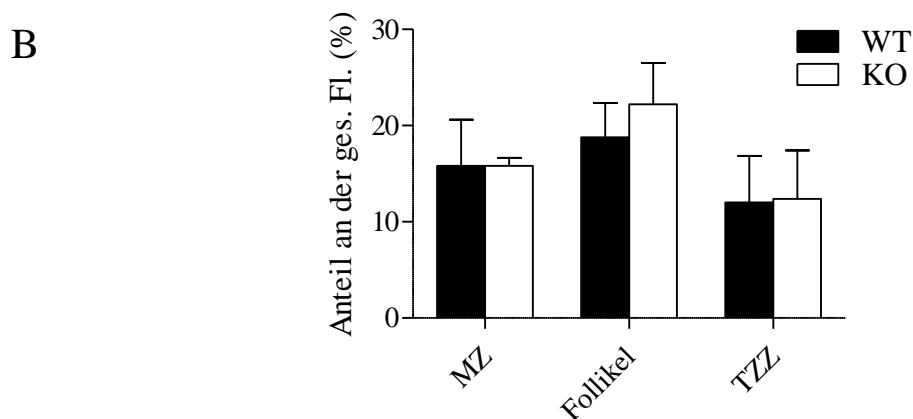
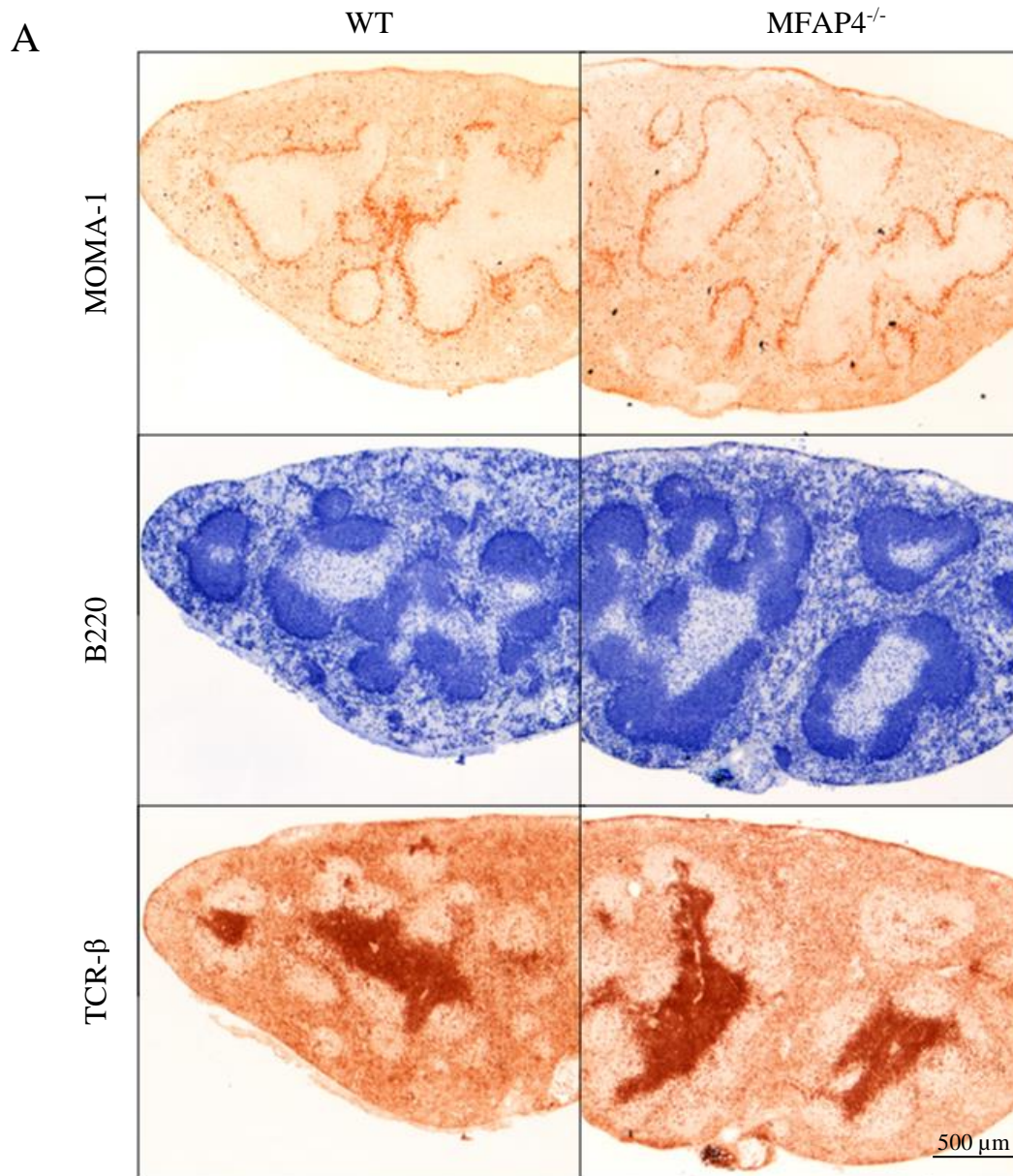


Abb. 8: MFAP4 beeinflusst die Anlage und Ausdehnung der einzelnen Kompartimente der weißen Pulpa nicht.

A Immunhistochemische Darstellung von metallophilen Marginalzonenmakrophagen (MOMA-1), B-Zellen (B220) und T-Zellen (TCR-β) einer WT und MFAP4^{-/-} Milz. **B** Quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der Kompartimente der weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

MZ = Marginalzone, TZZ = T-Zell-Zone

Mit dem Anfärben von Keimzentren, die Ausdruck des Funktionierens und Vorhandenseins komplexer Mechanismen und zellulärer Interaktionen einer ablaufenden Immunantwort sind, sollte überprüft werden, ob die weiße Pulpa mit der regulären Anlage und Ausdehnung ihrer Kompartimente auch eine reguläre Funktion aufweist. Vertiefend wurden dazu die Proliferationsrate der Lymphozyten und die Ausprägung des FDC-Netzwerkes untersucht.

Die Keimzentren waren sowohl in den WT, als auch den MFAP4^{-/-} Milzen vorhanden. Allerdings fiel in den WT Milzen eine nicht signifikant höhere mittlere Anzahl an Keimzentren pro Milzschnitt auf, als in den MFAP4^{-/-} Milzen. Dieser Unterschied fand sich im Blick auf den Flächenanteil, den die Keimzentren an der gesamten Schnittfläche einnahmen wieder (Abb. 9).

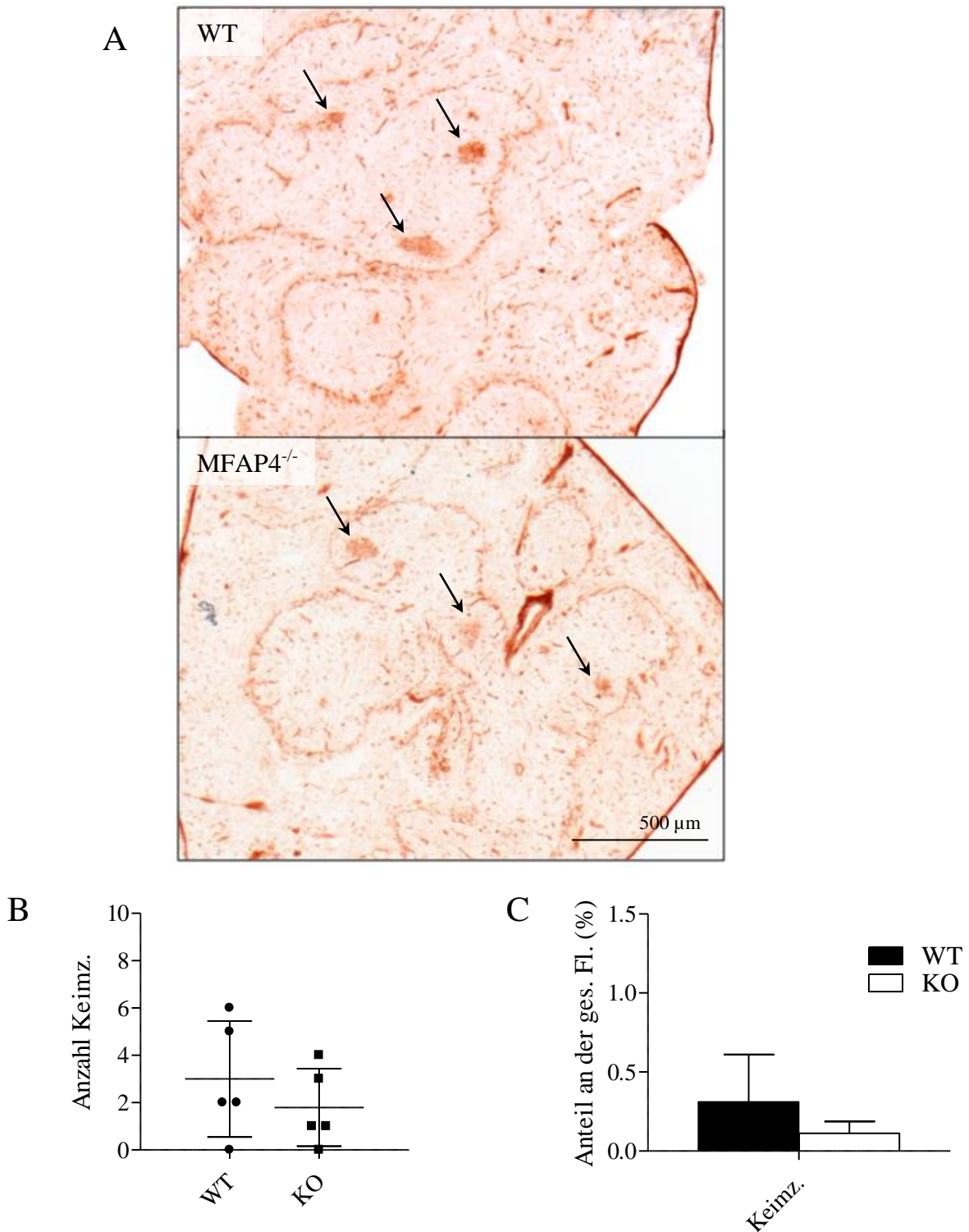


Abb. 9: Die Anzahl und Fläche der Keimzentren ist beim Fehlen von MFAP4 tendenziell vermindert.

A Immunhistochemische Darstellung der Keimzentren (PNA) einer WT und MFAP4^{-/-} Milz. Die Pfeile markieren Keimzentren. *B* Quantitative Darstellung der Anzahl der Keimzentren in den Milzschnitten (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5) *C* Quantitative Darstellung des prozentualen Anteils der Keimzentrumsfläche an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

Keimz. = Keimzentrum

In den Färbungen proliferierender Zellen in WT Milzen fanden sich Ansammlungen angefärbter Zellen über die gesamte rote Pulpa verteilt mit zentrifugal zunehmender Dichte zu den subkapsulären Bereichen. Durch eine simultane immunhistochemische Darstellung der B-Zellen konnten die BZZ und die TZZ in der weißen Pulpa getrennt bezüglich der Zellproliferation beurteilt werden. Die proliferierenden Zellen lagen in beiden Zonen einzeln vor, wobei in einzelnen umschriebenen Bereichen der Follikel diese dicht gelagert waren und den Keimzentren entsprachen. In der TZZ fanden sich vor allem im Grenzbereich zu den Follikeln auch proliferierende B-Zellen, die durch ihre doppelte Färbung von proliferierenden T-Zellen optisch unterschieden werden konnten. Eine solche Unterscheidung war in der BZZ nicht möglich. Die Dichte proliferierender Zellen in der BZZ (pBZ) war höher, als die Dichte proliferierender T-Zellen in der TZZ (pTZ) (Abb. 10).

In den MFAP4^{-/-} Milzen lag das gleiche Verteilungsmuster proliferierender Zellen sowohl in der roten Pulpa, als auch in der BZZ und TZZ der weißen Pulpa vor. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Dichte der pBZ und pTZ in den jeweiligen Zonen im Vergleich zu den WT Milzen (Abb. 10).

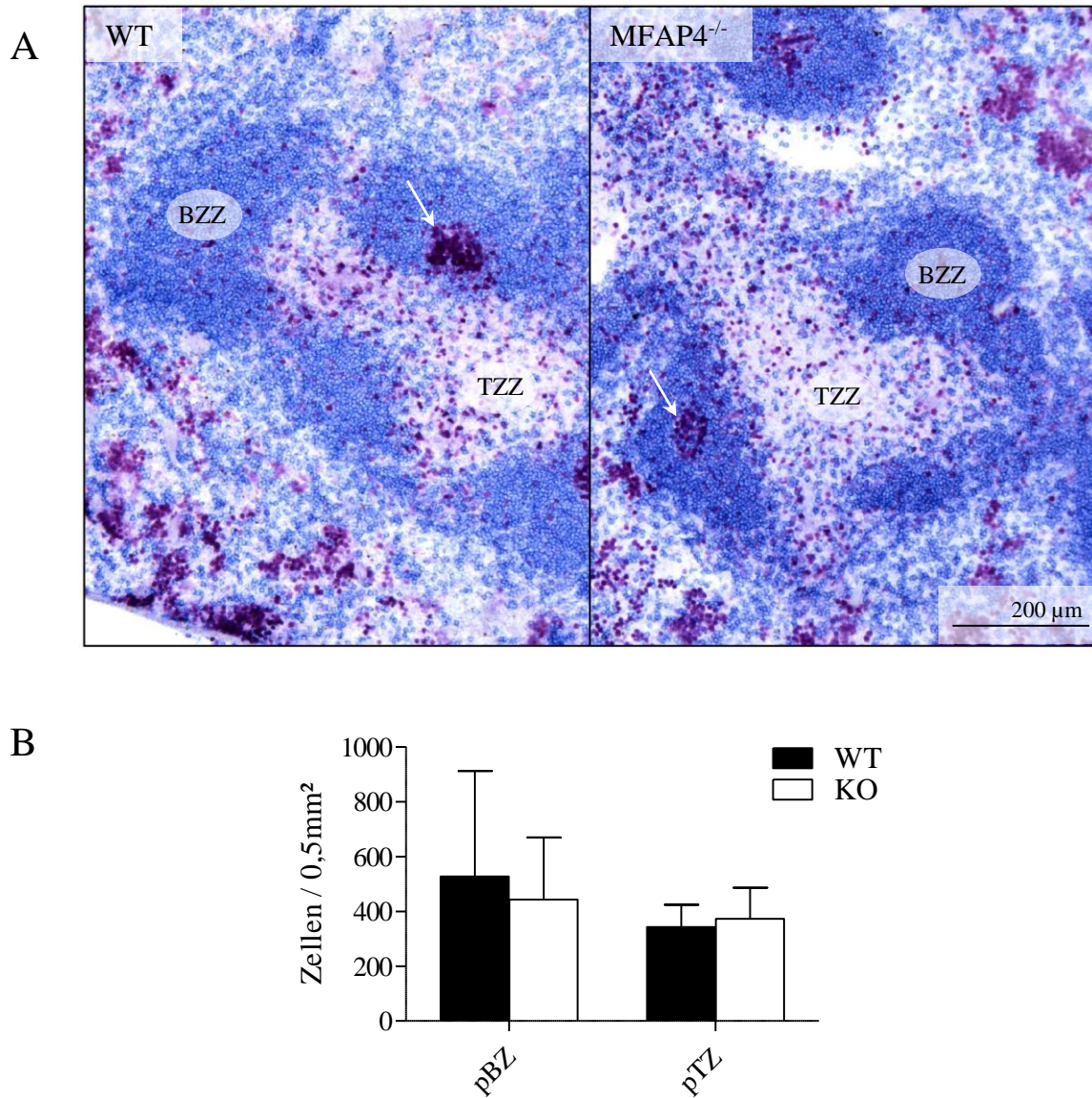


Abb. 10: MFAP4 beeinflusst die Proliferationsrate von B- und T-Zellen nicht.

A Immunhistochemische Darstellung der proliferierenden Zellen (rot, TEC-3) und B-Zellen (blau, B220) einer WT und MFAP4^{-/-} Milz. *B* Quantitative Darstellung der Dichte proliferierender Zellen in der B-Zell-Zone und proliferierender T-Zellen in der T-Zell-Zone (Mittelwert und Standardabweichung, n=5). Die Pfeile markieren Keimzentren.

BZZ = B-Zell-Zone, TZZ = T-Zell-Zone, pBZ = proliferierende Zellen in der B-Zell-Zone, pTZ = proliferierende T-Zellen in der T-Zell-Zone

Die follikulär dendritischen Zellen (FDCs) waren in den WT Milzen im Bereich der Follikel lokalisiert und durchzogen mit ihren Fortsätzen eine Fläche, die der Follikelfläche entsprach. Das gleiche Verteilungsmuster der FDCs fand sich ebenfalls in den MFAP4^{-/-} Milzen wieder (Abb. 11). Auch hier waren sie im Bereich der Follikel lokalisiert und die Dichte der FDCs war hier im Vergleich zu den WT Milzen nicht signifikant höher (Abb. 12).

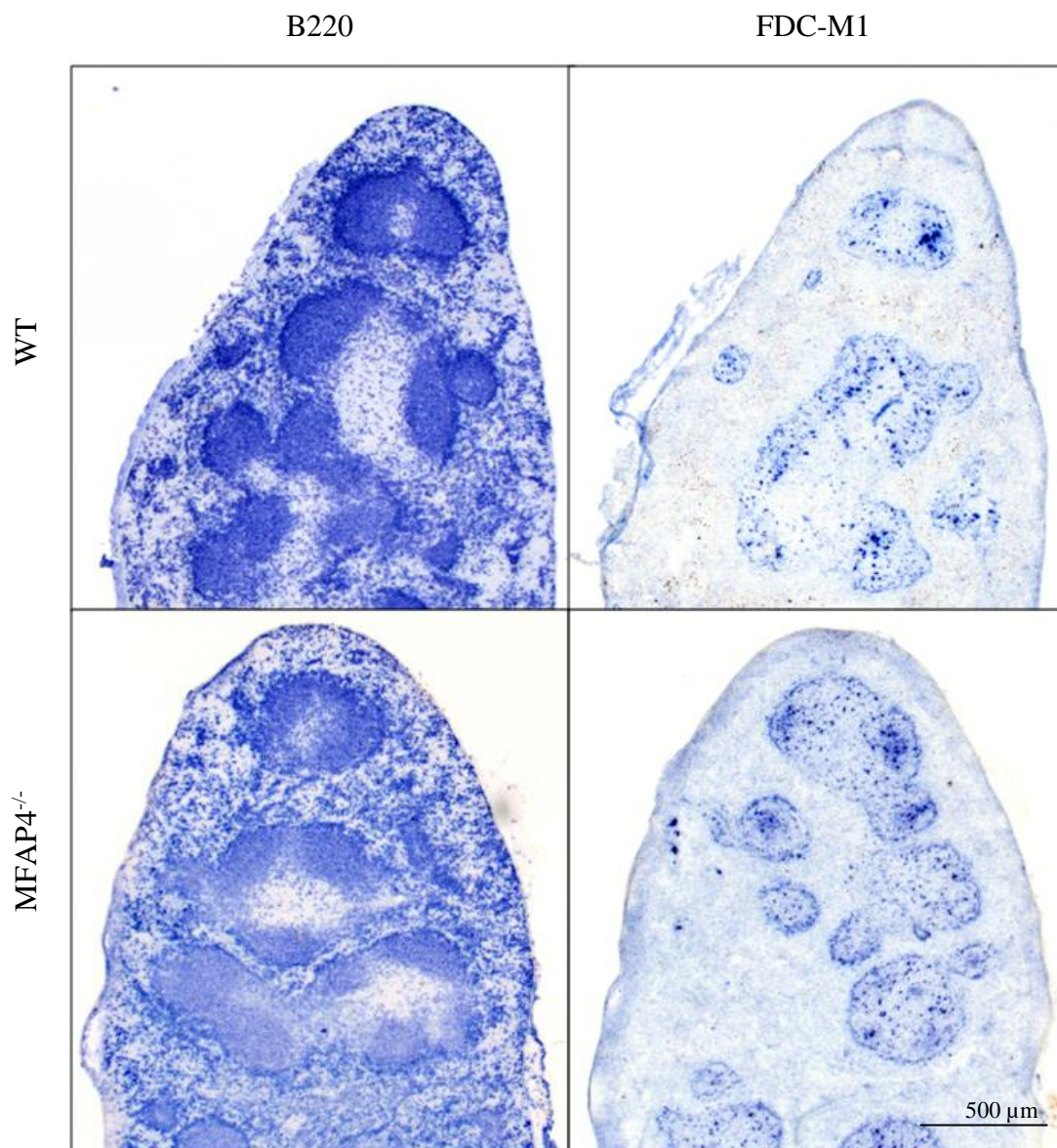


Abb. 11: MFAP4 beeinflusst die Anlage und Ausdehnung des FDC-Netzwerkes nicht. Immunhistochemische Darstellung der B-Zellen (B220) und der FDCs (FDC-M1) an unterschiedlichen Schnitten derselben WT bzw. MFAP4^{-/-} Milz. FDCs = follikulär dendritische Zellen

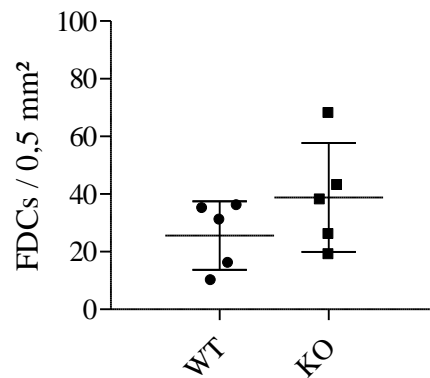


Abb. 12: Die Dichte der FDC innerhalb des Netzwerkes entwickelt sich unabhängig von MFAP4.

Quantitative Darstellung der Dichte der FDCs innerhalb der Fläche des FDC-Netzwerkes (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

FDCs = follikulär dendritische Zellen

Somit beeinflusst MFAP4 die Zunahme des Gewichtes während des Wachstumsprozesses nicht und sein Fehlen hat ebenfalls keine Auswirkung sowohl qualitativ auf die Anordnung, als auch quantitativ auf die Ausdehnung der einzelnen Kompartimente der Milz. Die weiße Pulpa nimmt ca. 45 % der Schnittfläche ein, die sich aus jeweils ca. 15 % Follikel-, Marginalzonen- und TZZ-Fläche zusammensetzt. Folglich findet auch in Abwesenheit von MFAP4 eine normale Entwicklung der Milz in Hinblick auf die makroskopische und mikroskopische Architektur ungehindert statt. Mit einer unveränderten Proliferationsrate von Lymphozyten und einem regelrecht ausgebildeten FDC-Netzwerk sind auch in Abwesenheit von MFAP4 wichtige Voraussetzungen für die Ausbildung einer Immunantwort gegeben und Keimzentren können sich bilden.

Die Regeneration der Milz im adulten Organismus ist unabhängig von MFAP4

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum der Milz während der Ontogenese und der Entwicklung im adulten Organismus haben können (Milicevic 2011). Daher wurden Regenerate aus WT→WT und MFAP4^{-/-}→MFAP4^{-/-} (KO→KO) Transplantationen auf gleiche Weise qualitativ und morphometrisch analysiert, wie die ontogenetisch entstandenen Milzen zuvor, um eine mögliche duale Rolle von MFAP4 in der Milzentwicklung zu erfassen.

Bei der Organentnahme gab es makroskopisch keine Unterschiede zwischen den Regeneraten aus den beiden Transplantationsgruppen. Auch bezüglich des Gewichtes stellte sich kein Unterschied zwischen heraus (Abb. 13). In Abwesenheit von MFAP4 war eine unveränderte Zunahme der Organmasse möglich.

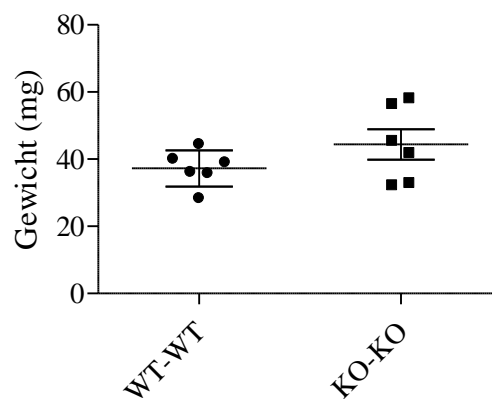


Abb. 13: MFAP4 hat keinen Einfluss auf das Gewicht von Milzregeneraten.

Gewicht der Milzregenerate 8 Wochen nach einer avaskulärer Transplantation (Spender-Empfänger) (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=6)

Bei der histologischen Auswertung konnte wie erwartet in den WT→WT Regeneraten anhand der Färbung der Makrophagen der roten Pulpa diese deutlich von der weißen Pulpa abgegrenzt werden. Die weiße Pulpa befand sich im Gegensatz zu den ontogenetisch entstandenen WT Milzen als Summe mehrerer kleinerer ungefärbter Areale überwiegend in den subkapsulären Bereichen und hatte zum Teil Anschluss an

die Kapsel. Dabei nahm sie eine deutlich geringere Fläche ein, als die rote Pulpa (Abb. 14). Diese Anordnung der beiden Kompartimente war ebenso in den KO→KO Regeneraten zu finden und auch in Bezug auf die Flächenausdehnung stellte sich kein Unterschied heraus (Abb. 14).

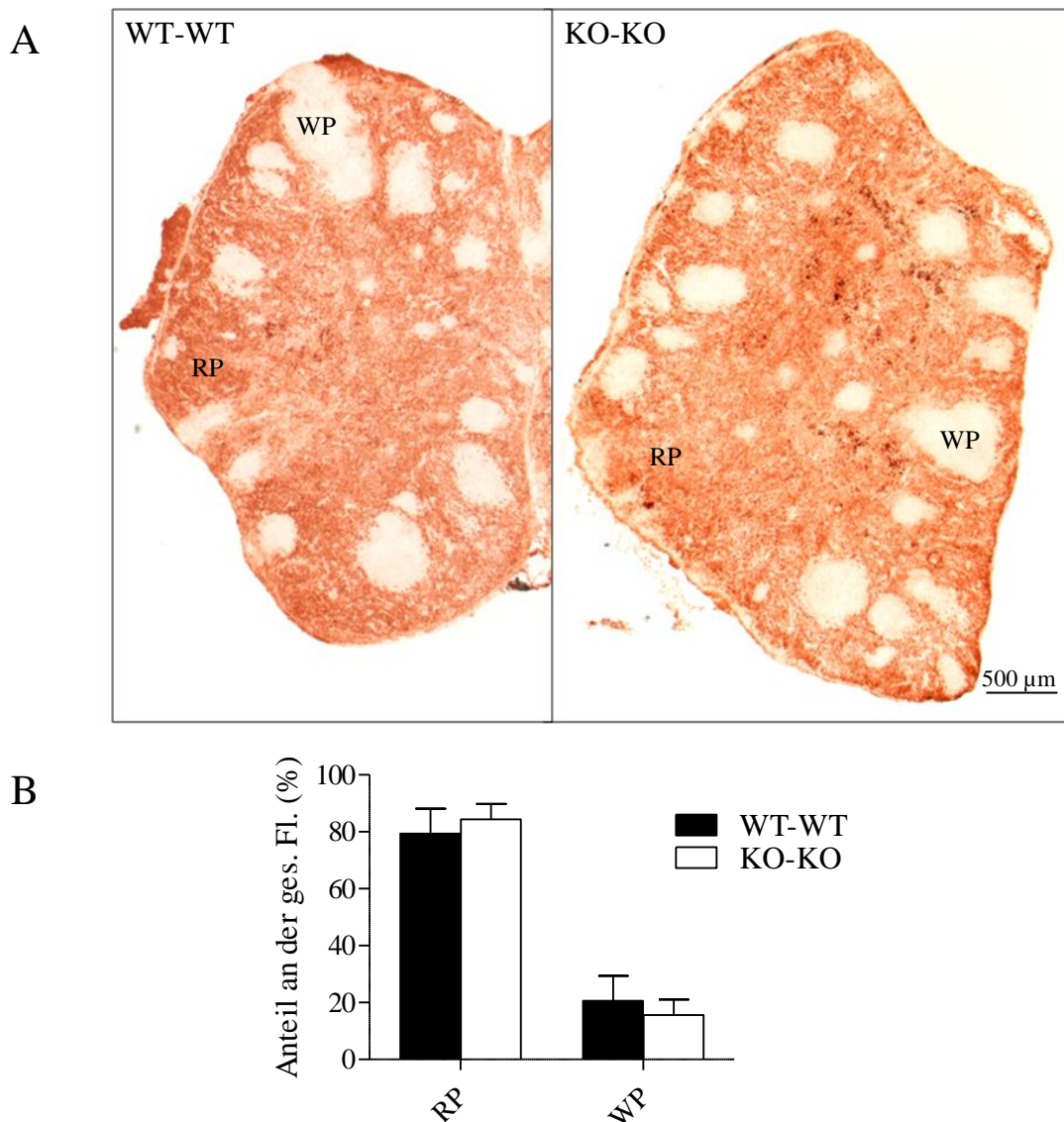


Abb. 14: Die Anlage und Ausdehnung der roten und weißen Pulpa ist unabhängig von MFAP4.

A Immunhistochemische Darstellung der Makrophagen der roten Pulpa (F4/80) von Milzregeneraten aus WT→WT und KO→KO Transplantationen. *B* Quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der roten und weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa

Die einzelnen Kompartimente der weißen Pulpa konnten hier ebenfalls qualitativ und quantitativ an gefärbten Serienschnitten derselben Organe beurteilt werden. In den WT→WT Regeneraten waren die MOMA-1⁺ Marginalzonenmakrophagen bandförmig angeordnet und grenzten die kleinen Areale der weißen Pulpa zur roten Pulpa hin häufig inkomplett und selten komplett ab. Die BZZ war durch dicht gelagerte B-Zellen zu erkennen und konnte anhand der Dicht auch hier in Follikel, die häufig nicht nur die Peripherie, sondern ein gesamtes Areal der weißen Pulpa einnahmen, und Marginalzone unterteilt werden. Eine kleine TZZ war nicht bei allen angeschnittenen Arealen der weißen Pulpa zu finden. Bezüglich des prozentualen Flächenanteils nahmen die Follikel wie in den ontogenetisch entstandenen Milzen ca. 15 % der Fläche ein, während die Marginalzone und die TZZ mit jeweils ca. 5 % kleiner waren (Abb. 15).

Die Anordnung der Kompartimente war in den KO→KO Regeneraten nicht anders, als in den WT→WT Regeneraten und auch hier stellte sich in der quantitativen Analyse ähnliche Flächenanteile heraus (Abb. 15).

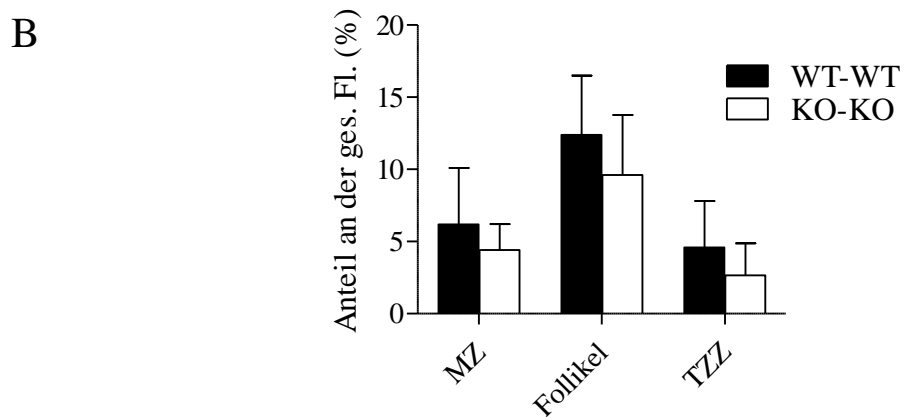
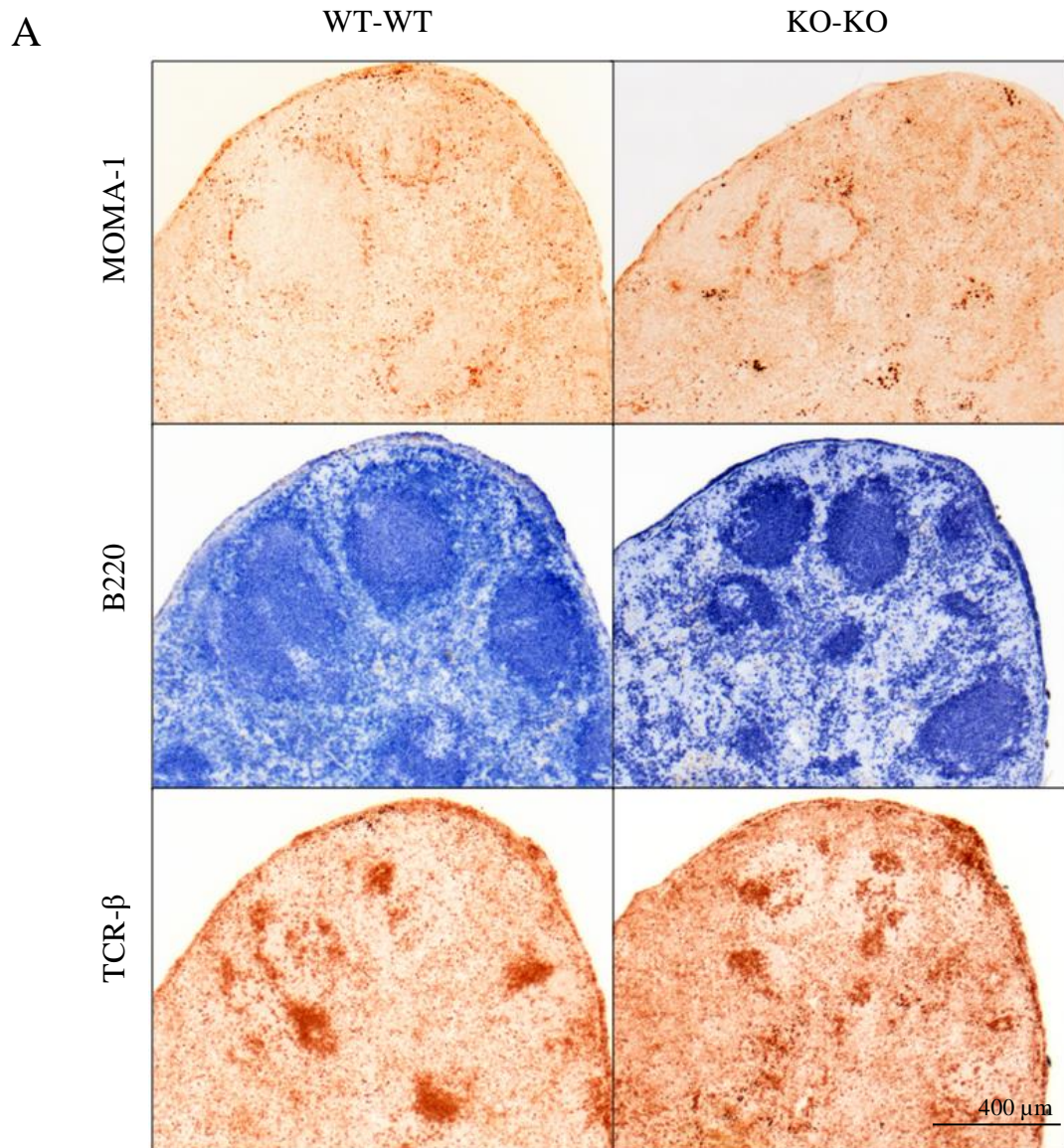


Abb. 15: MFAP4 beeinflusst die Ausbildung der Kompartimente der weißen Pulpa nicht.

A Immunhistochemische Darstellung von metallophilen Marginalzonenmakrophagen (MOMA-1), B-Zellen (B220) und T-Zellen (TCR-β) an unterschiedlichen Schnitten derselben Milzregenerate aus WT→WT und KO→KO Transplantationen.

B Quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der Kompartimente der weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

MZ = Marginalzone, TZZ = T-Zell-Zone

Die Beurteilung der Funktion der weißen Pulpa erfolgte bei den Milzregeneraten aus avaskulären Transplantationen wie zuvor bei den ontogenetisch entstandenen Milzen anhand der Keimzentren, der Proliferationsrate der Lymphozyten und der Ausprägung des FDC-Netzwerkes.

Eine Ausbildung von Keimzentren fand sowohl in den WT→WT, als auch in den KO→KO Regeneraten statt. Wie zuvor bei den ontogenetisch entstandenen Milzen fiel auch in den Regeneraten eine nicht signifikant höhere mittlere Anzahl von Keimzentren in den WT→WT Regeneraten, als in den KO→KO Regeneraten auf. Dieser Unterschied kam auch in Hinblick auf den mittleren Flächenanteil der Keimzentren an der gesamten Schnittfläche zum Ausdruck (Abb. 16).

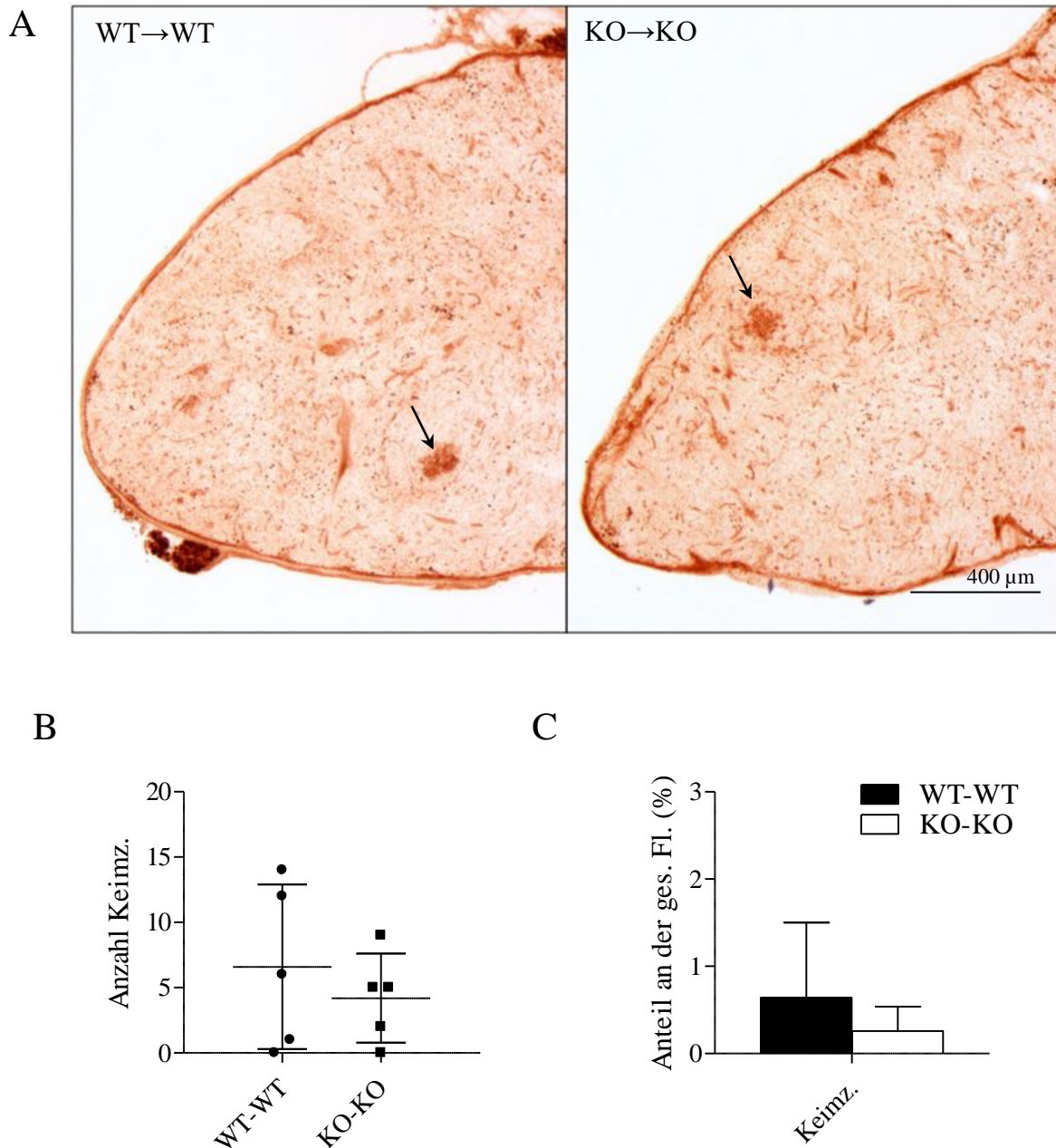


Abb. 16: Die Anzahl und Fläche von Keimzentren ist auch im adulten Organismus ohne MFAP4 tendenziell reduziert.

A Immunhistochemische Darstellung der Keimzentren (PNA) von Milzregeneraten aus WT→WT und KO→KO Transplantationen. Die Pfeile markieren Keimzentren. *B* Quantitative Darstellung der Anzahl der Keimzentren in den Schnitten (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5) *C* Quantitative Darstellung des prozentualen Anteils der Keimzentrumsfläche an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)
Keimz.= Keimzentrum

Im Bereich der roten Pulpa der WT→WT Regenerate fanden sich wie in den ontogenetisch entstandenen WT Milzen Ansammlungen proliferierender Zellen, die im Bereich des zentralen Narbengewebes fehlten. Durch die simultane Darstellung der B-Zellen konnte auch hier in der weißen Pulpa BZZ und TZZ getrennt beurteilt werden. In beiden Zonen lagen die proliferierenden Zellen einzeln und in fast allen angeschnittenen Zonen vor. Im Bereich der Keimzentren waren dichte Ansammlungen proliferierender Zellen in den Follikeln lokalisiert. Die mittlere Dichte der pBZ war auch hier größer, als die mittlere Dichte der pTZ (Abb. 17).

In den KO→KO Regeneraten zeigte sich ein ähnliches Bild. Ansammlungen proliferierender Zellen waren auch hier in der roten Pulpa und nicht im Bereich des Narbengewebes zu finden. In Bezug auf die Verteilung proliferierender Zellen in den Zonen der weißen Pulpa fand sich gleichfalls kein Unterschied. Auch die mittlere Dichte der pBZ und pTZ unterschieden sich nicht von jenen in Regeneraten aus WT→WT Milztransplantationen (Abb. 17).

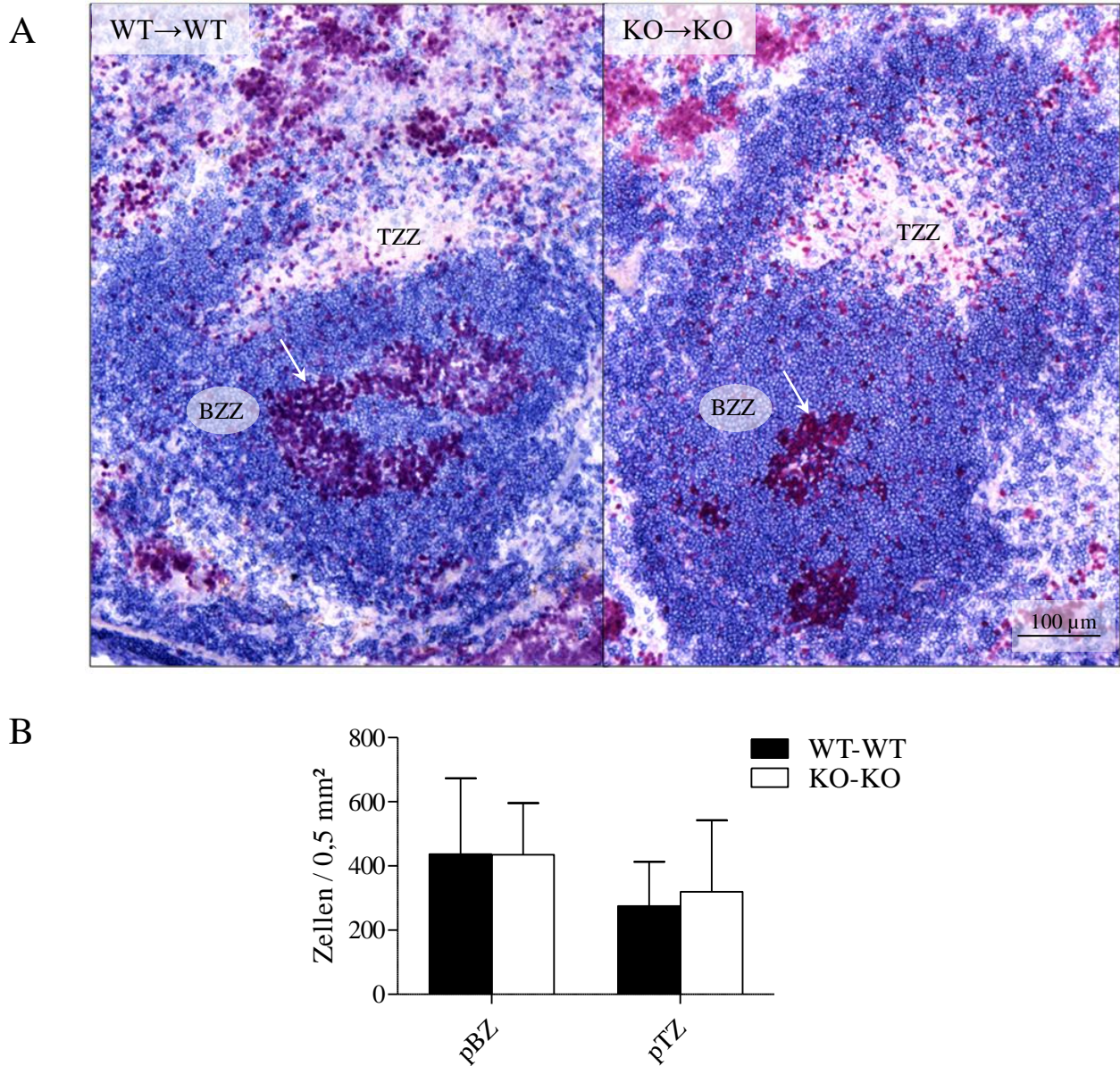


Abb. 17: Die Proliferationsrate von B- und T-Zellen wird nicht durch MFAP4 beeinflusst.
A Immunhistochemische Darstellung der proliferierenden Zellen (rot, TEC-3) und B-Zellen (blau, B220) von Milzregeneraten aus WT→WT und KO→KO Transplantationen. **B** Quantitative Darstellung der Dichte proliferierender Zellen in der B-Zell-Zone und proliferierender T-Zellen in der T-Zell-Zone (Mittelwert und Standardabweichung, n=5). Die Pfeile markieren Keimzentren.
 BZZ = B-Zell-Zone, TZZ = T-Zell-Zone, pBZ = proliferierende B-Zellen, pTZ = proliferierende T-Zellen

Die FDCs waren in den WT→WT Regeneraten im Bereich der Follikel lokalisiert, durchzogen mit ihren Fortsätzen diese und nahmen mit dem so gebildeten Netzwerk eine ihnen entsprechende Fläche ein (Abb. 18). Diese Verteilung zeigte sich ebenfalls in den Regeneraten aus KO→KO Milztransplantationen und auch hier entsprach die von den FDCs eingenommene Fläche der der Follikel (Abb. 18). Gleichmaßen unterschied sich der prozentuale Anteil, den das FDC-Netzwerk an der jeweiligen Schnittfläche einnahm, in den beiden Gruppen nicht. Interessanter Weise war die Dichte der FDCs in den Follikeln der WT→WT Regenerate signifikant höher, als in den KO→KO Regeneraten (Abb. 19).

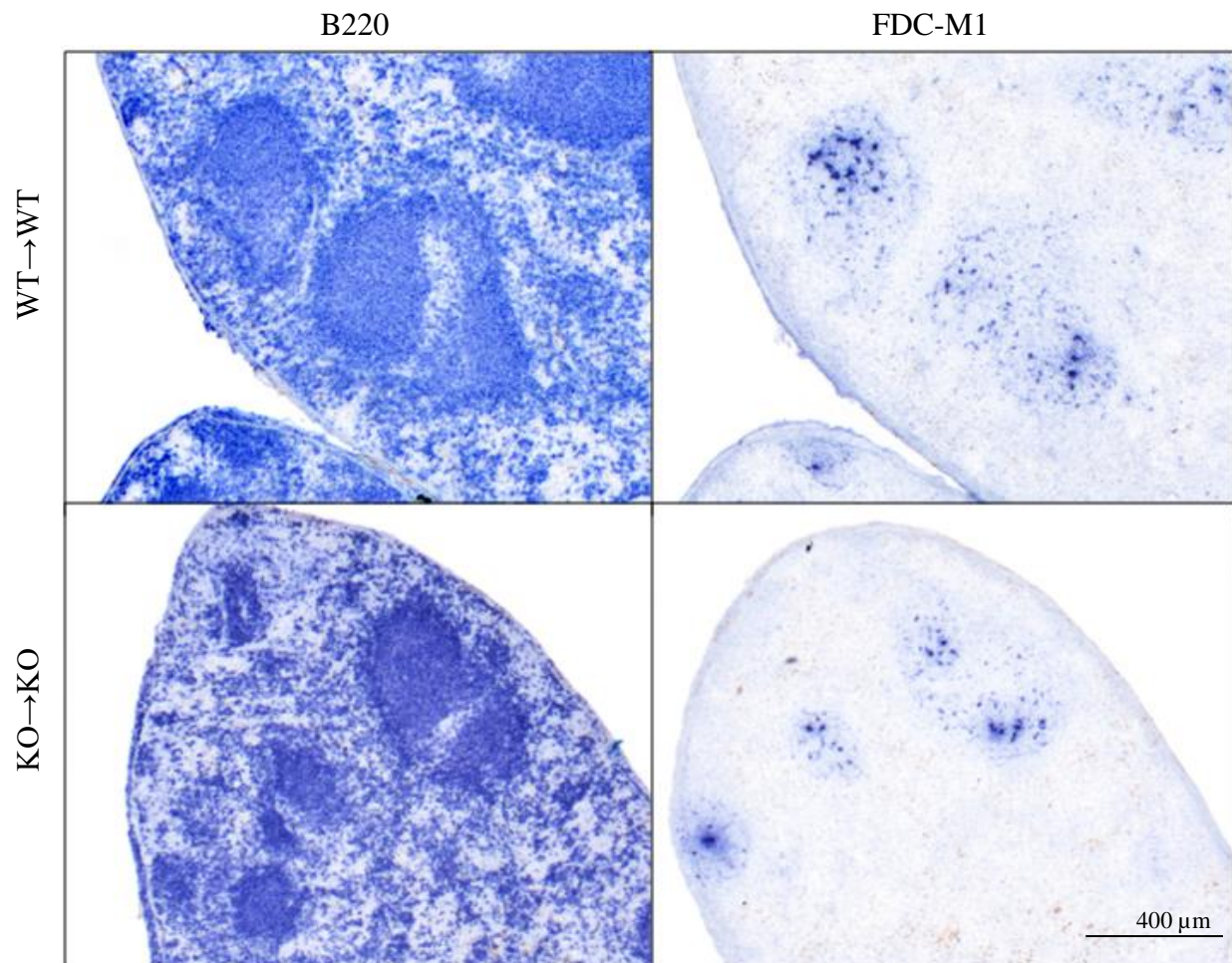


Abb. 18: Fehlt MFAP4 während des Regenerationsprozesses im adulten Organismus beeinflusst dieses nicht die Anlage und Ausdehnung des FDC-Netzwerkes.

A Immunhistochemische Darstellung der B-Zellen (B220) und FDCs (FDC-M1) an unterschiedlichen Schnitten derselben Milzregenerate aus WT→WT und KO→KO Transplantationen.

FDCs = follikulär dendritische Zellen

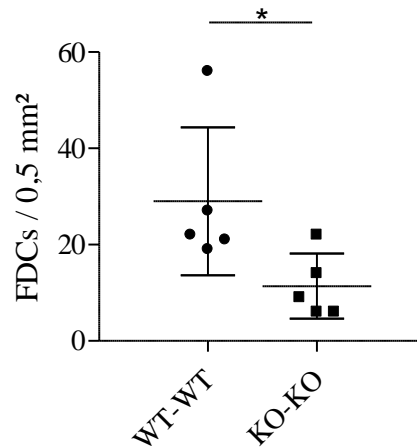


Abb. 19: im adulten Organismus beeinflusst MFAP4 die Dichte der FDCs im FDC-Netzwerk signifikant.

*Quantitativer Darstellung der Dichte der FDCs innerhalb der Fläche des FDC-Netzwerkes (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5, * = p<0,05)
FDCs = folliculär dendritische Zellen*

Auch bei der Entstehung im adulten Organismus liegt in Abwesenheit von MFAP4 somit keine Alteration der makroskopischen und mikroskopischen Aspekte der Milzregenerate vor: Alle Kompartimente sind ausgebildet und ihre Anordnung und Ausdehnung ist unbeeinflusst durch das Fehlen des Proteins. Die weiße Pulpa nimmt ca. 20 % der Milzfläche ein, die sich aus 15 % Follikel und jeweils 5 % Marginalzone und TZZ bildet. Auch in diesen Organen kann eine Immunantwort mit der Ausbildung von Keimzentren ablaufen und mit der unveränderten Proliferationsrate der Lymphozyten ist eine Voraussetzung für diesen Prozess auch ohne MFAP4 regelrecht gegeben. Das FDC-Netzwerk ist aber trotz einer physiologischen Ausdehnung in seiner Dichte in Abwesenheit von MFAP4 signifikant vermindert.

Um zu untersuchen, ob dieses Defizit auch auftritt, wenn WT Transplantat in einem adulten MFAP4^{-/-} Empfängerorganismus regeneriert, wurden WT-Milzfragmente in MFAP4^{-/-} Mäuse implantiert. Dabei zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Dichte des FDC-Netzwerkes, als auch der Keimzentrumsanzahl zwischen Regeneraten aus WT→WT und Regeneraten aus WT→KO Transplantationen (Abb. 20). Somit reicht die MFAP4 Produktion innerhalb des Organs aus, um das Defizit bezüglich des FDC-

Netzwerkes und der Keimzentrumszahl auszugleichen. Um nun herauszufinden, ob das außerhalb des Regenerats produzierte MFAP4 im Empfängerorganismus bei fehlender MFAP4 Produktion im Transplantat dieses Defizit ebenfalls ausgleichen kann, wurden Regenerate aus KO→WT Transplantationen untersucht. Interessanter Weise zeigte sich auch hier ein normal dichtes FDC-Netzwerk (Abb. 20). Es zeigte sich also, dass MFAP4 während der Milzentwicklung im adulten Organismus für die vollständige Ausbildung des FDC-Netzwerkes wichtig ist, und dass die beiden Produktionsorte von MFAP4 – lokal durch das Regenerat selber und systemisch durch den Empfängerorganismus – den Ausfall des jeweils anderen kompensieren können.

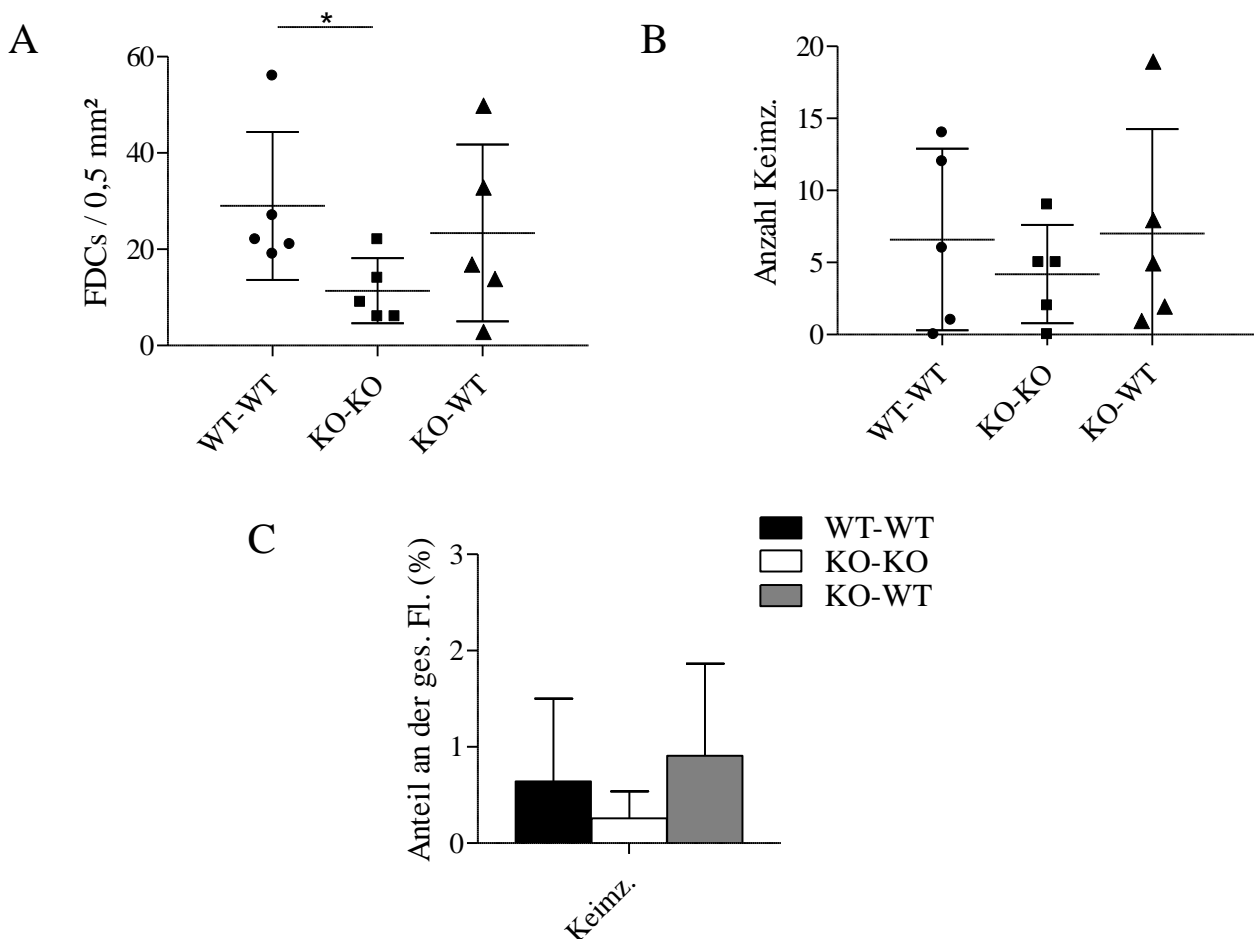


Abb. 20: Wird MFAP4 außerhalb aber nicht innerhalb des Transplantates produziert, tritt das Defizit des FDC-Netzwerkes und der Keimzentrumsausbildung nicht auf.

Quantitative Darstellungen der untersuchten funktionellen Parametern in Milzregeneraten aus WT→WT, KO→KO und KO→WT Transplantationen.

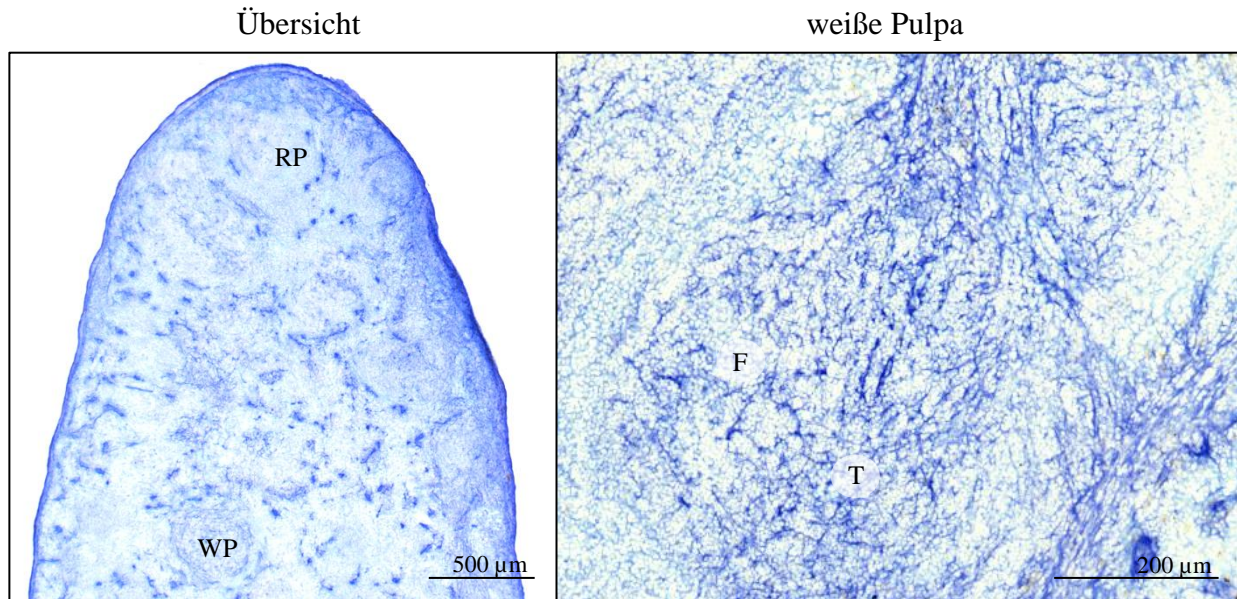
A Darstellung der Dichte der FDCs in den Follikeln (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5, * = p<0,05). **B** Darstellung der Anzahl und **C** des prozentualen Anteils der Keimzentrumsfläche an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

FDC = folliculär dendritische Zellen, Keimz. = Keimzentrum

MFAP4 der Milz wird innerhalb und außerhalb der Milz produziert

Zur Beurteilung der Expression von MFAP4 in den Regeneratgruppen wurden zunächst Regenerate aus WT→WT Transplantationen gefärbt. MFAP4 war ähnlich der Verteilung in ontogenetisch entstandenen WT Milzen stark in der Kapsel und den Wänden der Trabekelgefäße, die über kurze Strecken angeschnitten wurden, vorhanden und verlief hier sehr dicht gelagert in parallel angeordneten Strängen. Auch hier zogen MFAP4 Stränge in die rote Pulpa hinein und rerefizierten sich, sodass diese durch vereinzelte dünne Fasern gut sowohl von der weißen Pulpa, als auch dem Narbengewebe, in welchem MFAP4 als kräftige Bündel zu finden war, abgegrenzt werden konnte. In der weißen Pulpa hob sich die TZZ durch eine höhere Dichte und ein aus kräftigeren MFAP4 Strängen bestehendes, annähernd paralleles Verlaufsmuster gegen die Follikel mit geringerer Dichte dieses Proteins und aufgehobener Parallelität des MFAP4-Faserverlaufes ab. MFAP4 ist somit in Bezug auf die einzelnen Kompartimente genauso in den Milzregeneraten verteilt, wie in den ontogenetisch entstandenen Milzen (Abb. 21). Dieses wurde auch in der semiquantitativen Analyse deutlich (Abb. 21). Damit sind die Liganden von MFAP4 in der extrazellulären Matrix der Milzen trotz unterschiedlicher Entstehungszeitpunkte – in der Ontogenese und im adulten Organismus – gleich verteilt, sodass die Regenerate aus avaskulären WT→WT Milztransplantationen auch auf molekularer Ebene als vollständig regenerierte Milzen angesehen werden können.

In Regeneraten aus KO→KO Transplantationen konnten erwartungsgemäß keine Strukturen angefärbt werden.



	WT	WT→WT
Kapsel	+++++	+++++
Trabekelgefäße	+++++	+++++
Rote Pulpa	+	+
Marginalzone	+	+
Follikel	+++	+++
TZZ	+++	+++

Abb. 21: Die Expression von MFAP4 in Regeneraten aus WT→WT Transplantationen entspricht der in WT Milzen.

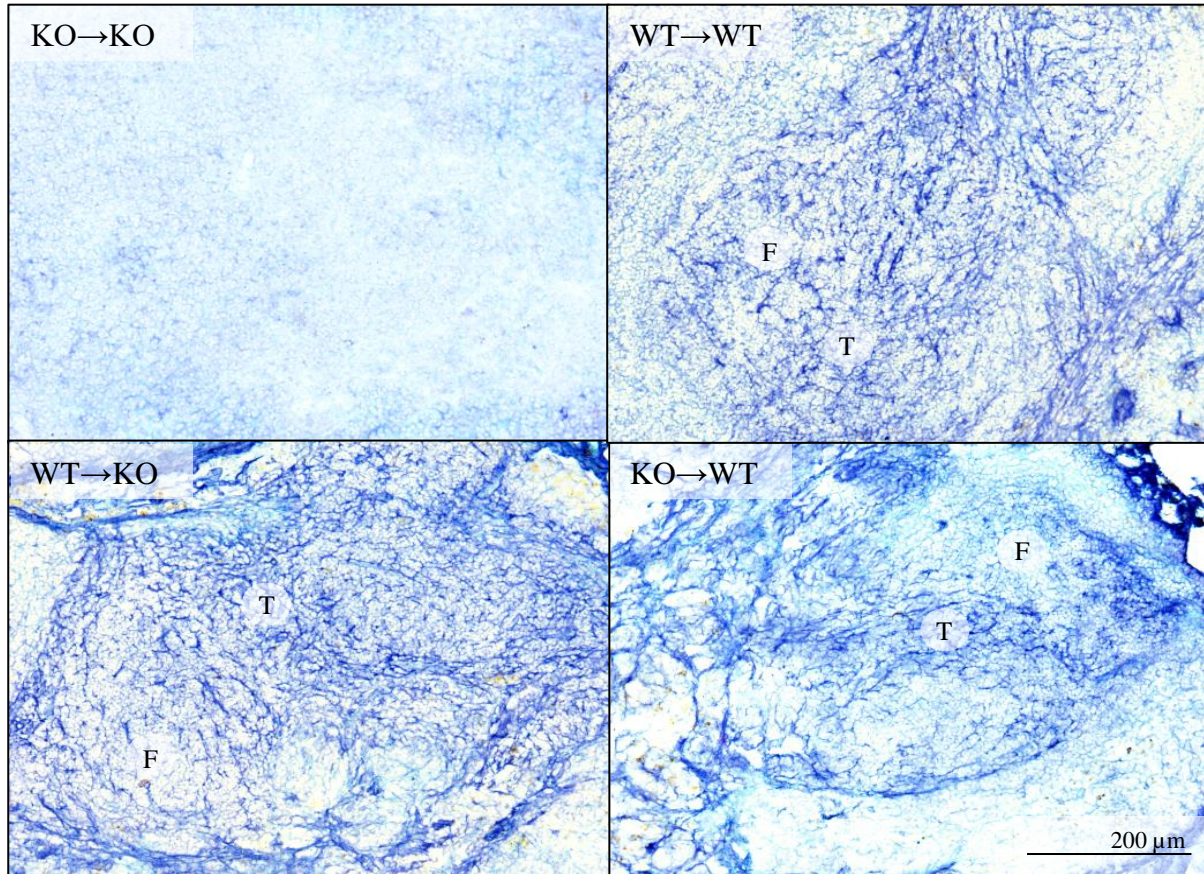
Immunhistochemische Darstellung von MFAP4 (Hyb 7-14) in einem Regenerat aus einer WT→WT Transplantation in einer Übersichtsaufnahme und einer vergrößerten Aufnahme der weißen Pulpa. Ergebnis der semiquantitativen Auswertung der MFAP4 (Hyb 7-14) Färbung von Regeneraten aus WT→WT Transplantationen im Vergleich zu ontogenetisch entstandenen WT Milzen (n=6)

F = Follikel, T = T-Zell-Zone, WP = weiße Pulpa, RP = rote Pulpa

Regenerierte die Milz in einem MFAP4 freien Organismus (WT→KO) zeigte sich das gleiche Bild, wie in den WT→WT Regeneraten (Abb. 22). Somit reicht die Produktion innerhalb des Organs aus, um sich vollständig mit MFAP4 zu versorgen.

In KO→WT Transplantationen konnte MFAP4 nicht vom Transplantat produziert werden. Dennoch zeigte sich überraschender Weise in der immunhistochemischen Färbung, dass das Protein vom Empfänger in das Regenerat gelangte (Abb. 22). In Bezug auf die MFAP4 Verteilung und Dichte konnten diese Regenerate nicht von

Regeneraten aus WT→WT und WT→KO Transplantationen unterschieden werden (Abb. 22): Die Kapsel und die Wand der Trabekelgefäße wurden stark angefärbt und MFAP4 lag in dicken parallel verlaufenden Strängen vor. Die Gefäße wurden auch hier über kurze Strecken angeschnitten. Die rote Pulpa hob sich durch einzelne, locker verteilte und dünne Stränge von MFAP4 sowohl von dem zentralen Narbengewebe, in dem MFAP4 in kräftigen Strängen, scheinbar keinem einheitlichen Verteilungsmuster folgend zu Darstellung kam, als auch von der weißen Pulpa ab, in der auch hier die TZZ von den Follikeln anhand der Dichte und des Verteilungsmusters von MFAP4 abgegrenzt werden konnte: In der TZZ zeigte sich die aus den WT→WT Regeneraten bekannte annähernd parallel angeordnete Verteilung von kräftigen MFAP4 Strängen, die sich in den Follikeln feiner, lockerer verteilt und sich kaum parallel verlaufend darstellten. Somit konnte auch die Produktion vom Empfänger das Regenerat vollständig mit MFAP4 versorgen und den Ausfall der eigenen Produktion kompensieren. Eine semiquantitative Analyse der Regeneratgruppen verdeutlichte diesen Befund (Abb. 22).



	WT→WT	WT→KO	KO→WT
Kapsel	+++++	+++++	+++++
Trabekelgefäße	+++++	+++++	+++++
Rote Pulpa	+	+	+
Marginalzone	+	+	+
Follikel	+++	+++	+++
TZZ	+++	+++	+++

Abb. 22: Die Expression von MFAP4 in den Regeneraten aus WT→WT sowie den gekreuzten Regeneraten unterscheidet sich nicht.

*Immunhistochemische Darstellung von MFAP4 (Hyb 7-14) in Milzregeneraten aus WT→WT, KO→KO, KO→WT und WT→KO Transplantationen in einer Übersichtsaufnahme und einer vergrößerten Aufnahme der weißen Pulpa
 F = Follikel, T = T-Zell-Zone*

MFAP4 in Regeneraten aus KO→WT Transplantationen wird sowohl lokal von eingewanderten WT-Zellen, als auch systemisch von externen WT-Zellen des Empfängers produziert

Da Regenerate einer avaskulären Milztransplantation aus Zellen unterschiedlichen Ursprungs bestehen - zum Einen aus überlebenden Zellen des Transplantates und somit des Donors und zum Anderen aus Zellen des Empfängers, die während des Regenerationsprozesses einwandern (Pabst 1991) –, könnte nach einer KO→WT Transplantation entweder der Produktionsort in Form von MFAP4 produzierende Zellen des Empfänger in das Regenerat einwandern, oder das Produkt selber gelangt ins regenerierende Gewebe. Mittels der real-time RT-PCR konnte zunächst nachgewiesen werden, dass Zellen der Milzregenerate unter „physiologischen“ Bedingungen (WT→WT Transplantationen) MFAP4 in einem ähnlichen Umfang, wie ontogenetisch entstandene Milzen produzieren, während dieses in MFAP4^{-/-} Milzen und Regeneraten aus KO→KO Transplantationen nicht der Fall war (Abb. 23). Dieses wurde durch die Gelelektrophorese, auf der kein Amplifikat der spezifischen Größe sichtbar war, bestätigt. Wie erwartet, wurde auch in Regeneraten aus WT→KO Transplantationen MFAP4 produziert (Abb. 23). In Regeneraten aus KO→WT Transplantationen zeigte sich zwar eine Produktion von MFAP4, allerdings war diese signifikant niedriger, als die Produktion in Regeneraten aus WT→WT und WT→KO Transplantationen (Abb. 23).

Das immunhistochemisch detektierte MFAP4 in KO→WT Regeneraten wird demnach zum Einen lokal von eingewanderten Zellen aus dem Empfängerorganismus produziert und zum Anderen von extern importiert.

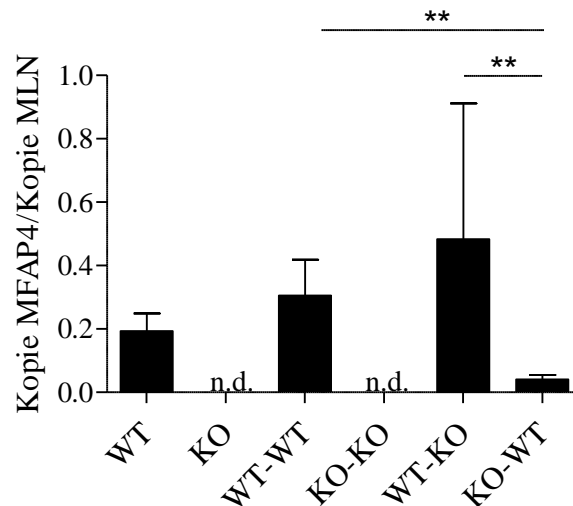


Abb. 23: Der MFAP4 mRNA-Level ist in Regeneraten aus KO→WT Transplantationen signifikant geringer, als in Regeneraten aus WT→WT und WT→KO Transplantationen, in denen sich die Expression nicht signifikant unterscheidet.

*Darstellung der relativen Expression von MFAP4 zur Kontrolle MLN in Milzen von WT und MFAP4^{-/-} Tieren, sowie Milzregeneraten aus ungekreuzten (WT→WT, KO→KO) und gekreuzten (WT→KO, KO→WT) Transplantationen. ** = p<0,01
n.d. = nicht detektierbar*

Um zu überprüfen, ob im Falle der WT→KO Transplantation die Produktion von MFAP4 im Regenerat ausreicht, um auch andere Organe und Strukturen des Empfängers mit diesem Protein zu versorgen, wurde es in Lymphknoten und Schwanzresektaten immunhistochemisch dargestellt: Die Proben eines WT und eines MFAP4^{-/-} Tieres stellten Positiv- beziehungsweise Negativkontrollen dar, mit der die Gewebeproben von einem MFAP4^{-/-} Tier, das ein WT Transplantat erhalten hatte (WT→KO Transplantation), verglichen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass MFAP4 wie erwartet im Lymphknoten und Schwanzresektat der WT Maus deutlich vorhanden war (Abb. 24): Im Lymphknoten war die Kapsel kräftig angefärbt. In der TZZ befanden sich wie auch in der TZZ der Milz dicke Stränge von MFAP4, die die Zone annähernd parallel durchzogen. In den Follikeln waren diese Stränge ähnlich der Follikel der Milz feiner, lagen nicht so dicht und wiesen keine Parallelität im Verlauf auf. Die Epidermis und Haarfollikel der Schwanzhaut sowie das knöcherne Skelett färbten sich nicht spezifisch für MFAP4 an, während in der Dermis Stränge von MFAP4 in unterschiedlicher Dicke zu finden waren. Sie durchzogen teilweise parallel, teilweise netzartig das Bindegewebe. Die Septen im Fettgewebe wiesen ebenfalls

filigrane Stränge von MFAP4 auf. Auch das Peri- und Epimysium sowie die Faszien der Muskulatur stellten sich mit einer dezenten Blaufärbung dar. In den Proben von MFAP4^{-/-} Tieren konnte wie erwartet diese Protein nicht detektiert werden (Abb. 24). Doch auch in dem Lymphknoten und dem Schwanzresektat eines MFAP4^{-/-} Tieres mit WT Transplantat konnte kein MFAP4 dargestellt und immunhistochemisch kein Unterschied zu den Proben der MFAP4^{-/-} Tiere ohne Transplantat festgestellt werden (Abb. 24). Demnach war die Produktion auf das Regenerat beschränkt, sodass ein Export mit einer Versorgung von peripheren Organen und Strukturen durch das Milzregenerat ausblieb.

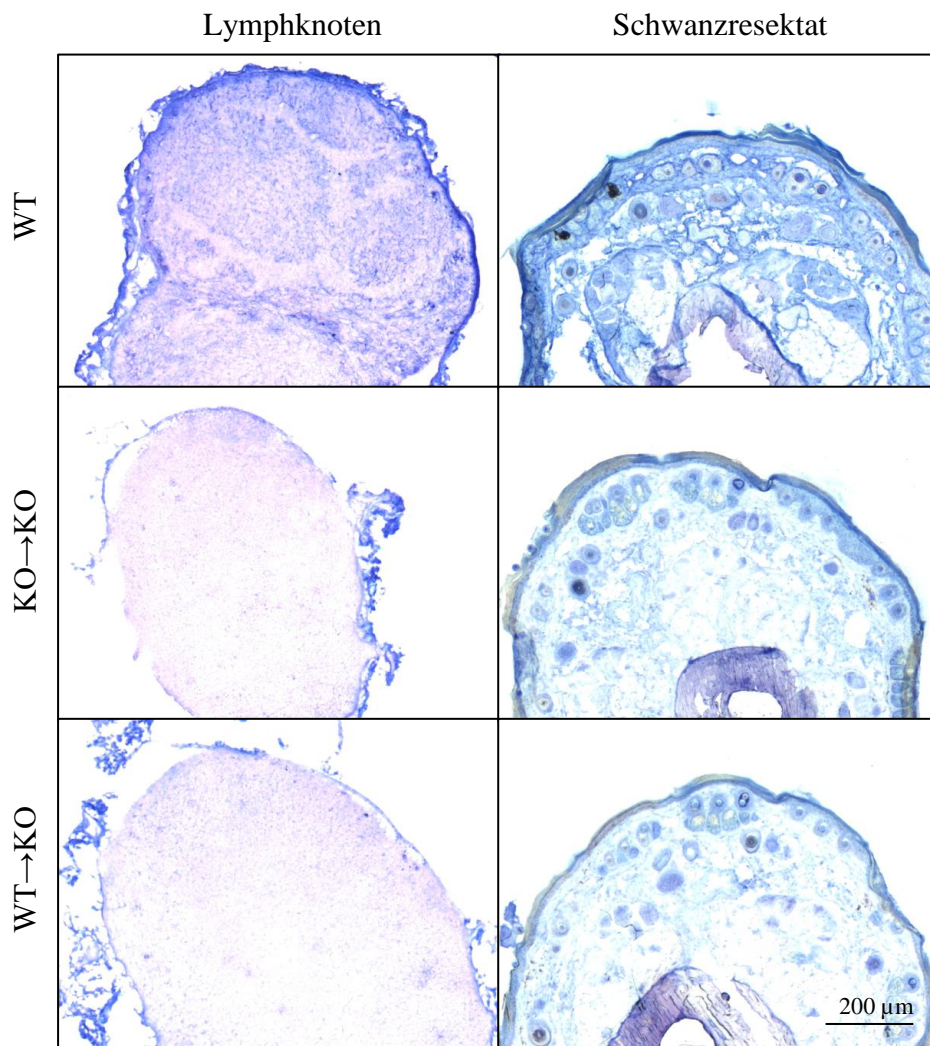


Abb. 24: Wird MFAP4 in dem Regenerat aus einer WT→KO Transplantation produziert, findet kein Export des Proteins in Lymphknoten oder Schwanzgewebe statt. Immunhistochemische Darstellung von MFAP4 (Hyb7-14) in Lymphknoten und Schwanzresektat eines WT Tieres (WT), eines MFAP4^{-/-} Tieres, das ein MFAP4^{-/-} Transplantat erhielt (KO→KO), und eines MFAP4^{-/-} Tieres, das ein WT Transplantat erhielt (WT→KO).

DISKUSSION

Mit dieser Arbeit erfolgte erstmals eine genaue Beschreibung der Verteilung von MFAP4 in der Milz. Zwar gibt es bereits immunhistochemische Darstellungen von MFAP4 in diesem und anderen Organen (Kasamatsu 2011, Schlosser 2006, Furuichi 2000, Toyoshima 1999), doch lag das Hauptaugenmerk vor allem auf der Co-Lokalisation mit Elastin in elastischen Geweben, sodass sich die Betrachtung im Falle der Milz auf die Kapsel und die Wand der Trabekelgefäße beschränkte (Wulf-Johansson 2013, Toyoshima 1999). Weiterführend wurde hier die qualitative Analyse durch eine Semiquantitative ergänzt, sodass anhand ihrer Ergebnisse die Strukturen und Kompartimente der Milz nach ihrem MFAP4 Gehalt und Verteilung in 4 Gruppen eingeteilt werden können: [1] Strukturen mit sehr viel, [2] mit viel [3] mit wenig und [4] mit kaum MFAP4 (Abb. 25).

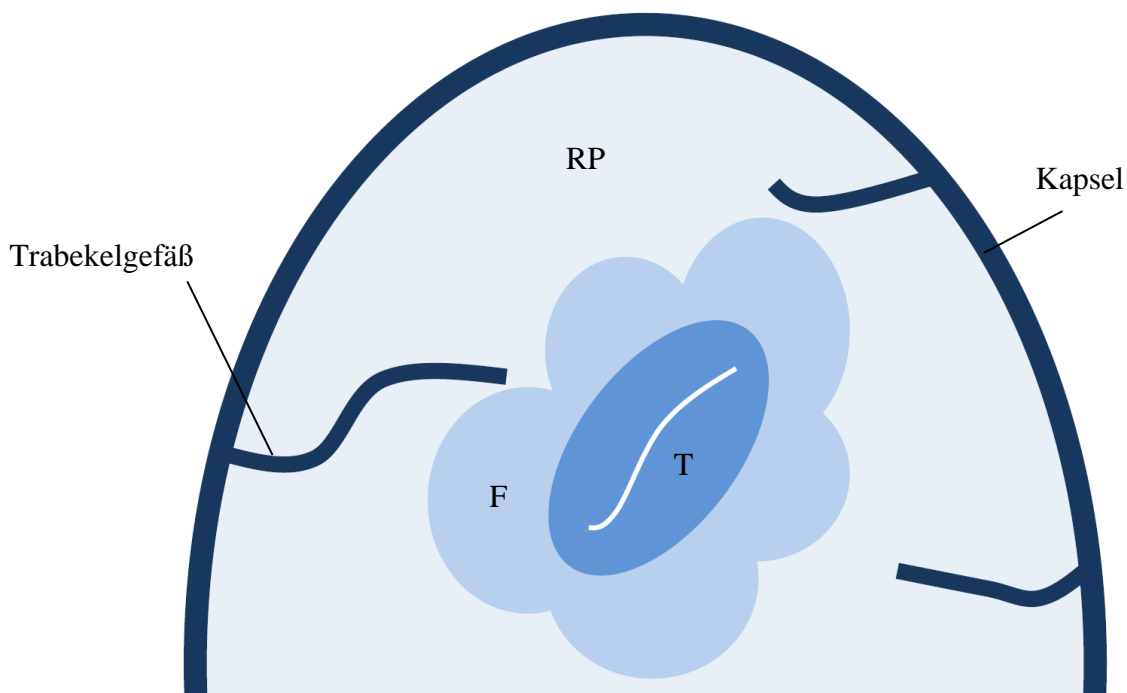


Abb. 25: Die Strukturen und Kompartimente der Milz können nach ihrem MFAP4 Gehalt und Verteilung in 4 Gruppen eingeteilt werden.

Schematische Darstellung des Ergebnisses der semiquantitativen Auswertung der MFAP4-Färbung von WT Milzen: Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit dem MFAP4-Gehalt der Milzstrukturen. Zu den Strukturen mit sehr viel MFAP4 gehören Kapsel und Trabekelgefäße. Die weiße Pulpa hat deutlich weniger MFAP4, wobei die TZZ mehr MFAP4 enthält, als die Follikel. Von der weißen Pulpa heben sich die rote Pulpa durch ihren sehr geringen MFAP4-Gehalt ab.

Die Kapsel und die Wand der Trabekelgefäße enthalten viel MFAP4. Es ist bekannt, dass MFAP4 dort mit elastischen Fasern assoziiert ist (Toyoshima 1999). Auffällig waren die MFAP4 Stränge, die subkapsulär und von den Wänden der Trabekelgefäße in die rote Pulpa hineinzogen und sich so rarefizierten, dass in der restlichen roten Pulpa nur wenige Stränge zu finden waren. Dieses Verteilungsmuster entspricht dem Verlauf der retikulären Fasern der roten Pulpa, die mit dem extrazellulären Raum der Kapsel und der Trabekelgefäßwände in Verbindung stehen und aus den gleichen Komponenten der extrazellulären Matrix aufgebaut sind (Hiroaki 1988). Es ist bekannt, dass der Anteil von Mikrofibrillen in retikulären Fasern von deren Durchmesser abhängig ist (Hayakawa 1990), sodass der rare MFAP4 Gehalt in der restlichen roten Pulpa im Vergleich zu den subkapsulären und perivaskulären Anteilen dieses Kompartiments auf den geringeren Mikrofibrillenanteil zurückgeführt werden kann.

Erstmals erfolgte hier die Darstellung von MFAP4 mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Dabei zeigte sich eine fast vollständige Co-Lokalisation von MFAP4 mit Laminin in der weißen Pulpa. Laminin ist ein Bestandteil der retikulären Fasern, die in der weißen Pulpa das conduit system bilden, ein Kanalsystem, über das niedermolekulare Antigene (<70 kDa) schnell in die TZZ sowie die Follikel transportiert werden (Roozendaal 2008, Sixt 2005, Nolte 2003, Gretz 1997). Die Architektur dieser Fasern ist in den einzelnen Kompartimenten der weißen Pulpa unterschiedlich (Lokmic 2008): Im Allgemeinen ist sie aus zwei Strukturen aufgebaut: [1] der interstitiellen Matrix und [2] der Basalmembran (Lokmic 2008, Sixt 2005). Abbildung 26 zeigt schematisch den Aufbau der retikulären Fasern in der TZZ. Dort wird die interstitielle Matrix von einem Kollagenkern mit Kollagen Typ I und III und einer den Kern umscheidenden Mikrofibrillschicht gebildet (Lokmic 2008, Roozendaal 2008, Sixt 2005). Nach außen schließt sich eine Basalmembran an, der die FRCs aufsitzen (Lokmic 2008, Roozendaal 2008, Katakai 2004). In der Mikrofibrillschicht befindet sich neben Fibrillin-1 und -2 auch das bisher unbekannte ER-TR7 Antigen und Kollagen Typ VI (Lokmic 2008, Katakai 2004, van Vliet 1985). Die Basalmembran besteht aus typischen Basalmembranproteinen, wie

Proteoglykanen, Kollagen Typ IV, Perlecan, Nidogen-1, Fibronectin und Laminin (Lokmic 2008, Gumati 2003). Zusammen bilden diese drei Schichten die retikulären Fasern, die in einem Netzwerk die TZZ durchziehen (Bajénoff 2009, Lokmic 2008, Roozendaal R2008). Sie erstrecken sich weiter in die Follikel hinein, in denen sich das Netzwerk rarefiziert (Bajénoff 2009, Lokmic 2008) und die FDCs der begrenzende Zelltyp sind (El Shikh 2012, Bajénoff 2009). Die Mikrofibrillschicht verbindet Kollagenkern und Basalmembran und trägt maßgeblich zu der Elastizität des retikulären Netzwerkes bei (Lokmic 2008, Sixt 2005), während die Basalmembran Zellen, die Kontakt zu ihr haben, in der extrazellulären Matrix verankert (Lokmic 2008, Sixt 2005, Takashi 1996). Vor allem Fibronectin und Laminin sind die wichtigen Anker-moleküle (Lokmic 2008, Takashi 1996). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann MFAP4 nun als weiteres Basalmembranprotein identifiziert werden, da es mit Laminin, nicht aber ER-TR7 co-lokalisiert. Dieser Befund wird durch die Co-Lokalisation von MFAP4 und Podoplanin als Marker der fibroblastischen Retikulumzellen unterstützt. Dieses Ergebnis ist kongruent mit Ergebnissen aus Untersuchungen in murinen Atemwegen, in denen MFAP4 als Basalmembranprotein identifiziert wurde (Pilecki 2015). MFAP4 ist somit in der Milz ein weiteres mögliches Anker-molekül, das über eine RGD-Integrin-Interaktion FRCs und FDCs mit der Basalmembran verbindet. Dieses entspricht seiner Funktion als Anker-molekül in der Wand großer Gefäße, wie der Aorta (Toyoshima 2005), oder in den Atemwegen (Pilecki 2015).

Im Gegensatz zu den Follikeln und der TZZ ist MFAP4 kaum in der Marginalzone vorhanden und co-lokalisiert hier nicht mit Laminin. Dieses ist in Konsens mit dem Aufbau des conduit systems in der Marginalzone, der sich von dem Aufbau in den anderen beiden Kompartimenten unterscheidet (Lokmic 2008): Kollagenkern und Mikrofibrillschicht fehlen hier; der Kern der Fasern wird lediglich vom ER-TR7 Antigen gebildet, der von einer Basalmembran, die zusätzlich zu den „klassischen“ Basalmembranproteinen Agrin enthält, umgeben wird (Lokmic 2008). Ihr sitzen die MRCs als Stromazellen der Marginalzone auf (Roozendaal 2011, Mueller 2009, Lokmic 2008). Das Fehlen von MFAP4 in der Basalmembran in der Marginalzone ist

somit ein weiterer Unterschied in der Architektur der extrazellulären Matrix der einzelnen Kompartimente der weißen Pulpa.

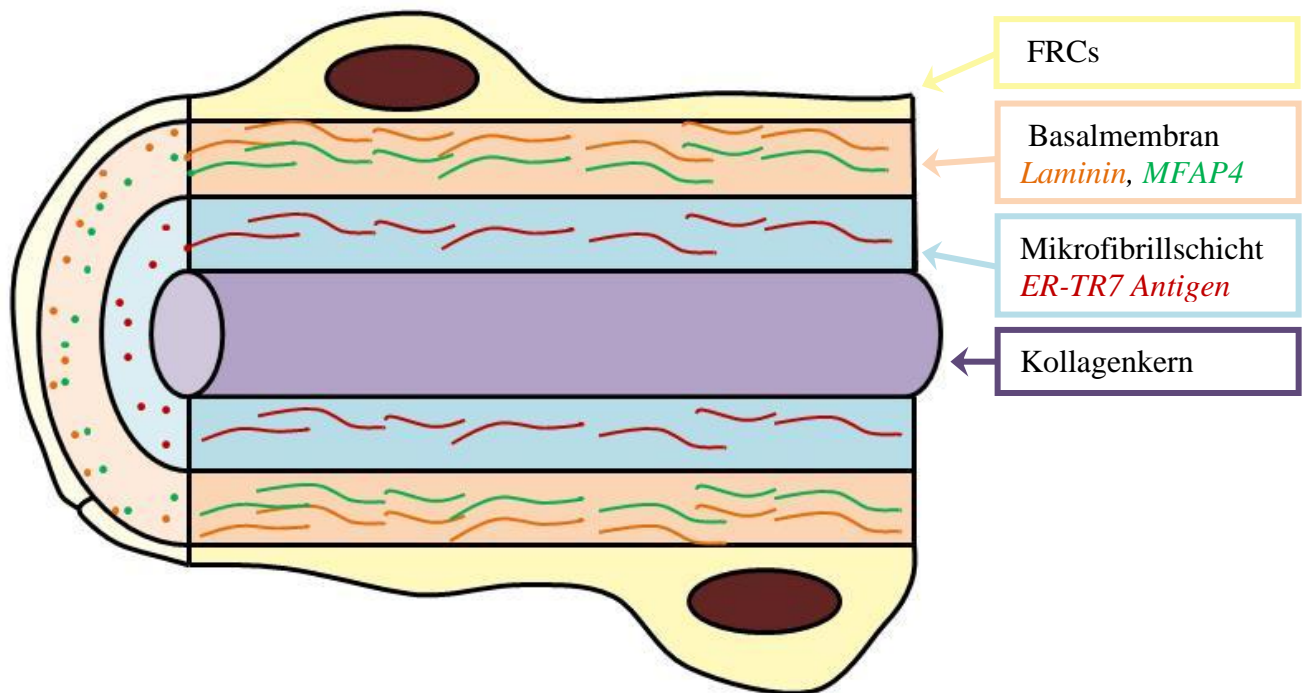


Abb. 26: MFAP4 co-lokalisiert mit Laminin, nicht aber ER-TR7 in der TZZ der Milz und ist somit Bestandteil der Basalmembran retikulärer Fasern.

Schematische Darstellung des Aufbaus retikulärer Fasern der TZZ sowie des Ergebnisses der Fluoreszenzfärbungen: Die interstitielle Matrix wird von einem Kollagenkern (lila) und einer sich anschließenden Mikrofibrillschicht (blau) gebildet. Sie wird von einer Basalmembran (orange) ummantelt, der fibroblastische Retikulumzellen (gelb) als zelluläre Begrenzung aufsitzen. Es ist bekannt, dass ER-TR7 (rot) Bestandteil der Mikrofibrillschicht und Laminin (braun) Teil der Basalmembranproteine ist. Durch das Ergebnis der Fluoreszenzdoppelfärbungen MFAP4/ER-TR7 und MFAP4/Laminin konnte die Lokalisation von MFAP4 (grün) in der Basalmembran bestimmt werden.

Die Lokalisation von MFAP4 suggeriert, dass MFAP4 eine Rolle in der Entwicklung der Milz, insbesondere der Ausbildung der Kompartimente spielt, da die Ankerproteine der Basalmembran für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität wichtig sind und zudem ein Teil der extrazellulären Matrix die Wanderung von Lymphozyten beeinflusst (Sobocinski 2010, Lokmic 2008, Bajenoff 2006). Trotz seiner strategisch wichtigen Lokalisation in der Basalmembran hat das Fehlen von

MFAP4 keinen Einfluss auf das Wachstum und die Ausbildung der Kompartimente der Milz während der Ontogenese: Bezüglich des Gewichtes und der mikroskopischen Aspekte der Milzen war kein Unterschied zwischen WT und MFAP4^{-/-} Milzen zu finden. Eine rote und weiße Pulpa mit ihren drei Kompartimenten waren gut abzugrenzen und richtig lokalisiert. Auch morphometrisch gab es in MFAP4^{-/-} Milzen im Vergleich zu WT Milzen keine signifikanten Abweichungen der Ausdehnung aller Kompartimente. In MFAP4^{-/-} Milzen war der Ablauf einer Immunantwort mit der Entstehung von Keimzentren möglich und auch die Lymphozytenproliferation und die Anlage und Ausdehnung des FDC-Netzwerkes wurden nicht sicht- und messbar von MFAP4 beeinflusst.

Zu weiterführenden Untersuchungen kann das Wachstum anderer sekundär lymphatischer Gewebe von MFAP4^{-/-} Mäusen analysiert werden, da sich andere wachstumsmodulierende Faktoren, zum Beispiel der Lymphotoxin- β -Rezeptor, auf die Entwicklung unterschiedlicher sekundär lymphatischer Gewebe unterschiedlich auswirken (Ware 2005, Fütterer 1998). Ein möglicher wachstumsmodulierender Effekt von MFAP4 könnte in diesen Geweben ebenfalls stärker zum Ausdruck kommen.

Zudem erfolgte die Analyse der Milzen in der Homöostase und nicht unter Bedingungen, in denen das Immunsystem stimuliert wird. Führt zum Beispiel eine Stimulation der Leber zu einem zirrhotischen Umbau (Sækmoose 2015, Mölleken 2009), werden Blutgefäße verletzt (Schlosser 2016) oder wird die Haut durch UV-Strahlung (Kasamatsu 2011) oder eine Wunde (Furuichi 2000) beeinflusst, spielt MFAP4 eine Rolle im Remodelingprozess des Gewebes. Werden Milzen durch Antigene stimuliert, könnte das Fehlen von MFAP4 ebenfalls Auswirkungen haben. Für diese Annahme spricht die tendenziell reduzierte Anzahl der Keimzentren, die in MFAP4^{-/-} Milzen gemessen wurde. In weiterführenden Untersuchungen könnten durch verschiedene Infektionen die unterschiedlichen Immunantworten bezüglich eines Einflusses von MFAP4 analysiert werden. Durch die Auffälligkeit der reduzierten Keimzentrumzahl, und da im adulten Organismus MFAP4 für die Ausbildung des FDC-Netzwerkes wichtig ist, ist ein Einfluss von MFAP4 auf eine Th₂ Antwort am wahrscheinlichsten. Durch eine Helminthose kann eine Th₂ Antwort (Peón 2013) induziert werden. Weitere Immunantworten können durch weitere Infektionen zum

Beispiel mit dem lymphozytischen Choriomeningitisvirus (CD8⁺-T-Zellantwort) (Khanolkar 2002), mit *Leishmania major* (Th₁) (Yurdakul 2011, Sacks 2002, Heinzel 1989) und mit der Injektion von Pneumokokkenpolysacchariden (Thymus unabhängige Immunantwort) (Vinuesa 2013, Lee 2003, Claassen 1989) induziert werden und mittels FACS-Analysen sowie Untersuchungen des Zytokinmilieus bzw. Messung des Antikörpertiters in ihrer Beeinträchtigung durch das Fehlen von MFAP4 in MFAP4^{-/-} Mäusen charakterisiert werden.

Während der Entwicklung im adulten Organismus hat MFAP4 ebenfalls keinen Einfluss auf die Anlage und Ausdehnung der Kompartimente der Milz. Eine weiße Pulpa war von einer roten Pulpa auch in Regeneraten aus KO→KO Transplantationen abzugrenzen, war auch hier richtig lokalisiert und auch ihre Kompartimente waren unverändert angeordnet. Die morphometrische Analyse zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen Regeneraten aus WT→WT und KO→KO Transplantationen. Ein bemerkenswerter Unterschied zu der ontogenetischen Entwicklung besteht in Bezug auf die Dichte des FDC-Netzwerkes. Dieses war in Regeneraten aus KO→KO Transplantationen signifikant reduziert. Trotzdem waren eine fast normale Ausbildung von Keimzentren und eine unveränderte Proliferation von B-Zellen unter homöostatischen Bedingungen möglich. Dieser Befund ist in Einklang mit einer Studie, die eine Formierung von Keimzentren sogar in einer FDC-freien Umgebung beschreibt (Koni und Flavell 1999).

MFAP4 hat somit einen anderen Einfluss auf die Entwicklung der Milz im adulten Organismus, als in der Ontogenese. Eine ähnliche duale Funktion ist bereits für TNF bekannt. Dieser Faktor hat ebenfalls keinen Einfluss auf die ontogenetische Entwicklung der Milz, ist aber für eine vollständige Regeneration von Milzgewebe im adulten Organismus unerlässlich (Milicevic 2011).

Wie MFAP4 die Entwicklung des FDC-Netzwerkes beeinflusst ist unklar, zumal auch über die Herkunft und die Ausbildung des FDC-Netzwerkes nicht viel bekannt ist (Rezk 2013): FDCs scheinen mesenchymalen Ursprungs zu sein (Wilke 2010) und es wird angenommen, dass sie sich sowohl aus einwandernden (El Shikh 2012, Muñoz-Fernandez 2006), als auch residenten Zellen entwickeln (Castagnaro 2013, El Shikh

2012). Zudem gibt es Hinweise, dass eine Verschmelzung von CD35⁺ B-Zellen mit bereits vorhandenen Stromazellen zu der Bildung von binukleären FDCs führt (Murakami 2007). In der Ontogenese ist postnatal zunächst noch kein FDC-Netzwerk vorhanden und die weiße Pulpa besteht aus einem konzentrisch um die Zentralarterie angeordneten Stromazellnetzwerk aus FRCs mit T-Zellen im Zentrum und B-Zell-Ansammlungen in der Peripherie (Balogh 2001, Dijkstra 1983a). Erst nach einer Reorganisation des stromalen Gerüsts formieren sich Follikel (El Shikh 2012, Bajénoff 2009): Das Netzwerk wird im Bereich der entstehenden Follikel lichter und verzweigter und die FRCs werden dort durch FDCs ersetzt (Bajénoff 2009). FDCs sind somit erst später, nach der Organisation eines Großteils der extrazellulären Matrix und ihrer Reorganisation in der Milz nachweisbar. Der Regenerationsprozess im adulten Organismus findet in sehr ähnlicher Weise statt (Pabst 1991). Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie MFAP4 während der Entwicklung im adulten Organismus die Ausbildung des Netzwerkes beeinflusst: [1] MFAP4 unterstützt diesen Reorganisationsprozess als Integrinligand und Basalmembranprotein, sodass die Anlage des Netzwerkes zuvor abgeschlossen ist und somit keine morphometrischen Unterschiede in der Ausdehnung der einzelnen Kompartimente zu messen sind, die Dichte des FDC-Netzwerkes jedoch beim Fehlen von MFAP4 reduziert ist. [2] FDCs reagieren empfindlich auf Änderungen des Milieus (Rezk 2013, Roozendaal 2011) und sind auch nach Abschluss der Entwicklung der Follikel stark auf die permanente Kommunikation mit Lymphozyten angewiesen (El Shikh 2012, Roozendaal 2011, Wang 2011, Kawabe 1994). Das Fehlen von MFAP4 könnte diese Interaktion beeinträchtigen, sodass das FDC-Netzwerk zwar vollständig ausgeprägt ist, seine Dichte aber nicht auf „physiologischem“ Niveau gehalten werden kann. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Interessanterweise tritt das Defizit in der Dichte des FDC-Netzwerkes und auch die tendenziell reduzierte Anzahl der Keimzentren nicht mehr auf, wenn MFAP4 entweder vom Empfängergewebe oder von Transplantatzellen produziert werden kann, wie es in den Regeneraten aus KO→WT und WT→KO Transplantationen der Fall ist. Zur

weiteren Beurteilung dieses Befundes erfolgte erstmals in dieser Arbeit die immunhistochemische Darstellung eines Bestandteils der extrazellulären Matrix in Regeneraten aus avaskulären Milztransplantationen. Dabei zeigte sich, dass Regenerate aus WT→WT Transplantationen eine gleiche Verteilung und Dichte von MFAP4 in den einzelnen Kompartimenten aufweisen. Damit müssen auch die Liganden von MFAP4 genauso vorhanden sein, wie in ontogenetisch entstandenen WT Milzen, sodass die Regenerate nicht nur funktionell und morphologisch auf zellulärer (Klaperski 2006, Nohroudi 2005, Marques 2003, Leemans 1999, Pabst 1991, Pabst 1986), sondern auch auf extrazellulär molekularer Ebene als vollständig regenerierte Milzen angesehen werden können.

Mit der Durchführung der avaskulären Milztransplantationen bestand die Möglichkeit, Bedingungen zu schaffen, in denen MFAP4 während des Wachstums der Milz entweder nur lokal im Transplantat (WT→KO) oder nur systemisch im Empfängergewebe (KO→WT) produziert werden kann. Damit kann gezeigt werden, dass unabhängig davon, ob MFAP4 nur im Empfängergewebe oder nur vom Transplantat produziert werden kann, das Regenerat vollständig mit MFAP4 versorgt ist. Die Verteilung und Dichte von MFAP4 in den einzelnen Kompartimenten unterscheidet sich nicht zwischen den Regeneraten aus WT→WT, WT→KO und KO→WT Transplantationen. Die beiden Produktionsorte sind damit in der Lage, den Ausfall des jeweils anderen vollständig zu kompensieren. Es zeigt sich zudem, dass das Protein in Regeneraten aus WT→KO Transplantationen von überlebenden Transplantatzellen produziert wird und diese interne Produktion für die Versorgung des gesamten Organs ausreicht. Nach einer avaskulären Transplantation werden fast alle Zellen nekrotisch, bis auf ein paar überlebende nicht lymphatische Zellen im Randsaum des Transplantates (Pabst 1991). Es ist nicht ganz geklärt, ob FRCs und FDCs direkt überleben oder sich aus überlebenden milzresidente embryonalen mesenchymalen Stammzellen (Nkx2-5⁺Islet1⁺) neu differenzieren (Castagnaro 2013). Von diesen überlebenden Zellen geht der Regenerationsprozess aus, es bildet sich ein neues stromales Netzwerk, das sich in Interaktion mit einwandernden Lymphozyten wie in der Ontogenese weiter differenziert (Koning 2012, Roozendaal 2011, Katakai 2004, Ngo 2001, Pabst 1991). MFAP4 wird also wahrscheinlich von diesen stromalen

Zellen produziert, zumal auch weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix nicht nur in der Milz, sondern auch in anderen sekundär lymphatischen Geweben von Stromazellen produziert werden (Malhotra 2013, Py 2013, Mueller 2009, Lokmic 2008, Junt 2008). Für andere nicht-lymphatische Organe ist ebenfalls bekannt, dass Stromazellen MFAP4 produzieren (Sækmoose 2015, Mölleken 2009).

In der inversen Situation der KO→WT Transplantation fallen diese Produzenten aus, da die überlebenden Stromazellen vom MFAP4^{-/-} Transplantat stammen. Demnach kann MFAP4 prinzipiell auf zwei Wege ins Regenerat gelangen: [1] MFAP4 produzierende Zellen wandern während des Regenerationsprozesses aus dem WT Empfänger in das Organ ein oder [2] MFAP4 wird außerhalb des Regenerates im Empfängergewebe produziert und gelangt als fertiges Produkt ins regenerierende Gewebe. Das Ergebnis der real time RT-PCR Untersuchung in ontogenetisch entstandenen Milzen und Regeneraten aus den unterschiedlichen Transplantationsgruppen zeigt zum Einen, dass die Expression von MFAP4 in Regeneraten aus WT→WT und WT→KO Transplantationen gleich ist, und zum Anderen, dass Regenerate aus KO→WT Transplantationen lokal MFAP4 produzieren. Demnach müssen MFAP4 produzierende Zellen während des Regenerationsprozesses aus dem Empfänger in das Regenerat einwandern. Zellen, die während des Regenerationsprozesses in die Milz einwandern, sind Lymphozyten (Pabst 1991, Dijkstra 1983b, Metcalf 1964). Dass diese nicht die Produzenten von MFAP4 sind, zeigt die immunhistochemische Färbung von MFAP4 im Lymphknoten. Nach der Implantation wandern die Lymphozyten des Transplantates in lymphatisches und nicht-lymphatisches Gewebe des Empfängerorganismus‘ aus (Westermann 1997). Dementsprechend müssten im Falle der WT→KO Transplantationen die WT Lymphozyten des Transplantates auch in die Lymphknoten und Schwanzhaut des Empfängers einwandern. Hier konnte aber immunhistochemisch kein MFAP4 nachgewiesen werden. Da in KO→WT Regeneraten im Vergleich zu WT→WT Regeneraten deutlich weniger MFAP4-mRNA produziert wird, das Protein MFAP4 aber in normaler Verteilung und Dichte im histologischen Präparate nachweisbar ist, wird das Protein auch als fertiges Produkt aus dem Empfängerorganismus in das Regenerat importiert. Ein solcher Proteinimport ist bereits für Fibronectin, einen

anderer Bestandteil der extrazellulären Matrix, bekannt, der über den Blutstrom in die Milz gelangt (Aziz-Seible 2011, Rebres 1995). MFAP4 könnte die Milz ebenfalls über den Blutstrom erreichen, da bekannt ist, dass es im Plasma gelöst vorliegt und von anderen Organen ins Blut sezerniert wird (Sækmose 2015, Mölleken 2009). Zu den Bindungspartnern in der Basalmembran könnte MFAP4 über Transzytose gelangen, wie es für andere Proteine mit einer RGD-Sequenz beschrieben ist (Teesalu 2013). MFAP4 kann in seinen niedermolekularen Formen prinzipiell in das conduit system gelangen und darüber in der weißen Pulpa verteilt werden (Nolte 2003). Ob ein solcher Mechanismus tatsächlich vorliegt ist allerdings nicht bekannt. Bisher konnte aber gezeigt werden, dass Proteine, die von FDCs produziert und in das conduit system sezerniert werden, im Falle einer Infektion als Signalmoleküle dem systemischen Kreislauf zugeführt werden (Py 2013). Die aktuellen Ergebnisse deuten daraufhin, dass dieser Signalweg auch in die andere Richtung verläuft, indem MFAP4, das systemisch produziert wird, in die Milz und das conduit system gelangt und dort die Anzahl der FDCs und damit potentiell die Immunantwort reguliert. Ein Export von MFAP4 besteht nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht, da die Regenerate aus WT→KO Transplantationen sowohl die Lymphknoten, als auch die Schwanzhaut nicht mit MFAP4 versorgen.

Da es im Falle der WT→KO Transplantationen anscheinend keinen Abstrom von MFAP4 aus dem Regenerat gibt, muss die Produktionsmenge gut reguliert sein. Bei der lokalen Produktion muss diese auf lokaler Ebenen stattfinden, weil eine systemische Kontrolle nicht greifen würde. Im Falle der KO→WT Transplantationen kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Regulation auch auf systemischer Ebene abspielt, da MFAP4 auch von außen in die Milz gelangt. Für andere Regelkreise ist ebenfalls eine systemisch und lokale Regulation bekannt: So gibt es zum Beispiel neben der systemischen Regulation der Cortisolproduktion über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Herman 2012, Löffler 2003) auch eine lokale Regulation der Cortisolproduktion in der Haut über die Haarfollikel (Ito 2005). Auch in der Niere ist ein lokales Renin-Angiotensin-System (RAS) vorhanden, das neben dem systemischen RAS existiert (Tojo 2016).

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit erstmalig eine genaue Verteilung von MFAP4 in der Milz mit seiner Co-Lokalisation mit Laminin in der Basalmembran des conduit systems. Für Regenerate konnte eine normale Ausbildung des retikulären Netzwerkes gezeigt werden, sodass sie vollständig regenerierten Milzen entsprechen. MFAP4 der Milz wird sowohl lokal, als auch systemisch produziert, wobei beide Produktionsorte den Ausfall des jeweils anderen vollständig kompensieren können. Bei der Wachstumsregulation der Milz durch MFAP4 besteht ein dualer Mechanismus: Unter homöostatischen Bedingungen beeinflusst MFAP4 die Entwicklung während der Ontogenese nicht. Während des Wachstums im adulten Organismus hingegen ist es für die vollständige Ausbildung des FDC-Netzwerkes verantwortlich und reguliert die Anzahl der FDCs, wobei die B-Zell-Proliferation nicht beeinflusst wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Das microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) ist ein Protein der extrazellulären Matrix, dessen Funktion in dem Entwicklungsprozess von sekundär lymphatischem Gewebe bisher unbekannt ist. Ontogenetisch entstandene Milzen und Milzregenerate aus avaskulären Milztransplantationen 8 Wochen post transplantationem wurden verwendet, um den Einfluss von MFAP4 auf die Entwicklung der Milz sowohl während der Ontogenese, als auch im adulten Organismus mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, morphometrischer Analyse und real-time RT-PCR zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte erstmals die genaue Lokalisation von MFAP4 in den Kompartimenten und Strukturen der Milz beschrieben werden. Zusätzlich zu der bekannten Expression in der Kapsel und der Trabekelgefäße konnte nun eine Co-Lokalisation mit Laminin in der Basalmembran des conduit systems der Follikel und der T-Zell-Zone gezeigt werden. Erstmals konnte zudem gezeigt werden, dass Milzregenerate auch auf EZM-Ebene ontogenetisch entstandenen Milzen entsprechen. MFAP4 wird von milzresidenten Zellen, am ehesten von Fibroblastischen Retikulumzellen, produziert, kann aber auch von extern in das Organ importiert werden. Hinweise für einen Export aus der Milz bestehen nicht. Fehlt MFAP4 während der Ontogenese ist die Entwicklung der Milz nicht beeinflusst. Fehlt MFAP4 während der Entstehung im adulten Organismus ist die Dichte des FDC-Netzwerkes signifikant reduziert bei sonst unverändertem Regenerationsprozess. Dieses Defizit kann durch einen Import von MFAP4 aus dem Empfängerorganismus ausgeglichen werden. MFAP4 gehört somit zu den Wachstumsfaktoren mit einer unterschiedlichen Funktion zu unterschiedlichen Entstehungszeitpunkten sekundär lymphatischer Gewebe: Es reguliert die Ausbildung des FDC-Netzwerkes im adulten Organismus, nicht aber in der Ontogenese.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen CDC, Okada T, and Cyster JG. 2007. Germinal center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27:190-202.

Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, and Cyster JG. 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406:309-314.

Aziz-Seible RS, and Casey CA. 2011. Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 17:2482-2499.

Bajénoff M, and Germain RN. 2009. B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood* 114:4989-4997.

Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, and Germain RN. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25:989-1001.

Bajénoff M, Glaichenhaus N, and Germain RN. 2008. Fibroblast reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol* 181:3947-3954.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, and Szakal AK. 2001. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. *Cell Immunol* 214:45-53.

Basso K, and Dalla-Favera R. 2012. Roles of bcl6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* 147:172-183.

Batista FD, and Harwood NE. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9:15-27.

Bendelac A, Bonneville M, and Kearney JF. 2001. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1:177-186.

Brafman DA, Phung C, Kumar N, and Willert K. 2013. Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions. *Cell Death Differ* 20:369-381.

Braga AA, Malagó R, Anacleto TP, da Silva CRN, Andreollo NA, and Fernandes FLF. 2012. Histological aspects of autologous transplantation of different fragments of the spleen in rats. *Acta Cir Bras* 27:880-884.

- Castagnaro L, Lenti E, Maruzzelli S, Spinardi L, Migilori E, Farinello D, Sitia G, Harrelson Z, Evans SM, Guidotti LG, Harvey RP, and Brendolan A. 2013.** Nkx2-5+Islet1+ mesenchymal precursors generate distinct spleen stromal cell subsets and participate in restoring stromal network integrity. *Immunity* 38:782-791.
- Cerutti A, Cols M, and Puga I. 2013.** Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13:118-132.
- Cesta MF. 2006.** Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 34:455-465.
- Chan TD, and Brink R. 2012.** Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol Rev* 247:11-23.
- Cinamon G, Matloubian M, Lesneki MJ, Xu Y, Low C, Lu T, Proia RL, and Cyster JG. 2004.** Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5:713-720.
- Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, and Cyster JG. 2008.** Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9:54-62.
- Claassen E, Ott A, Boersma WJA, Deen C, Schellekens MM, Dijkstra CD, Kors N, and van Rooijen N. 1989.** 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* 77:445-451.
- Daub JT, and Merks RMH. 2013.** A cell-based model of extracellular-matrix-guided endothelial cell migration during angiogenesis. *Bull Math Biol* 75:1377-1399.
- del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, and Lacerda MVG. 2012.** The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol* 14:343-355.
- den Haan JMM, and Kraal G. 2012.** Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun* 4:437-445.
- Depoil D, Zaru R, Guiraud M, Chauveau A, Harriague J, Bismuth G, Utzny C, Müller S, and Valitutti S. 2005.** Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 22:185-194.
- Dijkstra CD, and Döpp EA. 1983.** Ontogenetic development of T- and B-lymphocytes and non-lymphoid cells in the white pulp of rat spleen. *Cell Tissue Res* 229:351-363.

- Dijkstra CD, and Langevoort HL. 1982.** Regeneration of splenic tissue after autologous subcutaneous implantation: development of non-lymphoid cells in the white pulp of the rat spleen. *Cell Tissue Res* 222:69-79.
- Dijkstra CD, Döpp EA, and Langevoort HL. 1983.** Regeneration of splenic tissue after autologous subcutaneous implantation: homing of T- B- and Ia-positive cells in the white pulp of the rat spleen. *Cell tissue Res* 229:97-107.
- Dummer W, Ernst B, LeRoy E, Lee DS, and Surh CD. 2001.** Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J Immunol* 166:2460-2468.
- El Shikh MEM, and Pitzalis C. 2012.** Follicular dendritic cells in health and disease. *Front Immunol* 292:1-18.
- El Shikh MEM, El Sayed RM, Szakal AK, and Tew JG. 2009.** T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. *J Immunol* 182:3482-3491.
- Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, and Tarlinton DM. 2008.** Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Sem Immunol* 20:49-58.
- Ferguson AR, Youd ME, and Corley RB. 2004.** Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16:1411-1422.
- Fitzmaurice M, Bordagaray JO, Engelmann GL, Richards-Kortum R, Kolubayev T, Feld MS, Ratliff NB, and Kramer JR. 1989.** Argon ion laser-excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies. *Am Heart J* 118:1028-1038.
- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, and Aderem A. 2004.** Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917-921.
- Furuichi H, Yamashita K, Okada M, Toyoshima T, Hata Y, Suzuki S, Itano T, Shishibori T, Tokumitsu H, and Kobayashi R. 2000.** Identification of Tranilast-binding protein of 36-kDa microfibril-associated glycoprotein by drug affinity chromatography, and its localization in human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 270:1002-1008.
- Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, and Pfeffer K. 1998.** The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9:59-70.

- Gokudan S, Muta T, Tsuda R, Koori K, Kawahara T, Seki N, Mizunoe Y, Wai SN, Iwanaga S, and Kawabata SI. 1999.** Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10086-10091.
- Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, Hildner M, Radke D, Beer M, Spanbroek R, Lippert B, Reardon CA, Getz GS, Fu YX, Hehlgans T, Mebius RE, van der Wall M, Kruspe D, Englert C, Lovas A, Hu D, Randolph GJ, Weih F, and Hebenicht AJR. 2009.** Lymphotoxin β receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med* 206:233-248.
- Gretz JE, Anderson AO, and Shaw S. 1997.** Cords channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in lymph node cortex. *Immunol Rev* 156:11-24.
- Gualde N, and Harizi H. 2004.** Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity. *Immunol Cell Biol* 82:353-360.
- Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz É, Felföldi B, and Oláh I. 2003.** Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida Meleagris*). *Cell Tissue Res* 312:333-343.
- Hanington PC, and Zhang SM. 2011.** The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *J Innate Immun* 3:17-27.
- Hanington PC, Forys MA, and Loker ES. 2012.** A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1591.
- Hayakawa M, Kobayashi M, and Hashino T. 1990.** Microfibrils: a constitutive component of reticular fibers in the mouse lymph node. *Cell Tissue Res* 262:199-201.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, and Locksley RM. 1989.** Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J Exp Med* 169:59-72.
- Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, and Myers B. 2012.** Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanism. *Braz J Med Biol Res* 45:292-298.
- Hey YY, and O'Neill HC. 2012.** Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *J Cell Mol Med* 16:2611-2619. 2012.

- Hiroaki S, Yukio Y, Sumoi W, Junko T, Hiroyuki K, and Toschihiko N. 1988.** Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *Am J Anat* 181: 235-252.
- Hirose H, Ozsvath KJ, Xia S, and Tilson MD. 1997.** Molecular cloning of the complementary DNA for an additional member of the family of aortic aneurysm antigenic proteins. *J Vasc Surg* 26:313-318.
- Hirose H, Ozsvath KJ, Xia S, Gaetz HP, and Tilson MD. 1998.** Immunoreactivity of adventitial matrix fibrils of normal and aneurysmal abdominal aorta with antibodies against vitronectin and fibrinogen. *Pathobiol* 66:1-4.
- Holm AT, Wulf-Johansson H, Hvidsten S, Jorgensen PT, Schlosser A, Pilecki B, Ormhøj M, Moeller JB, Johannsen C, Baun C, Andersen T, Schneider JP, Hegermann J, Ochs M, Götz AA, Schulz H, de Angelis MH, Vestbo J, Holmskov U, and Sorensen GL. 2015.** Characterization of spontaneous air space enlargement in mice lacking microfibrillar-associated protein 4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308:L1114-24.
- Hwang JK, Alt FW, and Yeap LS. 2015.** Related mechanisms of antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Microbiol Spectr* 3:MDNA3-0037-2014.
- Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, and Paus R. 2005.** Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol. *FASEB J* 19:1332-1334.
- JG, Cyster. 2010.** B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat immunol* 11:989-996.
- Johnson J, and Weiss L. 1989.** Electron microscopic study of subcutaneous and intraperitoneal splenules in the mouse. *Am J Anat* 185:89-100.
- Junt T, Scandella E, and Ludewig B. 2008.** Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* 8:764–775.
- Kapasi ZF, Burton GF, Schultz LD, Tew JG, and Szakal AK. 1993.** Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice: influence of B and T cells. *J Immunol* 150:2648-2658.
- Kasamatsu S, Hachiya A, Fujimura T, Sriwiriyanont P, Haketa K, Visscher MO, Kitzmiller WJ, Bello A, Kitahara T, Kobinger GP, and Takema Y. 2011.** Essential role of microfibrillar-associated protein 4 in human cutaneous homeostasis and in its photoprotection. *Sci Rep* 1:1-10.

- Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, and Shimizu A. 2004.** Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 200:783-795.
- Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, and Kikutani H. 1994.** The immune response in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
- Kewley MA, Steven FS, and Williams G. 1977.** Immunfluorescence studies with a specific antiserum to the microfibrillar protein of elastic fibres. *Immunology* 33:381-386.
- Khanolkar A, Fuller MJ, and Zajac AJ. 2002.** T cell response to viral infections. Lessons from lymphocytic choriomeningitis virus. *Immunol Res* 26:309-321.
- Kilpatrick DC, and Chalmers JD. 2012.** Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance. *J Biomed Biotechnol* 2012:138797.
- Klaperski K. 2006.** Die Bedeutung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors und Lymphotoxin-beta-Rezeptors bei der Entstehung lymphatischen Gewebes im adulten Organismus: Eine quantitative Analyse der Milzstruktur bei der Maus. *Med. Diss. Lübeck.*
- Knutson M, and Wessling-Resnick M. 2003.** Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:61-88.
- Kobayashi R, Mizutani, and Hidaka H. 1994.** Isolation and characterization of a 36-kDa microfibril-associated glycoprotein by the newly synthesized isoquinolinesulfinamide affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 198:1262-1666.
- Koni PA, and Flavell RA. 1999.** Lymph node germinal centers form in the absence of follicular dendritic cell networks. *J Exp Med* 189:855-864.
- Koning JJ, and Mebius RE. 2012.** Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends Immunol* 33:264-270.
- Kranich J, Krautler NJ, Heinen E, Polymenidou M, Bridel C, Schildknecht A, Huber C, Kosco-Vilbois MH, Zinkernagel R, Miele G, and Aguzzi A. 2008.** Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J Exp Med* 205:1293-1302.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, and Moestrup SK. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201.

Lausen M, Lynch N, Schlosser A, Tornøe I, Gjørup Saekmose S, Teisner B, Willis AC, Crouch E, Schwaeble W, and Holmskov U. 1999. Microfibril-associated protein 4 is present in lung washings and binds to the collagen region of lung surfactant protein D. *J Biol Chem* 274:32234-32240.

Lee CJ, Lee LH, and Frasch CE. 2003. Protective immunity of pneumococcal glycoconjugates. *Crit Rev Microbiol* 29:333-349.

Leemans R, Harms G, Rijkers GT, and Timens W. 1999. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 117:596-604.

Leitner W, Bergmann ES, and Thalhamer J. 1994. Regeneration of splenic stromal elements. *Res Exp Med* 194:221-230.

Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, and Luther S. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 8:1255-1265.

Liu X, Nurieva RI, and Dong C. 2013. Transcriptional regulation of follicular T-helper (T_{fh}) cells. *Immunol Rev* 252:139-145.

Lo CG, Lu TT, and Cyster JG. 2003. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. *J Exp Med* 197:353-361.

Löffler G, and Petrides PE. 7. Auflage 2003. Biochemie & Pathobiochemie. *Berlin Heidelberg : Springer-Verlag*

Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, and Sorokin L. 2008. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Sem Immunol* 20:4-13.

Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, Collier A, and Turley SJ. 2011. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* 12:1096-1104.

Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, daSilva LC, Kelsoe G, Papadimitriou JC, and Handwerker BS. 2001. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *J Leukoc Biol* 70:578-584.

- M, Tavassoli. 1975.** Limitation of splenic growth as studied by heterotopic splenic implants. *Blood* 46:631-635.
- Maesawa C, and Sakuma T. 1992.** Microscopic features of the regeneration of white pulp in autotransplanted spleens in rats. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 421:41-45.
- Malhotra D, Fletcher AL, and Turley SJ. 2013.** Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol Rev* 251:160-176.
- Marques RG, Petroianu Y, and Coelho JMC de O. 2003.** Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. *Braz J Biol* 63:491-495.
- Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M, and Bachmann MF. 2005.** CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22:493-505.
- Mebius RE. 2007.** Lymphoid organogenesis educating stroma. *Immunol Cell Biol* 85:79-80.
- Mebius RE, and Kraal G. 2005.** Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5:606-616.
- Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, Acha-Orbea H, and Finke D. 2007.** Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 26:643-654.
- Metcalf D. 1963.** Spleen graft growth in splenectomised mice. *Austral J Exp Biol* 41:51-60.
- Metcalf D, and Wakonig-Vaartaja R. 1964.** Host-cell repopulation of normal spleen graft. *Lancet* 1:1012-1014.
- Milićević NM, Klaperski K, Nohroudi K, Milićević Z, Bieber K, Baraniec B, Blessenohl M, Kalies K, Ware CF, and Westermann J. 2011.** TNF receptor-1 is required for the formation of splenic compartments during adult, but not embryonic life. *J Immunol* 186:1486-1494.
- Mölleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, Warscheid B, Broelsch C, Reiser M, Friedmann SL, Tornøe I, Schlosser A, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Holmskov U, and Stühler K. 2009.** Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology* 49:1257-1266.
- Mueller SN, and Germain RN. 2009.** Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:618-629.

Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, Sharpe AH, Freeman GJ, Gangappa S, Larsen CP, and Ahmed R. 2007. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15430-15435.

Murakami T, Chen X, Hase K, Sakamoto A, Nishigaki C, and Ohno H. 2007. Splenic CD19-CD35+B220+ cells function as an inducer of follicular dendritic cell network formation. *Blood* 110:1215-1224.

Murphy K, Travers P, and Walport M. 7. Auflage 2009. Janeway Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

N, Palaniyar. 2010. Antibody equivalent molecules of the innate immune system: parallels between innate and adaptive immune proteins. *Innate Immun* 16:131-137.

Neyt K, Perros F, Geurts van Kessel CH, Hammad H, and Lambrecht BN. 2012. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol* 33:297-305.

Ngo VN, Cornall RJ, and Cyster JG. 2001. Splenic T zone development is B cell dependent. *J Exp Med* 194:1649-1660.

Niu D, Peatman E, Liu H, Lu J, Kucuktas H, Liu S, Sun F, Zhang H, Feng T, Zhou Z, Terhune J, Waldbieser G, Li J, and Liu Z. 2011. Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) genes in catfish play a novel role in innate immune responses. *Dev Comp Immunol* 35:568-579.

Nohroudi K. 2005. Bedeutung des Lymphotoxin- β -Rezeptors für die Bildung von lymphatischem Gewebe im adulten Organismus am Modell der avaskulären Milztransplantation. *Tech.-Nat. Diss. Lübeck.*

Nolte MA, Belien JAM, Schadee-Estermans I, Jansen W, Unger WWJ, van Rooijen N, Kraal G, and Mebius RE. 2003. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J Exp Med* 198:505-512.

Nutt SL, and Tarlinton DM. 2011. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12:472-477.

Omim #182290. <http://www.omim.org/entry/182290>. Stand 12.05.2016.

Omim #600596. <http://www.omim.org/entry/600596>. Stand 12.05.2016.

Pabst R, and Kamran D. 1986. Autotransplantation of splenic tissue. *J Pediatr Surg* 21:120-124.

- Pabst R, Westermann J, and Rothkötter HJ. 1991.** Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants. *Int Rev Cytol* 128:215-260.
- Peón AN, Espinoza-Jiménez A, and Terrazas LI. 2013.** Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res Int* 2013:498583.
- Pereira JP, Kelly LM, and Cyster JG. 2010.** Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol* 622:413-419.
- Pilecki B, Holm AT, Schlosser A, Moeller JB, Wohl AP, Zuk AV, Heumüller SE, Wallis R, Moestrup SK, Sengle G, Holmskov U, and Sorensen GL. 2016.** Characterization of Microfibrillar-associated Protein 4 (MFAP4) as a Tropoelastin- and Fibrillin-binding Protein Involved in Elastic Fiber Formation. *J Biol Chem* 291:1103-1114.
- Pilecki B, Holm AT, Schlosser A, Moeller JB, Wohl AP, Zuk AV, Heumueller SE, Walls R, Moestrup SK, Sengle G, Holmskov U and Sorensen GL. 2015.** Microfibrillar-associated protein 4 modulates airway smooth muscle cell phenotype in experimental asthma. *Thorax* 70:862-872.
- Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, Patel PJ, Al-Qahtani, Zan H, Xu Z, and Casali P. 2012.** BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun* 3:1-12.
- Py BF, Gonzalez SF, Long K, Kim MS, Kim YA, Zhu H, Yao J, Degauque N, Villet R, Ymele-Leki P, Gadjeva M, Pier GB, Carroll MC, and Yuan J. 2013.** Cochlin produced by follicular dendritic cells promotes antibacterial innate immunity. *Immunity* 38:1063-1072.
- Rebres RA, McKeown-Longo PJ, Vincent PA, Cho E, and Saba TM. 1995.** Extracellular matrix incorporation of normal and NEM-alkylated fibronectin: liver and spleen deposition. *Am J Physiol* 269:G902-G912.
- Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R, and Cyster JG. 2002.** Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416:94-99.
- Rezk SA, Nathwani BN, Zhao X, and Weiss LM. 2013.** Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Human Pathology* 44:937-950.
- Roosendaal R, and Mebius RE. 2011.** Stromal cell-immune cell interactions. *Annu Rev Immunol* 29:23-43.

Ruoslathi E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697-715.

Sacks D, and Trauth NN. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858.

Sækmoose SG, Mössner B, Christensen PB, Lindvig K, Schlosser A, Holst R, Barington T, Holmskov U, and Sorensen GL. 2015. Microfibrillar-associated protein 4: a potential biomarker for screening for liver fibrosis in a mixed patient cohort. *PLoS One* 10:e0140418.

Sækmoose SG, Schlosser A, Holst R, Johansson SL, Wulf-Johansson H, Tornøe I, Vestbo J, Kyvik KO, Barington T, Holmskov U, and Sorensen GL. 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay characterization of basal variation and heritability of systemic microfibrillar-associated protein 4. *PLoS One* 8:e82383.

Saito H, Yokoi Y, Watanabe S, Tajima J, Kuroda H, and Namihisa T. 1988. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *Am J Anat* 181:235-252.

Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, de la Rosa G, Puig-Kröger A, Garcia-Bordas J, Martin D, Longo N, Cuadrado A, Cabanas C, Corbi AL, Sánchez-Matros P, and Rodríguez-Fernández JL. 2004. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 104:619-625.

Scandella E, Bolinger B, Lattmann E, Miller S, Favre S, Littman DR, Finke D, Luther SA, Junt T, and Ludewig B. 2008. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol* 9:667-675.

Schlosser A, Pilecki B, Hemstra LE, Kejling K, Kristmannsdóttir GB, Wulf-Johansson H, Moeller JB, Füchtbauer EM, Nielsen O, Kirketerp-Møller K, Dubey LK, Hansen PB, Stubbe J, Wrede C, Hegermann J, Ochs M, Rathkolb B, Schrewe A, Bekeredjian R, Wolf E, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Lindholt JS, Holmskov U, and Sorensen GL. 2016. MFAP4 promotes vascular smooth muscle migration, proliferation and accelerates neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:122-133.

Schlosser A, Thomsen T, Shipley JM, Hein PW, Barsch F, Tornøe I, Nielsen O, Skjodt K, Palaniyar N, Steinhilber W, McCormack FX, and Holmskov U. 2006. Microfibrillar-associated protein 4 binds to surfactant protein A (SP-A) and colocalizes with SP-A in the extracellular matrix of the lung. *Scand J Immunol* 64:104-116.

Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, Dustin ML, and Nussenzweig MC. 2011. A dynamic T cell-limited checkpoint

regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med* 208:1243-1252.

Shapiro-Shelef M, and Calame K. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5:230-242.

Shlomchik MJ, and Weisel F. 2012. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* 247:52-63.

Siegert S, and Luther SA. 2012. Positive and negative regulation of T cell response by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front Immunol* 3:285.

Singh P, and Schwarzbauer JE. 2012. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci* 125:3703-3712.

Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, and Sorokin L. 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22:19-29.

Sobocinski GP, Toy K, Bobrowski WF, Shaw S, Anderson AO, and Kaldjian EP. 2010. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. *BMC Immunol* 42:1-11.

Tangye SG, Ma CS, Brink R, and Deenick EK. 2013. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 13:412-426.

Teesalu T, Sugahara KN, and Ruoslahti E. 2013. Tumor-penetrating peptides. *Front Oncol* 3:1-8.

Tilson MD, Ozsvath KJ, Hirose H, Xia S, and Lahita R. 1996. a novel hypothesis to explain the hemorrhagic and connective tissue manifestations of ebola virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 81:303-306.

Tojo A, Kinugasa S, Fujita T2, and Wilcox CS3. 2016. A local renal renin-angiotensin system activation via renal uptake of prorenin and angiotensinogen in diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr Obes* 18:1-10.

Toyoshima T, Ishida T, Nishi N, Kobayashi R, Nakamura T, and Itano T. 2008. Differential gene expression of 36-kDa microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36/MFAP4) in rat organs. *Cell Tissue Res* 332:271-278.

- Toyoshima T, Nishi N, Kusama H, Kobayashi R, and Itano T. 2005.** 36-kDa microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36) is an elastin-binding protein increased in chick aortae during development and growth. *Exp Cell Res* 307:224-230.
- Toyoshima T, Yamashita K, Furuichi H, Shishibori T, Itano T, and Kobayashi R. 1999.** Ultrastructural distribution of 36-kD microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36) in human and bovine tissue. *J Histochem Cytochem* 47:1049-1056.
- van de Pavert SA, Olivier BJ, Goverse G, Vondenhoff MF, Greuter M, Beke P, Kusser K, Höpken UE, Lipp M, Niederreither K, Blomhoff R, Sitnik K, Agace WW, Randall TD, de Jonge WJ, and Mebius RE. 2009.** Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat Immunol* 10:1193-1199.
- van Nierop K, and de Groot C. 2002.** Human follicular dendritic cells: function origin and development. *Immunology* 14:251-257.
- van Vliet E, Melis M, Foidart JM, and van Ewijk W. 1985.** Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *JHC* 34:883-890.
- Victoria GD, and Nussenzweig MC. 2012.** Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30:429-457.
- Vinuesa CG, and Chang PP. 2013.** Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol* 14:119-126.
- Wang X, Cho B, Suzuki K, Xu Y, Green JA, An J, and Cyster JG. 2011.** Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 108:2497-2510.
- Ware CF. 2005.** Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 23:787-819.
- Weber M, Hauschild R, Schwarz J, Moussion C, de Vries I, Legler DF, Luther SA, Bollenbach T, and Sixt M. 2013.** Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339:328-332.
- Welsch U. 2. Auflage 2006.** Lehrbuch Histologie - Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.
- Westermann J, and Pabst R. 1997.** Autotransplantation of the spleen in the rat: donor leukocytes of the splenic fragment survive implantation to migrate and proliferate in the host. *Cell Tissue Res* 287:357-364.
- . **1988.** Malaria infection in rats with stimulated splenic red pulp: the blood flow and protective effect in normal and transplanted tissue. *Res Exp Med* 188:267-276.

Westermann J, Pabst R, and Claassen E. 1991. Histophysiology of autotransplanted splenic tissue. *Res Immunol* 142:321-325.

Westermann J, Peschel P, and Pabst R. 1988. Immunoarchitecture of regenerated splenic transplants: influence of donor and host age on the regeneration of splenic compartments. *Cell Tissue Res* 254:403-413.

Wilke G, Steinhauser G, Grün J, and Berek C. 2010. In silico subtraction approach reveals a close lineage relationship between follicular dendritic cells and BP3hi stromal cells isolated from SCID mice. *Eur J Immunol* 40:2165-2173.

Woodley DT, Keene DR, Atha T, Huang Y, Lipman K, Li W, and Chen M. 2004. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Med* 10:693-695.

Wulf-Johansson H, Lock Johansson S, Schlosser A, Trommelholt Holm A, Rasmussen LM, Mickley H, Diederichsen AC, Munkholm H, Poulsen TS, Tornøe I, Nielsen V, Marcussen N, Vestbo J, Sækmosé SG, Holmskov U, and Sorensen GL. 2013. Localization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) in human tissues: clinical evaluation of serum MFAP4 and its association with various cardiovascular conditions. *PLoS One* 8:e82243.

Yoshino T, Kondo E, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, and Akagi T 1994. Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* 83:1856-1861.

Yurdakul P, Dalton J, Beattie L, Brown N, Erguven S, Maroof A, and Kaye PM. 2011. Compartment-specific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. *Am J Pathol* 179:23-29.

Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, and Lodish HF. 2006. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12:240-245.

Zhao Z, Lee CC, Jiralerspong S, Juyal RC, Lu F, Baldini A, Greenberg F, Caskey CT, and Patel PI. 1995. The gene for a human microfibril-associated glycoprotein is commonly deleted in Smith-Magenis syndrome patients. *Hum Mol Genet* 4:589-597.

Zotos D, and Tarlinton DM. 2012. Determining germinal centre B cell fate. *Trans Immunol* 33:281-288.

ANHANG

Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analyse von Regeneraten aus gekreuzten Transplantationen (KO→WT und WT→KO)

Neben den Regeneraten aus ungekreuzten Transplantationen wurden auch die Regenerate aus gekreuzten Transplantationen immunhistochemisch zur Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen und Strukturen gefärbt und qualitativ sowie quantitativ in gleicher Weise, wie die anderen Organe zuvor, analysiert.

Gewicht und histologische Struktur

Makroskopisch war nach der Organentnahme kein Unterschied zwischen Regeneraten aus WT→WT und beiden gekreuzten Transplantationen zu erkennen und auch das Gewicht unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (Abb. I).

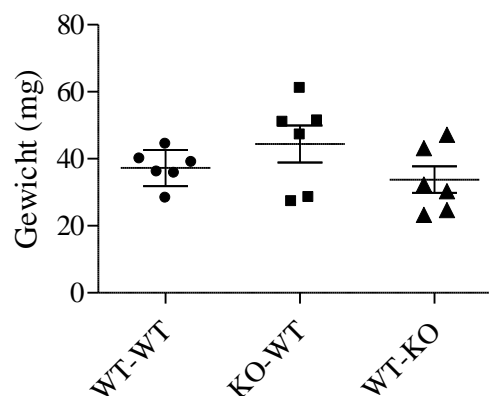


Abb. I: Das Gewicht der Regenerate aus WT→WT Transplantationen und den gekreuzten Transplantationen unterscheidet sich nicht.

Gewicht der Milzregenerate 8 Wochen nach einer avaskulärer Transplantation (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=6)

In der Färbung der Makrophagen der roten Pulpa war in Regeneraten beider gekreuzter Transplantationen eine weiße Pulpa als Summe einzelner ungefärbter Areale, die vorwiegend in der Peripherie des Milzschnittes lokalisiert waren, gut von der roten Pulpa abzugrenzen (Abb. II). In beiden Gruppen entsprach der prozentuale Flächenanteil, den die rote und die weiße Pulpa einnahmen, denen der Regenerate aus WT→WT Transplantationen (Abb. II).

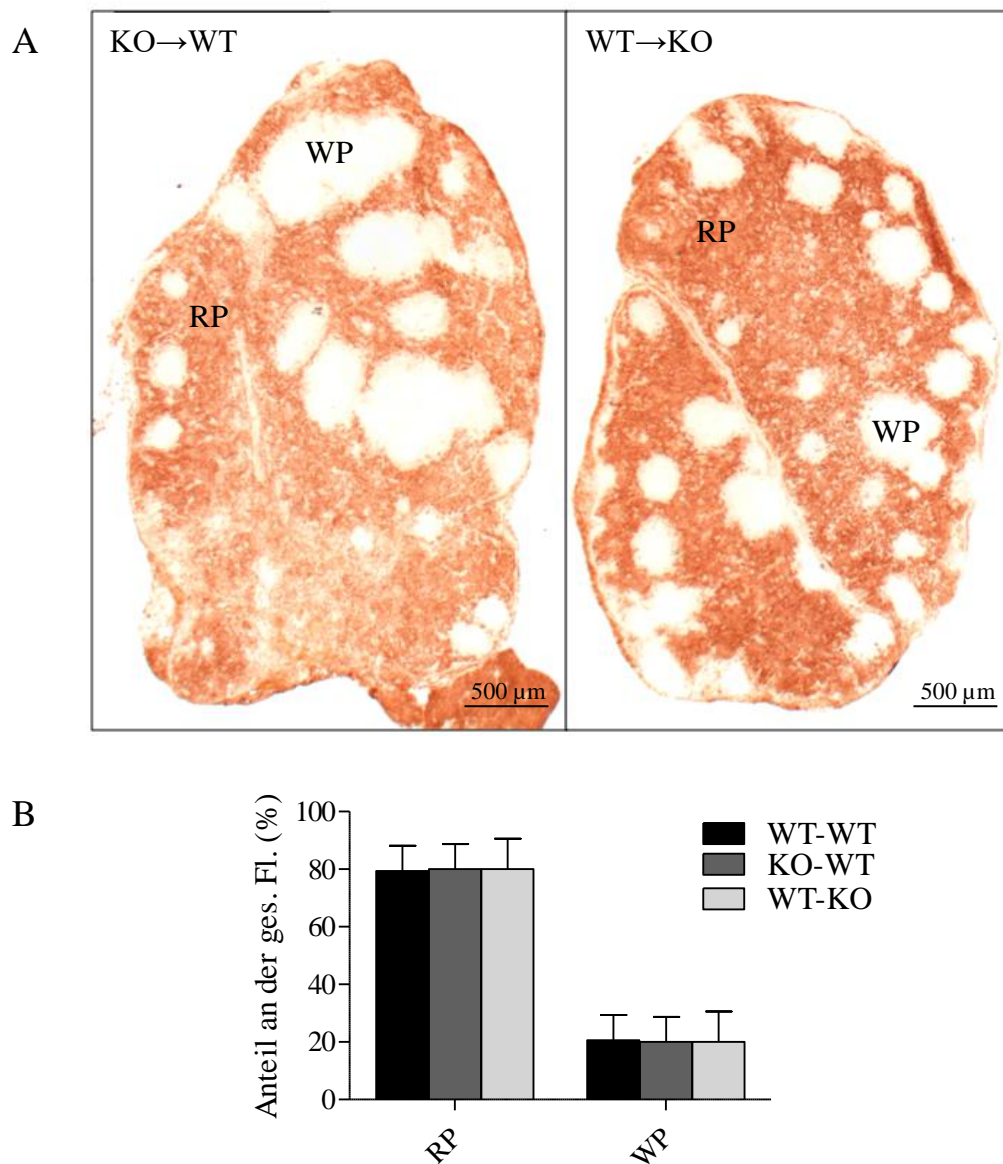


Abb. II: Die Anlage und Ausdehnung der roten und weißen Pulpa unterscheidet sich in Regeneraten aus WT→WT und den gekreuzten Transplantationen nicht.

A Immunhistochemische Darstellung der Makrophagen der roten Pulpa (F4/80) von Milzregeneraten aus KO→WT und WT→KO Transplantationen. *B* Quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der roten und weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

RP = rote Pulpa, WP = weiße Pulpa

Die Färbung zur Darstellung von MOMA-1⁺ Marginalzonenmakrophagen, B-Zellen und T-Zellen an unterschiedlichen Schnitten derselben Organe beider Transplantationsgruppen zeigte eine den WT→WT Regeneraten entsprechende Anlage der drei Kompartimente der weißen Pulpa (Abb. III). Mit einem Flächenanteil von ca. 15 % für die Follikel und jeweils ca. 5 % für MZ und TZZ entsprachen sie auch quantitativ den Kompartimenten in der weißen Pulpa von Regeneraten aus WT→WT Transplantationen (Abb. III).

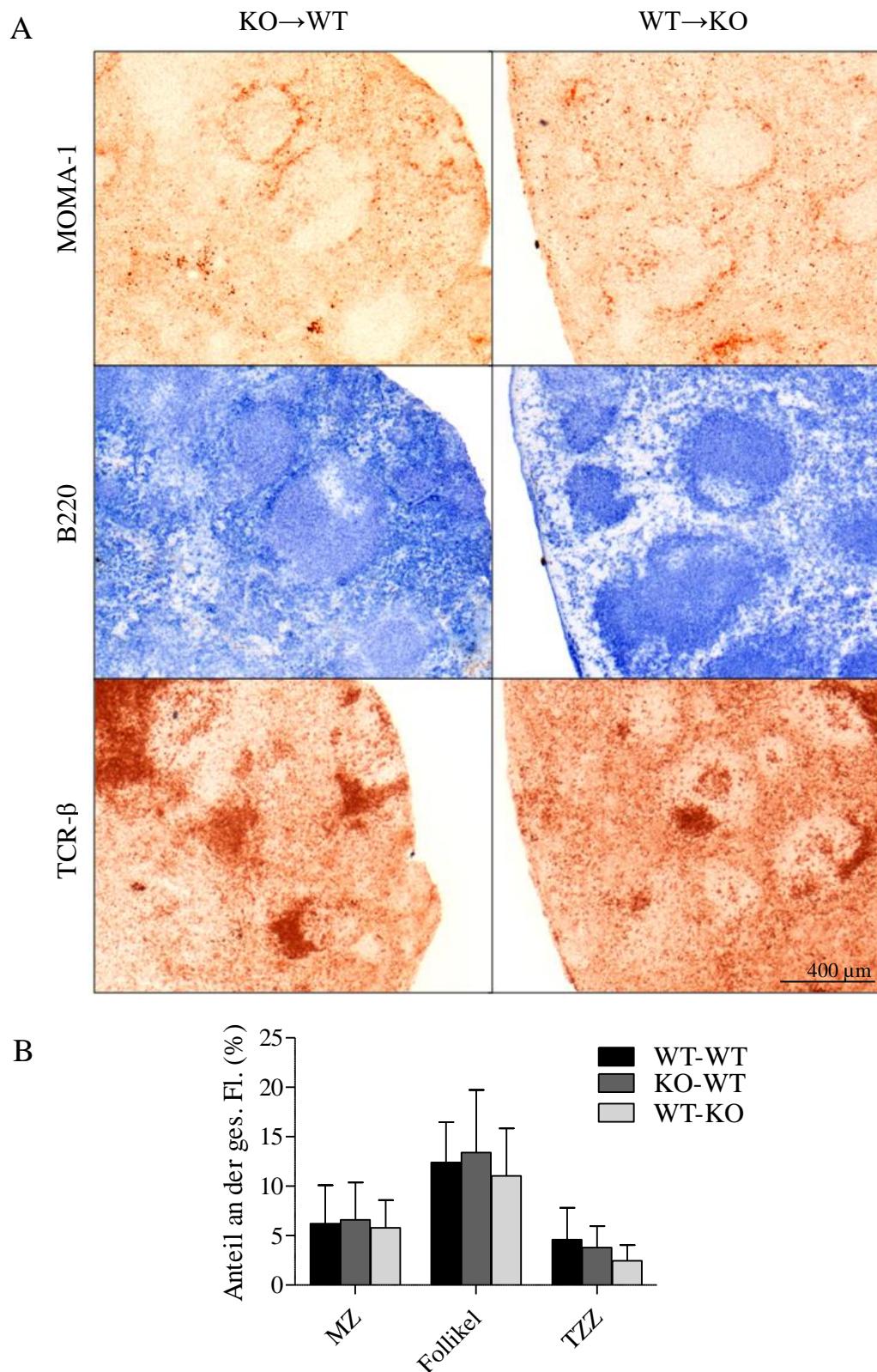


Abb. III: Die Anlage und Ausdehnung der einzelnen Kompartimente der weißen Pulpa unterscheidet sich nicht in den Regeneraten aus WT→WT und den gekreuzten Transplantationen.

A Immunhistochemische Darstellung von metallophilen Marginalzonenmakro-phagen (MOMA-1), B-Zellen (B220) und T-Zellen (TCR- β) an unterschiedlichen Schnitten derselben Milzregenerate aus KO→WT und WT→KO Transplantationen.

B Quantitative Darstellung der prozentualen Anteile der Kompartimente der weißen Pulpa an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

MZ = Marginalzone, TZZ = T-Zell-Zone

Keimzentrumszahl, Lymphozytenproliferation und Dichte des FDC-Netzwerkes

Auch in den Regeneraten der gekreuzten Transplantationen fand eine Ausbildung von Keimzentren in einem gleichen Umfang, wie in WT→WT Regeneraten statt, sodass sich kein Unterschied sowohl in der Anzahl, als auch der Fläche dieser Strukturen zwischen den Transplantationsgruppen herausstellte (Abb. IV).

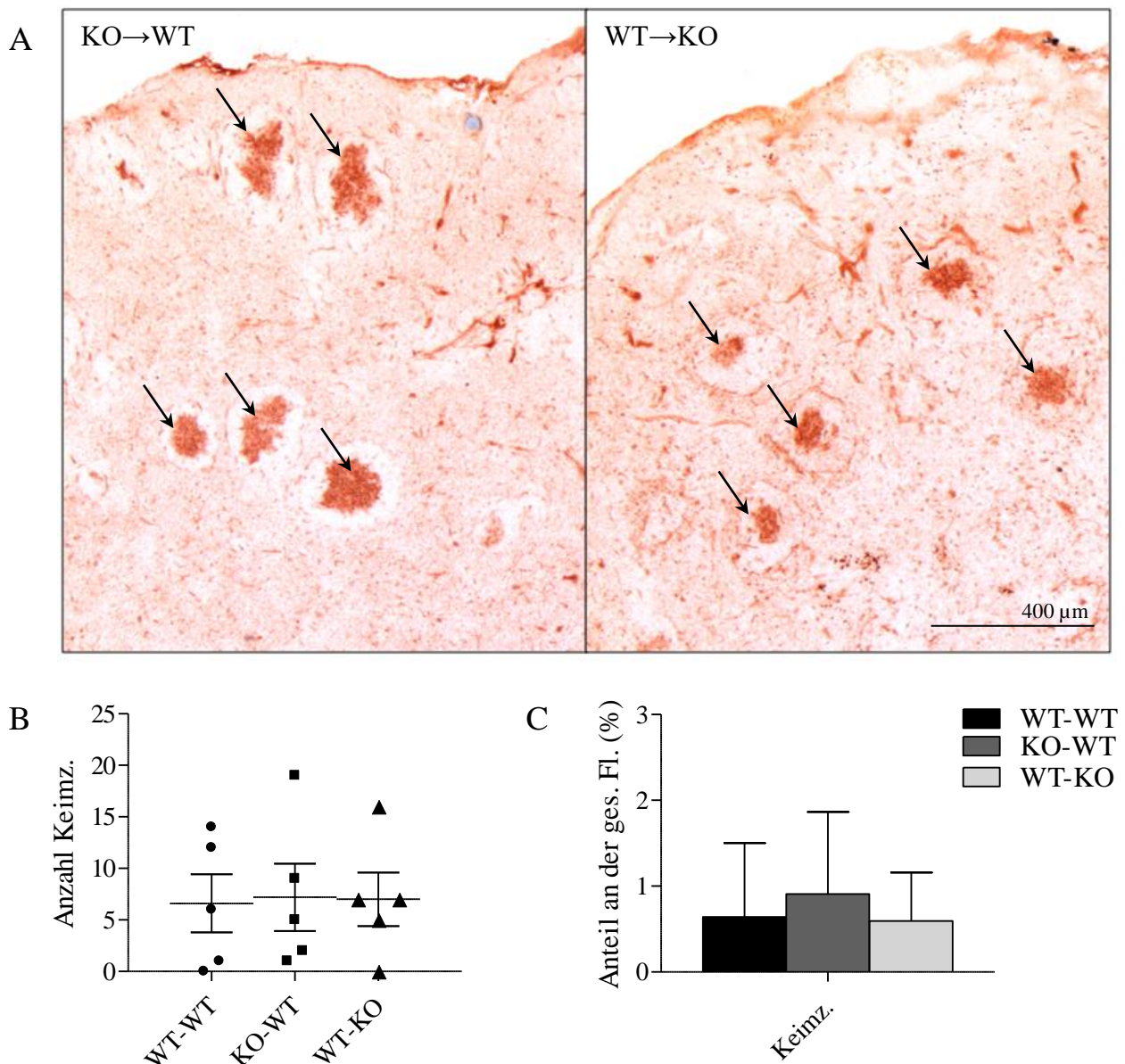


Abb. IV: Die Anzahl und Fläche der Keimzentren ist in den Regeneraten aus WT→WT und den gekreuzten Transplantationen gleich.

A Immunhistochemische Darstellung der Keimzentren (PNA) von Milzregeneraten aus KO→WT und WT→KO Transplantationen. Die Pfeile markieren Keimzentren. *B* Quantitative Darstellung der Anzahl der Keimzentren in den Schnitten (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5) *C* Quantitative Darstellung des prozentualen Anteils der Keimzentrumsfläche an der gesamten Schnittfläche (Mittelwert und Standardabweichung, n=5)

Keimz = Keimzentrum

Ebenso war die Proliferationsrate beider Lymphozytenpopulationen beim Fehlen von MFAP4 entweder lokal im Transplantat (KO→WT) oder systemisch im Empfänger (WT→KO) sowohl qualitativ, als auch quantitativ im Vergleich zu Regeneraten aus WT→WT Transplantationen unverändert (Abb. V).

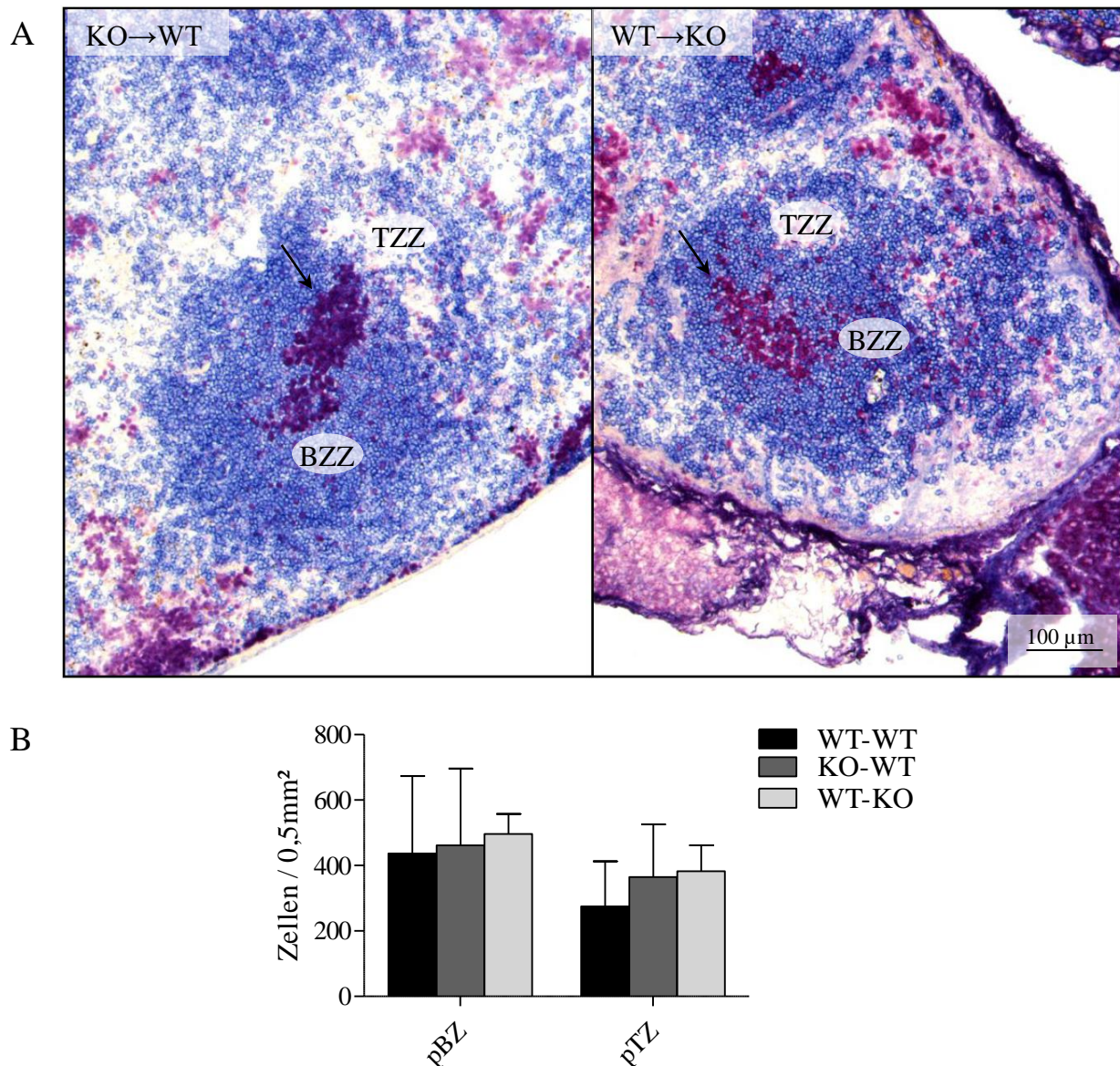


Abb. V: Die Dichte der proliferierenden B- und T-Zellen unterscheidet sich in den Regeneraten aus den gekreuzten Transplantationen nicht von Regeneraten aus WT→WT Transplantationen.

A Immunhistochemische Darstellung der proliferierenden Zellen (rot, TEC-3) und B-Zellen (blau, B220) von Milzregeneraten aus KO→WT und WT→KO Transplantationen. Die Pfeile markieren Keimzentren. *B* Quantitative Darstellung der Dichte proliferierender Zellen in der B-Zell-Zone und proliferierender T-Zellen in der T-Zell-Zone (Mittelwert und Standardabweichung, pTZ (WT→KO) n=4, andere n=5)
 BZZ = B-Zell-Zone, TZZ = T-Zell-Zone, pBZ = proliferierende B-Zellen, pTZ = proliferierende T-Zellen

In beiden Transplantationsgruppen waren die Anlage und die Dichte des FDC-Netzwerkes im Vergleich zu WT→WT Regeneraten nicht beeinträchtigt, sodass das in Regeneraten aus KO→KO Transplantationen beobachtete Defizit des FDC-Netzwerkes nicht mehr zu finden war, wenn MFAP4 entweder systemisch (KO→WT) oder lokal (WT→KO) exprimiert wurde (Abb. VI und VII).

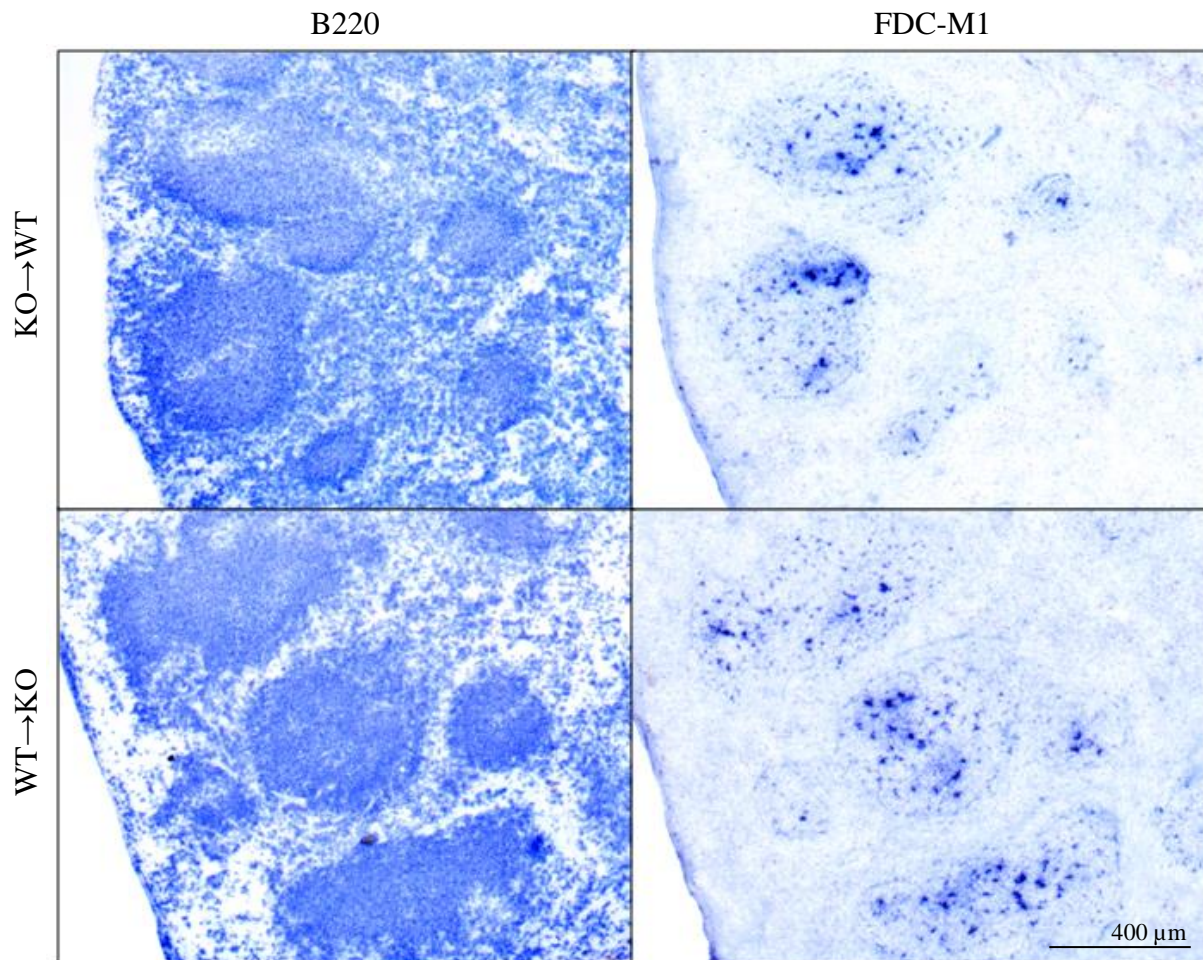


Abb. VI: In Regeneraten aus gekreuzten Transplantationen ist die Anlage und die Ausdehnung des FDC-Netzwerkes gleich.

Immunohistochemische Darstellung der B-Zellen (B220) und FDCs (FDC-M1) an unterschiedlichen Schnitten derselben Milzregenerate aus KO→WT und WT→KO Transplantationen.

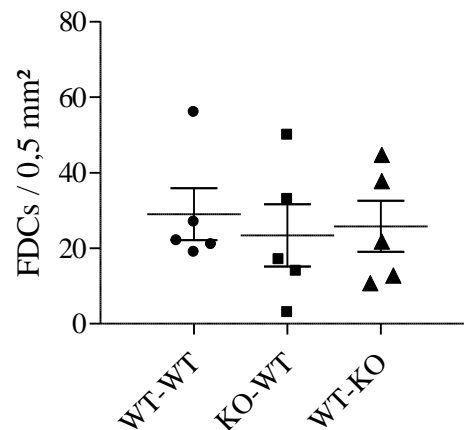


Abb. VII: Die Dichte des FDC-Netzwerkes unterscheidet sich in Regeneraten aus gekreuzten Transplantationen nicht von Regeneraten aus WT→WT Transplantationen.
Quantitativer Darstellung der Dichte der FDCs innerhalb der Fläche des FDC-Netzwerkes (Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung, n=5)
FDCs = follikulär dendritische Zellen

Wird MFAP4 nur im Transplantat oder nur im Empfängergewebe produziert, entwickeln sich die Regenerate in Bezug auf die Anlage und Ausdehnung der Kompartimente wie Regenerate aus WT→WT Transplantationen. Rote und weiße Pulpa können gut voneinander abgegrenzt werden und sie nehmen 80 % bzw. 20 % der Milzschnittfläche ein. Der Anteil der weißen Pulpa setzt sich in Regeneraten beider Transplantationsgruppen wie in WT→WT Regeneraten aus 15 % Follikeln und jeweils 5 % MZ und TZZ zusammen. Eine Immunantwort kann uneingeschränkt ablaufen und auch die Proliferationsrate wird durch das partielle Fehlen von MFAP4 im transplantierten Organismus nicht beeinträchtigt. Unter diesen Bedingungen ist zudem das beim kompletten Fehlen von MFAP4 auftretende Defizit in der Ausbildung des FDC-Netzwerkes nicht mehr vorhanden.

DANKSAGUNG

In erster Linie bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für das sichere Begleiten meiner ersten Schritte im wissenschaftlichen Arbeiten, die exzellente und geduldige Betreuung, die offenen und fairen Diskussionen von Fragen und Problemen und für die Auswahl einer mich fesselnden Themenstellung.

Für die Einarbeitung und die uneingeschränkten, kollegialen Hilfestellungen bei diversen Fragen und technischen Schwierigkeiten danke ich besonders PD Dr. rer. nat. Katrin Kalies, Prof. Dr. med. Peter König, Dr. rer. nat. Babett Baenitz und Dr. rer. nat. David Banczyk.

Für die hervorragende technische Assistenz sowie ausführliche und feinsinnige Einarbeitung in die Färbemethoden und PCR-Technik danke ich vor allem Lidija Gutjahr und Petra Lau.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie danke ich von Herzen für die vergangene Zeit, in der ich Teil des ausgezeichneten Arbeitsklimas und der äußerst kollegialen Zusammenarbeit sein durfte. Die Diskussionen und Interaktionen auch über fachliche Belange hinaus waren für mich aus wissenschaftlicher wie aus persönlicher Sicht eine Bereicherung.

Mein Dank gilt aus tiefstem Herzen meinen Eltern, ohne deren emotionale und finanzielle Unterstützung ich das Privileg, eine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen, nicht erlangt hätte. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung in diverser Art und das geduldige Ertragen und Tragen meiner Person während der Zeit der Doppelbelastung von Studium/Beruf und Doktorarbeit.

CURRICULUM VITAE

Friederike Schmidt, geb. 15.07.1988 in Bad Oldesloe



Schulische Ausbildung

1995 – 1999 Grund- und Hauptschule Sandesneben
 1999 – 2005 MINT Gymnasium Trittau
 2005 – 2006 St. Charles High School, St. Charles, MI, USA
 2006 – 2008 MINT Gymnasium Trittau
 Abschluss: Abitur (1,4)

Studium

2008 – 2015 Studium der Humanmedizin an der
 Universität zu Lübeck
 2010 1. Staatsexamen (2,5)
 2014 2. Staatsexamen (2,0)
 2015 3. Staatsexamen (sehr gut)
 Gesamtnote 2. und 3. Staatsexamen 1,83

Famulaturen

02/2011 – 03/2011 Lungenklinik Großhansdorf
 08/2011 Medizinische Klinik I, UK-SH Campus Lübeck: Nephrologie
 09/2011 – 10/2011 Klinik für Pulmologie, Universität der Rep. Moldau, Cişinău, Rep. Moldau
 07/2012 – 08/2012 Neurologie, UK-SH Campus Lübeck
 08/2012 Radiologische Praxis am Kaufhof, Lübeck
 09/2012 DRK-Krankenhaus Marli, Lübeck: Geriatrie
 02/2013 – 05/2013 Praxis Dr. med. R. Kilian, Lübeck: Gastroentero-/Diabeto-/Onkologie

Praktisches Jahr

05/2014 – 09/2014 Medizinische Klinik I, UK-SH Campus Lübeck: Gastroenterologie
 Medizinische Klinik I, UK-SH Campus Lübeck: Nephro-/Rheumatologie
 Medizinische Klinik III, UK-SH Campus Lübeck: Pulmo-/Infektiologie
 09/2014 – 12/2014 Allgemein- und Visceralchirurgie, UK-SH Campus Lübeck
 Orthopädie und Unfallchirurgie, UK-SH Campus Lübeck
 12/2014 – 04/2015 DRK-Krankenhaus Marli, Lübeck: Geriatrie

Berufsleben

Seit 08/2015 Assistenzärztin der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und
 Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Doktorarbeit

03/2012 – 07/2012 Themenfestlegung, Erarbeitung der theoretischen Grundlagen
 08/2012 – 05/2013 Laborarbeit, Versuche, Auswertung
 06/2013 – 01/2014 schriftliche Ausarbeitung, weitere Literaturrecherche
 01/2014 – 06/2015 Examenspausen und praktisches Jahr
 06/2015 – 02/2016 Fertigstellung der Publikation
 02/2016 – 06/2016 Abschluss der Arbeit

Publikationen

02/2016 Milicevic und Schmidt et al.: The role of microfibrillar-associated protein 4
 (MFAP4) in the formation and function of splenic compartments during
 embryonic and adult life. *Cell Tissue Res*
 unveröffentlicht Milicevic und Nohroudi et al.: Growth of the murine splenic tissue is
 suppressed by lymphotoxin-beta-receptor signaling (LT β R) from inside and
 outside.