

3 Ergebnisse

FDC sind Zellen mit einer dendritischen Morphologie, die als Subpopulation der BP3⁺ folliculären Stromazellen (engl.: *follicular stromal cells*, FSC)⁸⁻¹⁰ in der zentralen Region der B-Zone lokalisieren (Abb. 5C). Das Oberflächenprotein BP3 (Bst-1) ist ein Transmembranprotein mit Ektoenzym- und Adhäsion/Signaltransduktions-Eigenschaften^{66,67}. Eine Besonderheit, die FDC von den restlichen retikulären Zellen unterscheidet, ist die Expression des Komplementrezeptor-Komplexes CD21/CD35 zur Präsentation von unprozessiertem Antigen (Abb. 5A). Darüberhinaus unterscheiden sich FDC immunhistologisch durch die Markierung mit dem monoklonale Antikörper FDC-M2 (Abb. 5B). Als Antigen von FDC-M2 wurde der Komplementfaktor C4 in Immunkomplexen identifiziert⁶⁸.

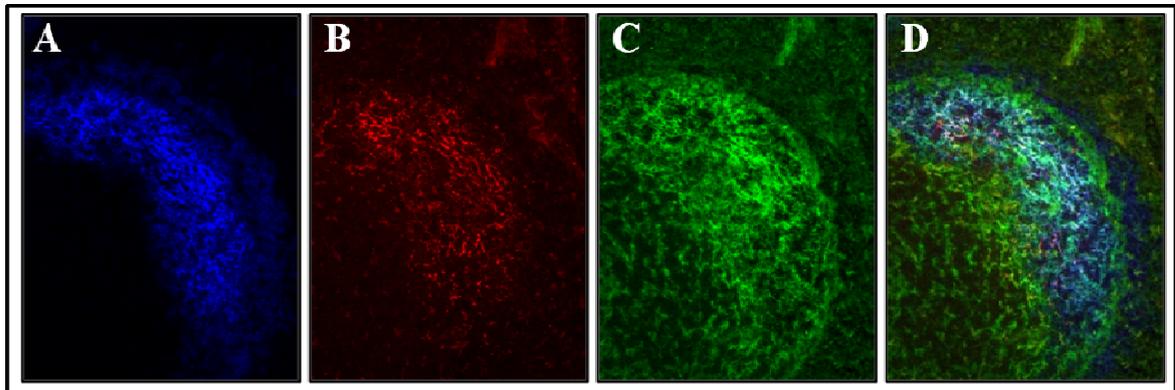


Abb. 5: Immunhistologischer Phänotyp der FDC, (A) anti-CD21 (blau), (B) FDC-M2 (rot), (C) BP-3 (grün), (D) Überlagerung der drei Färbungen. 200-fache Vergrößerung.

FDC im Keimzentrum, auch sekundäre FDC genannt, regulieren zwei Fc-Rezeptoren hoch: FcγRIIb (CD32) und FcεRII (CD23)^{69,70}. Weitere hochregulierte Marker sekundärer FDC sind Icam-1 (CD54), Vcam-1 (CD106) und Madcam-1. Diese Integrin-Liganden spielen in B-Zell-Migration und fester Bindung an der FDC-Oberfläche eine wichtige Rolle⁷¹⁻⁷³. Abbildung 6 zeigt beispielhaft hochregulierte Oberflächenmoleküle, die sekundäre FDC definieren.

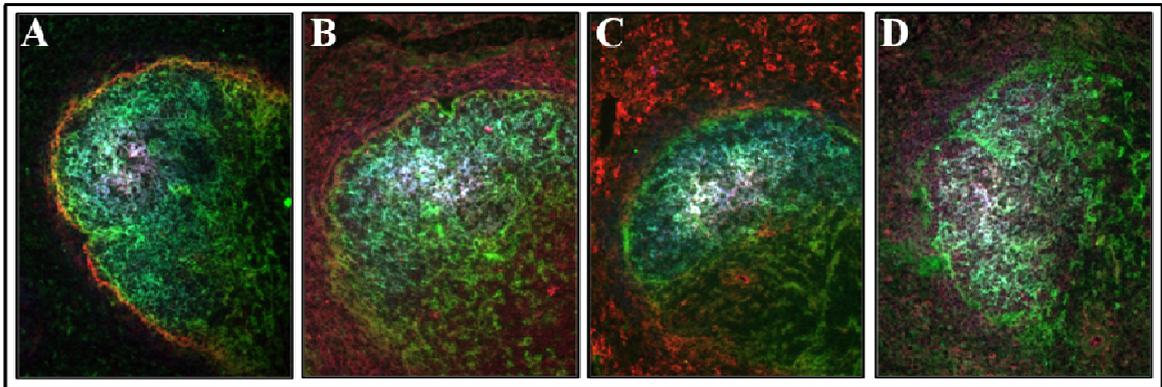


Abb. 6: Follikulär Dendritische Zellen (FDC) im Sekundärfollikel. Fluoreszenzfärbung von Gewebsschnitten der Milz. (A-D) BP3 (grün), CD21 (blau), rote Färbung: (A) Madcam-1, (B) Icam-1, (C) Vcam-1 und (D) Fc γ RIIb. 200-fache Vergrößerung.

3.1 Genexpression der FDC

Im Gegensatz zur histologischen Analyse ist eine Charakterisierung von FDC *ex vivo* eine Herausforderung. Ihre Isolierung aus vitalem Gewebe mit signifikanter Homogenität ist aufgrund einer extrem engen Interaktion mit B-Zellen schwierig und bedarf zeitaufwendige digestive Behandlungen. Da aber FDC wegen ihrer langen filigranen Dendriten sehr fragil sind, führten barsche Isolierungsmethoden zum Verlust der Integrität von FDC. Die mangelnde Integrität der FDC verhinderte eine Anreicherung einer signifikanten Anzahl vitaler Zellen in der Durchflusszytometrie. Hinzu kam, dass sich mit FDC-spezifischen Antikörpern aufgrund unspezifischer Färbungen von hauptsächlich B-Zellen keine klaren FDC-Populationen definieren ließen (Daten nicht gezeigt). Zur Umgehungen dieser Problematik wurde die Methode der Laser-unterstützten Mikrodisektion (Arcturus) zur Isolierung von FDC-Netzwerken gewählt.

3.1.1 Etablierung der Methode der Laser-unterstützten Mikrodissektion

RNA ist ein sehr instabiles Molekül mit einer kurzen Halbwertszeit. Um die Degradation der RNA in Gefrierschnitten möglichst gering zu halten, musste möglichst schnell, RNase-frei und bei niedrigen Temperaturen gearbeitet werden.

Zuerst wurde die Integrität der RNA von behandelten und unbehandelten Gewebsschnitten kontrolliert. Dazu wurde RNA von frischen und gefärbten Gefrierschnitten isoliert und die Qualität verglichen. Die Qualität der RNA wurde mittels eines Agilent Bioanalyzers und die Quantität durch Amplifikation des ubiquitär exprimierten (engl.: *housekeeping*) Gens β -Actin in einer LightCycler-PCR bestimmt.

Die Daten des Bioanalyzers zeigten nur einen geringfügigen Verlust der RNA-Integrität nach Fixierung, Färbung und Dehydrierung der Gefrierschnitte. In beiden Ansätzen wurde die ribosomale RNA (28S und 18S) detektiert und ergab für unbehandelte Gefrierschnitte einen 28S/18S-Quotient von etwa 1,8 und für behandelte Gefrierschnitte einen Wert von etwa 1,6; exemplarisch dargestellt in Abbildung 7. Die Daten der LightCycler-PCR wiesen einen Verlust von 15 - 20% RNA nach Behandlung der Gewebsschnitte aus (Daten nicht gezeigt).

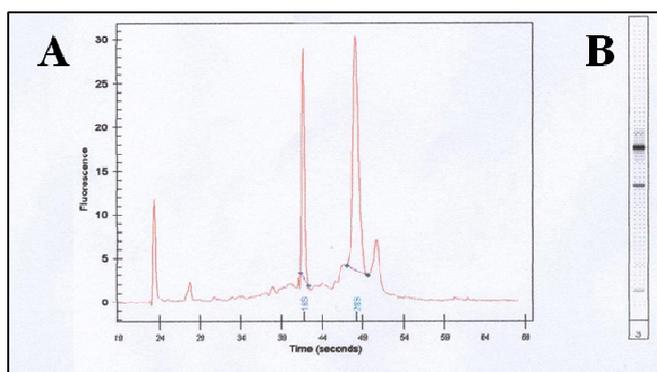


Abb. 7: Darstellung einer exemplarischen Qualitätskontrolle der isolierten RNA von Gefrierschnitten. Die ribosomale RNA (28S und 18S) wurde mit einem Agilent Bioanalyser detektiert und in ein Elektropherogramm (A) und Agarosegel-Abbild (B) übersetzt.

Diese qualitativen und quantitativen Werte liegen im Bereich der Erfahrungswerte des Herstellers des RNA-Aufbereitungskits (Arcturus). Das etablierte Protokoll ermöglicht somit die RNA-Isolierung von FDC und anderen Zelltypen aus Gefrierschnitten mit einem höchst-möglichen Grad an Qualität und Quantität.

Zur Visualisierung von FDC auf den Gefrierschnitten standen die beiden FDC-spezifischen Antikörper FDC-M2 und anti-CD21 zur Auswahl. Nach Testung verschiedener Färbeprotokolle fiel die Entscheidung zur Färbung von FDC für die Mikrodisektion aufgrund einer schnelleren und stärkeren Färbung auf anti-CD21.

Für die Analyse von FDC im Primärfollikel und FDC im Sekundärfollikel nach Induktion einer Immunantwort mussten primäre und sekundäre FDC für die Isolierung unterschieden werden. Da mit herkömmlichen Antikörpern zur Charakterisierung von FDC im Sekundärfollikel keine schnellen Färbungen möglich waren, wurden Keimzentren auf konsekutiven Gefrierschnitten mit PNA gegengefärbt. Isoliert wurden FDC in frühen (Tag 7 nach Immunisierung) und späten Sekundärfollikeln (Tag 15 nach Immunisierung).

Eine Kontamination der dissektierten Zellverbände durch Verwischung der RNA von benachbarten Zellen beim Schneiden des Gewebes sollte ausgeschlossen werden. Dazu wurden gleichgroße Gebiete von CD21⁺ und CD21⁻-Regionen dissektiert, RNA isoliert und am Beispiel der RNA von CD21 mittels einer RT-PCR nachgewiesen.

Die Amplifikation ergab ein eindeutiges Signal für die CD21⁺ und kein Signal für die CD21⁻ Regionen (Abb. 8). Eine mögliche RNA-Kontamination von benachbarten Zellen konnte somit ausgeschlossen werden.

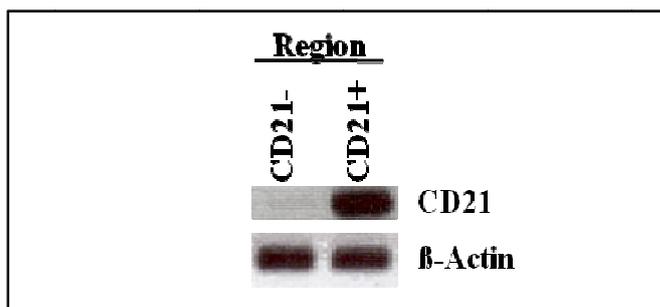


Abb. 8: Nachweis von CD21 in einer semi-quantitativen RT-PCR. Gefrierschnitte der Milz wurden mit anti-CD21 gefärbt. CD21⁺ und CD21⁻ Regionen wurden dissektiert und CD21 und β -Actin mittels RT-PCR amplifiziert.

3.1.2 Isolierung von FDC und Follikulären B-Zellen

Nach Etablierung eines Protokolls, bei dem Gefrierschnitte der Milz in weniger als 10 min optimal für die Laser-unterstützter Mikrodisektion und anschließende molekularbiologische Analyse vorbereitet wurden, erfolgte eine schonende und definierte

Isolierung von FDC aus Primär- und Sekundärfollikeln. Eine exemplarische Mikrodissektion gefärbter FDC-Netzwerke ist in Abbildung 9 dargestellt.

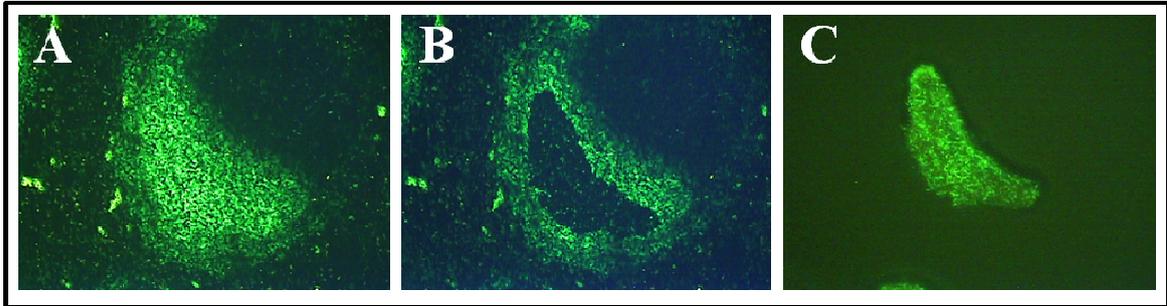


Abb. 9: Isolierung eines FDC-Netzwerkes mittels Laser-aktivierter Mikrodissektion. Gewebsschnitte der Milz wurden mit anti-CD21 gefärbt. Das gefärbte FDC-Netzwerk (A), das Gewebe nach der Isolierung (B) und das dissektierte FDC-Netzwerk (C).

In einem Parallellansatz wurden folliculäre B-Zellen ($B220^+ CD23^+ CD21^{\text{schwach}}$) und Keimzentrums-B-Zellen ($B220^+ PNA^{\text{stark}}$) früher (Tag 7 nach Immunisierung) und später (Tag 15 nach Immunisierung) Sekundärfollikel aus Einzelzellsuspensionen der Milz FACS-sortiert. Aus den dissektierten und sortierten Zellen wurde die RNA aufgereinigt, zweifach linear amplifiziert und auf Microarrays hybridisiert.

3.1.3 Analyse der generierten Microarrays

3.1.3.1 Vergleichspräzision der Microarrays

Für die Charakterisierung der FDC wurden Microarray-Duplikate von folgenden Zellen generiert: dissektierte FDC-Netzwerke von Primärfollikeln (Tag 0), frühen Sekundärfollikeln (Tag 7) und späten Sekundärfollikel (Tag 15); FACS-isolierte folliculäre B-Zellen (Tag 0), B-Zellen früher Keimzentren (Tag 7) und B-Zellen später Keimzentren (Tag 15). Für die Analyse der Entwicklung von FDC wurden zusätzlich Microarray-Duplikate von dissektierten stromalen B-Anlagen der SCID generiert (Abschnitt 3.3.2). Tabelle 13 (Anhang) fasst die der Datenberichte entnommenen Auswertungen aller verwendeten Proben zusammen.

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden die Signalintensitäten (engl.: *Mean Signal Intensity*) der >45.000 Gene (Affymetrix GeneChip A430 2.0) der Zellpopulationsduplikate korreliert. Der Korrelationskoeffizient der FACS-isolierten B-Zellen betrug $0,955 \pm 0,010$ und stimmte somit mit Werten der Literatur ($0,955 \pm 0,017$) überein⁷⁴. Der Koeffizient der dissezierten Zellen lag mit $0,933 \pm 0,007$ leicht drunter. Die geringere Korrelation der dissezierten Zellen lässt sich mit der dynamischen Zusammensetzung der isolierten Zellpopulationen erklärt werden. Während im FACS homogene Zellpopulationen isoliert werden, unterliegen dissezierte Zellverbände aufgrund der heterogenen Zusammensetzung einer gewissen Varianz in der Genexpression. Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung einer exemplarischen Korrelation der Duplikate von B-Zell- bzw. FDC-Microarrays.

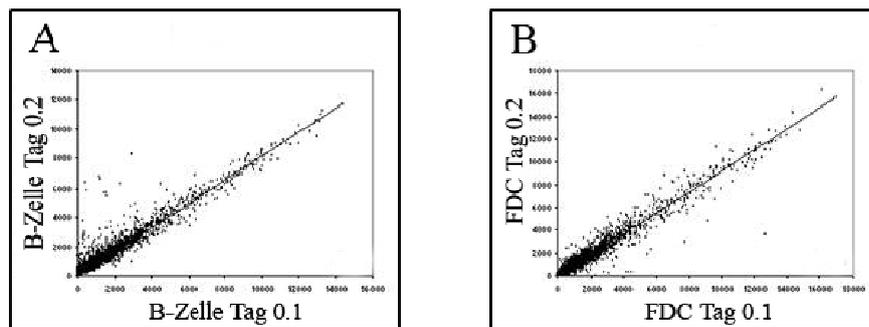


Abb. 10: Exemplarische Korrelation der Signalintensitäten von (A) B-Zell- und (B) FDC-Microarray-Duplikaten. Der Korrelationskoeffizient dieser B-Zell-Microarrays betrug $R^2=0,96$ und dieser FDC-Microarrays betrug $R^2=0,94$.

Für eine zuverlässige bioinformatische Analyse der Expressionsmuster verschiedener Zellpräparationen durch Microarray wurden die Datenberichte aller generierten Microarrays verglichen und statistisch ausgewertet. Eine Erklärung der einzelnen Begriffe, die für die Auswertung von Microarrays verwendet wurde, befindet sich im Abschnitt 2.7.3.

Auskunft über eine ausreichende RNA-Qualität und fehlerfreie Probenaufbereitung bei einer zweifachen Amplifikation von Proben geben die Parameter *Number Present* und *Signal Present*. Diese Werte lagen mit $37,9 \pm 5,0$ bzw. $242,0 \pm 59,4$ laut dem Hersteller Affymetrix für alle generierten Microarrays innerhalb der Akzeptanz.

Ob Microarrays untereinander verglichen werden können, hängt von *Scale Factor* ab. Da dieser Wert für alle Präparationen statistisch innerhalb des Toleranzbereiches ($1,0 \pm 0,6$) lag, waren alle Präparationen untereinander vergleichbar.

3.1.3.2 Bestätigung der neuen Methode zur Identifizierung FDC-spezifischer Gene

Das Expressionsmuster von dissektierten FDC-Netzwerken wurde mittels Microarray-Technologie generiert. Vor einer bioinformatischen Analyse wurden die Microarrays auf Signale typischer FDC-Gene untersucht. Die generierten Microarrays der sortierten folliculären B-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen dienten dabei der Kontrolle.

Charakteristische Gene für FDC wie CXCL13, Clusterin, Mfg-e8, BP3, CXCL12, Vcam-1, Gja1, Dsg2, Prionen-Protein (Prnp) und Madcam-1 wurden in den FDC-Netzwerk-, aber nicht in den B-Zell-Präparationen gefunden (Anhang, Tabelle 14 und 15)^{28,66,75-78}. Dagegen wurden B-Zell-Gene wie Ms4a1 (CD20) und CD19⁷⁹ nicht nur in den B-Zell-Präparationen, sondern aufgrund der Kolo-kalisierung mit FDC auch in den Netzwerk-Präparationen gefunden. Die Signalstärken typischer B-Zell-Gene waren auf den Microarrays von FDC-Netzwerk- und B-Zell-Präparationen vergleichbar und erleichtern somit die bioinformatische Subtraktion der B-Zell-Signale von den Signalen der FDC-Netzwerke.

Diese ersten Analysen der Microarray-Daten zeigte, dass mit der neuen Methode der Laser-unterstützten Mikrodisektion und des Microarrays ein Nachweis FDC-spezifischer Gene möglich ist und somit ein nützliches Werkzeug für die Analyse der Genexpression von FDC bereitsteht.

3.1.3.3 Bioinformatische Auswertung zur Ermittlung FDC-spezifischer Gene

Die Microarray-Daten wurden mit der GCOS-Software verarbeitet und unter Verwendung verschiedener Algorithmen in MS-Excel ausgewertet. Die Auswertung der Datensätze erfolgte anhand der Werte für Signalstärke, Detektion, *Signal Log Ratio* und *Change Call*.

In den dissektierten Arealen befinden sich fast ausschließlich FDC und B-Zellen. Um Signale spezifischer B-Zell-Gene (inklusive *housekeeping*-Gene) zu subtrahieren, wurden die Microarrays der dissektierten Zellen mit denen der B-Zell-Präparationen des korrespondierenden analysierten Zeitpunktes verglichen.

Zuerst wurden Gene ausgeschlossen, die in den B-Zell-Präparationen detektiert (*present*) wurden und eine Signalstärke von ≥ 100 hatten. Zur Anreicherung von Genen mit signifikanter Signalstärke wurden FDC-Kandidaten-Gene ausgewählt, die an einem Analyse-Zeitpunkt in $\geq 75\%$ mindestens 3-fach höher exprimiert waren (*Signal Log Ratio* $> 1,58$) als in B-Zellen. Zusätzlich mussten diese Gene in allen Vergleichen als *Change Call* ein *increase* (Anstieg) ausweisen. Kandidaten-Gene mussten außerdem an mindestens einem der drei Analyse-Zeitpunkte auf beiden Duplikaten als *present* oder *marginal* detektiert worden sein. Die Liste der Gene umfasste nach der Analyse 365 Kandidaten-Gene.

Im nächsten Schritt wurde eine Unterteilung zwischen regulierten und nicht regulierten Kandidaten-Gene im Laufe der Immunantwort vorgenommen. Dazu wurden die Microarrays der FDC-Netzwerke untereinander verglichen.

Gene, die in mindestens 75% der Vergleiche als *Change Call* ein *increase* (Anstieg) oder *decrease* (Abfall) und einen Quotient des Expressionsunterschieds (*Signal Log Ratio*) von mindestens 0,58 ($\geq 1,5$ -fach) auswiesen, wurden als reguliert akzeptiert. Gene, die ein *no change* (unverändert) bzw. einen kleineren Unterschied aufweisen, wurden als nicht-regulierte FDC-Kandidaten eingestuft. Darüberhinaus mussten diese Gene auf $\geq 75\%$ der Microarrays als *present* oder *marginal* detektiert worden sein. Dadurch ergaben sich 284 nicht regulierte und 81 regulierte Gene im Laufe einer Immunantwort. Eine Liste der Gene befindet sich im Anhang (Tabelle. 14 und 15). Die hier verwendeten Parameter und Algorithmen zur Auswertung der Microarrays stehen im Einklang mit der Literatur^{76,80-82}.

Zur Ermittlung signifikant regulierter Gene wurde die *Signal Log Ratio* der 81 Kandidaten-Gene dem Student *t*-Signifikanztest (*t*-Test) unterzogen. Ermittelt wurden 43

Gene, die mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als reguliert bestätigt wurden. Von den 43 Genen wurden 27 Gene (etwa 2/3) während der Immunantwort hochreguliert und nur 16 Gene (etwa 1/3) herunterreguliert. Unter den Genen, die in der Immunantwort hochreguliert werden, befand sich das für sekundäre FDC beschriebene Prionen-Protein⁸³. Im Anhang (Abb. 61) ist die Clusteranalyse der signifikanten Gene in einem Dendrogramm dargestellt.

Die Ontologie der 365 Kandidaten-Gene wurde mit Hilfe der DAVID-Datenbank analysiert. Diese Datenbank wertet Gene nach verschiedenen Gesichtspunkten wie Struktur und Funktion aus und gruppiert sie.

30% der Gene zählten zu den extrazellulären Proteinen (entweder sezerniert oder mit einer extrazellulären Region), von denen 7% zu den Matrixproteinen gezählt wurden. Funktionell sind die Gene in Zellmetabolismus (30%), Entwicklungsprozessen (20%), Zytoskelett (8%), Zellmigration (6%), Zelltod (5%), Zellzyklus (3%) und immunologischen Prozessen (3%) involviert.

3.1.3.4 Identifizierung von FDC-Interaktionspartnern auf Seiten der B-Zellen

In den dissektierten FDC-Netzwerken kolokalisierten B-Zellen. Um B-Zell-Gene aus den Microarray-Analysen der FDC-Netzwerke zu eliminieren, wurden Microarrays von B-Zellen hergestellt. Jedoch wurden diese B-Zell-Microarrays nicht nur für die Subtraktion der B-Zell-Gene zur Identifizierung von FDC-Genen generiert. Sie gaben zusätzlich Auskunft über mögliche FDC/B-Zell-Interaktionspartner auf Seiten der B-Zellen.

Für die Einteilung der B-Zell-Gene in regulierte bzw. nicht regulierte Gene im Laufe der Immunantwort wurden die generierten B-Zell-Microarrays (Duplikate von Follikulären B-Zellen, sowie frühen und späten Keimzentrums-B-Zellen) untereinander verglichen.

Gene, die in 75% der Vergleiche als *Change Call* ein *increase* (Anstieg) oder *decrease* (Abfall) und einen Quotient des Expressionsunterschieds (*Signal Log Ratio*) von mindestens 0,58 ($\geq 1,5$ -fach) auswiesen, wurden als reguliert akzeptiert.

Gene, die einen kleineren *Signal Log Ratio* aufwiesen, wurden als nicht regulierte B-Zell-Gene eingestuft. Nicht regulierte B-Zell-Gene mussten auf mindestens 75% der Microarrays als *present* oder *marginal* eingestuft sein. Regulierte Gene mussten hingegen an mindestens einen der drei Analyse-Zeitpunkte auf beiden Duplikaten als *present* oder *marginal* detektiert worden sein. Die Liste umfasste nach der Analyse 9792 nicht regulierte und 1489 regulierte Gene im Laufe einer Immunantwort.

Die Liste der nicht regulierten Gene war mit 9792 Genen sehr umfangreich. Hier war ein Großteil der Gene *housekeeping*-Gene. Um die Liste von *housekeeping*-Genen zu bereinigen, wurden die Microarrays jeder B-Zell-Präparation mit Microarrays von B-Zell-defizienten Gewebe (B-Zell-Anlage von SCID-Mäusen, Abschnitt 3.3.5) verglichen. Gene, die keinen Expressionsunterschied (*Change Call = no change* und *Signal Log Ratio* $\leq 0,58$) in 75% der Vergleiche zeigten, wurden ignoriert. Folglich ergaben sich eine reduzierte Liste mit 1213 nicht regulierten Genen, unter denen sich prominente B-Zell-Gene wie z.B. für Ms4a1 (CD20), CD19, Pax5, CD21, Tnfrsf13b (TACI), Tnfrsf13c (BAFF-R) und diverse Immunglobuline befanden^{79,84,85}.

Die Ontologie der B-Zell-Gene wurde mit Hilfe der DAVID-Datenbank analysiert. Dabei wurden die Gene mit relativ hoher Signalstärke (>300) unter verschiedenen Gesichtspunkten der Struktur und Funktion ausgewertet.

Unter den nicht regulierten B-Zell-Genen waren etwa 10% Transmembranproteine. Funktionell waren die Gene z.B. in Zellmetabolismus (40%), Proteinmodifikation (9%), Lymphozytenaktivierung (2%), Regulation von Zellprozessen (20%) und Genexpression (14%) involviert.

Keimzentrums-B-Zellen zeichneten sich zusätzlich durch einen hohen Anteil von Organellenproteinen (50%) aus. Im Vergleich zu folliculären B-Zellen erhöhte sich der Anteil an Transmembranproteinen um 10%. Außerdem sind Gene folgender Prozesse hochreguliert: Proteinmetabolismus (18%), Zelldifferenzierung (9%), Zellzyklus (7%), Reaktion auf DNA-Schädigung (5%), Proteintransport (4%), Lymphozytenaktivierung (3%) und somatische Rekombination (0,5%).

Für die Identifizierung von Proteinen, die mit FDC-exprimierten Faktoren interagieren, sind vor allem membranintegrale B-Zell-Proteine von Interesse, da diese Proteine als Zell/Zell-Interaktionspartner mit FDC und als Rezeptoren für FDC-exprimierte Faktoren fungieren könnten.

Für die Analyse von möglichen membranintegralen Interaktionspartnern zwischen B-Zellen und FDC wurden die regulierten und nicht regulierten B-Zell-Gene auf Transmembranproteine in der DAVID-Database untersucht. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, deren Signalstärke an mindestens einem der Analyse-Zeitpunkte >300 war. Unter den 754 regulierten Genen befanden sich mindestens 69 bzw. unter den 260 nicht-regulierten Genen 39 Transmembranproteine, die als Grundlage weiterer Analysen der FDC/B-Zell-Interaktion zur Verfügung stehen. Die ausgewählten Transmembranproteine befinden sich im Angang (Tabelle 16 und 17).

Zur Ermittlung signifikant regulierter Gene wurden die 754 Kandidaten-Gene den Student *t*-Test unterzogen. Folglich ergab sich eine Liste von 342 Genen, die mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ reguliert wurden. Im Anhang (Abb. 62) ist die Clusteranalyse der signifikanten Gene visuell in einem Dendrogramm dargestellt. Charakteristische Keimzentrums-B-Zell-Gene, wie *Rgs13*, *Mki67*, *Aicda*, *Lgal1* und *Edg8* wurden in der Immunantwort als signifikant hochregulierte Gene bestätigt⁸⁶⁻⁹⁰.

Der Vergleich der Expressionsmuster von Follikulären B-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen mittels Bioinformatik zeigte, dass während der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen $>98\%$ der regulierten Gene im Laufe der Immunantwort hochreguliert und folglich nur $<2\%$ runterreguliert wurden. Von der Gesamtheit der identifizierten B-Zell-Gene wurden etwa 100 den Transmembranproteinen zugeordnet. Die Rolle dieser Kandidatengene in Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakt bzw. Rezeptor/Ligand-Funktion im Zusammenhang mit FDC stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

3.1.4 Zusammenfassung

Da eine Isolierung von integren FDC mit signifikanter Homogenität aus vitalem Gewebe nicht zufriedenstellend war, wurde die Methode der Laser-unterstützten Mikrodissektion gewählt. Es ist gelungen, ein Protokoll zu etablieren, das eine *ex vivo* Isolierung von FDC für die Analyse ihrer Genexpression ermöglicht.

Daraufhin wurden FDC-Netzwerke primärer und sekundärer Follikel dissektiert und die Expressionsmuster mittels Mikroarray erstellt. Die Genexpression koisolierter B-Zellen ließ sich durch Herstellung von B-Zell-Microarrays bei der Auswertung der Daten berücksichtigen. Die bioinformatische Analyse wies prominente FDC-Gene nach und bestätigte den neuen experimentellen Ansatz zur Untersuchung der FDC-Genexpression.

3.2 Analyse und Funktion neu identifizierter FDC-Gene

3.2.1 Vorauswahl von FDC-Kandidaten-Gene

Um eine Vorauswahl von Genen für weitere Analysen zu treffen, wurden die ausgewerteten Microarrays mit publizierten Microarrays für diverse hämatopoietische und mesenchymale Zelltypen sowie FDC-Präparationen verglichen^{76,82,91-94}.

Da bei der Auswertung der publizierten Microarrays abweichende Parameter verwendet und die Daten anders verarbeitet wurden, mussten die Signalstärken für einen Vergleich mit den selbst generierten Microarrays extrapoliert werden. Dazu wurden die Signalstärken der eingeholten Microarrays anhand eines von Affymetrix definierten Gensatzes normalisiert.

Gene, die eine starke Expression in hämatopoietischen Zellen und gleichzeitig eine schwache in mesenchymalen Zellen zeigte, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die anschließende Auswahl der FDC-Kandidatengene für weiterführende Analysen unterlag folgenden Kriterien: (I) eine vergleichsweise hohe Signalstärke, (II) keine oder nur geringe Expression in hämatopoietischen Zelltypen, (III) Literaturhinweise auf einer

Bedeutung in der Regulation von Zellaktivitäten, einer Rolle in B-Zell-Interaktionen bzw. Immunantwort oder den Ursprung von FDC. Es erfolgte eine Auswahl von 11 interessanten FDC-Kandidaten-Genen für weitere Analysen:

(1) Bgn – Biglycan

Das Glykoprotein Biglycan wird von der Zelle in die extrazelluläre Matrix sezerniert, verbleibt aber auf der Zelloberfläche (perizellulär). Es wird in Verbindung mit Migration, Adhäsion und Retention von Zellen gebracht, sowie Regulierung der Aktivität von Zytokinen wie TGF- β und TNF durch Modulierung und Speicherung. Die Rolle in Apoptose, Differenzierung und Proliferation scheint zellspezifisch zu sein⁹⁵⁻¹⁰⁰. Oritani *et al.* zeigten, dass Biglycan von Vorläufer-B-Zellen gebunden wird und in vitro zur erhöhten Proliferation von Vorläufer-B-Zellen des Knochenmarks führte¹⁰¹.

(2) Lrat – Lecithin-Retinol Acyltransferase

Lrat ist ein wichtiges Enzym im Vitamin A-Metabolismus. Vitamin A wird vom Organismus aufgenommen und entweder in seine bioaktive Form Retinsäure umgewandelt oder von Lrat esterifiziert und gespeichert. Bei Bedarf wird esterifiziertes Retinol zu Vitamin A hydrolysiert. Retinsäure hat Hormonfunktion und bindet an die Kernmembran-Rezeptoren *Nuclear Retinoic Acid Receptor (Rar)* und *Retinoid X Receptor (Rxr)*, die wiederum als Transkriptionsfaktoren für eine Vielfalt von Genen wirken¹⁰²⁻¹⁰⁴. Retinsäure vermittelt Migration in den Darm (*gut-homing*) von T- und B-Zellen, fördert das Zellwachstum und die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und hemmt Proliferation von B-Zellen und verstärkt die Antikörperantwort^{105,106}.

(3) Coch - Coagulation Factor C Homolog (Cochlin)

Bei Cochlin handelt es sich um ein sezerniertes Protein der extrazellulären Matrix. Über die Funktion ist noch wenig bekannt, es wurde bisweilen nur in Verbindung mit der Augenkrankheit Glaucoma erwähnt¹⁰⁷. Strukturanalysen für Cochlin ergaben drei vWA (Von Willebrand-Faktor Typ A) –Domänen und eine LCCL (Limulus factor C, Coch-5b2, Lgl1) –Domäne (Abb. 11). vWA-Domänen übernehmen Funktionen bei Zellmigration und -adhäsion.

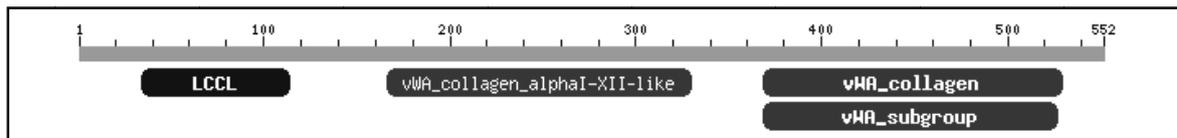


Abb. 11: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Coch nach NCBI CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

(4) Cilp - Cartilage Intermediate Layer Protein

Cilp ist ein monomerisches Glykoprotein der extrazellulären Matrix, dessen Funktion weitgehend unbekannt ist. Strukturanalysen zeigten eine TSP1- (*thrombospondin type 1 repeats*) und Ig-Superfamily- (IGcam – *immunoglobulin domain cell adhesion molecule superfamily member*) Domäne (Abb. 12). Während eine Ig-like-Domäne eine Rolle in Zelladhäsion übernimmt, bindet und aktiviert eine TSP1-Domäne TGF- β ¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

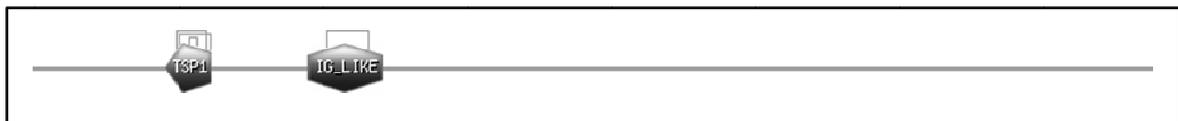


Abb. 12: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cilp nach NCBI CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

(5) Enpp2 - Ectonucleotide Pyrophosphatase

Enpp2, auch als Autotaxin bekannt, ist ein Membran-gebundenes Enzym mit der katalytischen Region im extrazellulären Raum. Dieses Ektoenzym hydrolysiert Lysophosphatidylcholin zu Lysophosphatidylsäure (engl.: *lysophosphatidic acid*, LPA), die an die Rezeptoren LPA1-3 binden. Die Rezeptoren gehören zu der Klasse der EDG-Rezeptoren, wozu auch Sphingosinphosphat-Rezeptoren gehören¹¹¹.

LPA spielt eine Rolle in Zellmotilität, -wachstum und -überleben. In neueren Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Enpp2 und Migration von Lymphozyten in sekundäre Lymphorgane identifiziert^{112,113}.

(6) Htra1 – High Temperature Requirement Protein A1

Htra1 gehört zur Trypsin-Familie der Serin-Proteasen, degradiert verschiedene Matrixproteine (z.B. Biglycan) und wird mit Tumorsuppression in Verbindung gebracht. Dieses sezernierte Protein bindet bzw. proteolytisch einige Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, hemmt dadurch die Signalkaskade und hat somit Einfluss auf Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung^{114,115}.

(7) RIKEN cDNA 9130213B05

Das Protein von RIKEN cDNA 9130213B05 wurde bisher noch nicht charakterisiert. Es weist Homologien zu dem Protein CIPAR1 (engl.: *castration induced prostatic apoptosis-related protein 1*) aus der Ratte auf, welches mit Apoptose assoziiert wird. Da CIPAR1 mit Apoptose assoziiert wird, ist RIKEN cDNA 9130213B05 ein interessanter Kandidat, da er über dieser Funktion eine Rolle in der Homöostase und/oder Differenzierung von B-Zellen spielen könnte. Eine Strukturanalyse für das murine Protein ergab eine Transmembrandomäne (24 Aminosäuren), sowie eine große extra- (242 Aminosäuren) und kleine intrazelluläre (30 Aminosäuren) Domäne (Abb. 13). Konservierte Domänen konnten nicht detektiert werden.

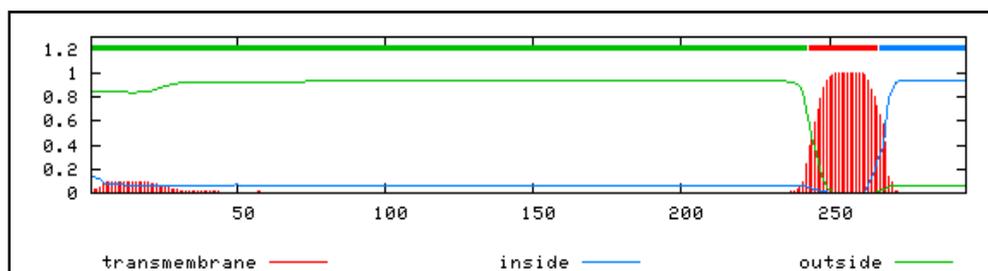


Abb. 13: Graphische Darstellung der Transmembran-Analyse von RIKEN cDNA 9130213B05 nach TMMOD (<http://liao.cis.udel.edu>): Transmembrandomäne (rot), sowie eine große extra- (grün) und kleine intrazelluläre (blau) Domäne.

(8) Ltbp3 - Latent TGF- β Binding Protein 3

Das Zytokin TGF- β wird von den meisten Zellen als biologisch inaktiver *large latent complex* (LLC) sezerniert. Dieser Komplex besteht aus TGF- β , *latency-associated protein* (LAP) und einem der vier *Latent TGF- β Binding*-Proteinen. Nachdem der LLC in seine

Bestandteile gespalten wurde, kontrolliert das multifunktionale TGF- β Proliferation, Differenzierung und Wachstum vieler Zelltypen. Neben der Kontrolle und Lenkung der Aktivität von TGF- β , sind LTBP auch ungebunden als extrazelluläre Matrixproteine bekannt¹¹⁶. Ltbp3-Defizienz führte in Mäusen zu einer desorganisierten Weißen Pulpa der Milz¹¹⁷.

(9) RIKEN cDNA 9130014G24

In der Nukleotid-Sequenz von Microarray-Sonde und korrespondierenden RIKEN cDNA 9130014G24 gab es nur mit der mRNA-Sequenz AK134038.1 Übereinstimmung. Obwohl die Sequenz unvollständig vorlag und dadurch keine Protein-Analyse ermöglichte, kam es trotzdem in die nähere Auswahl, da es sich hier um ein unbekanntes Protein handelt.

(10) Postn - Periostin

Periostin ist ein mesenchymales Markerprotein der extrazellulären Matrix und besitzt die Fähigkeit mit anderen extrazellulären Regulatoren wie TGF- β zu assoziieren.

Interaktionen zwischen Periostin und hauptsächlich Integrinen wurde in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Obwohl wenig über die Rolle bekannt ist, steht Periostin in Verbindung mit Remodulierungsprozessen und Zellmotilität^{118,119}.

(11) Serpina1 - Serine (or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 1

Serpina1 gehört zu der Familie der Serpine, welche hauptsächlich strukturell verwandte Peptidaseninhibitoren sind. Es liegt multipel im Genom vor (Serpina1a bis c) und unterscheidet sich nur durch SNP (engl.: *small nucleotid polymorphism*). Serpina1 ist sowohl als intra- als auch extrazelluläres Protein wirksam und hemmt Endopeptidasen, die Adhäsionsmoleküle wie Vcam-1 schneiden. Es wurde mehrfach gezeigt, dass eine Reduktion der Expression von Serpina1 im Knochenmark eine Rolle in der Mobilisierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen spielt^{120,121}.

3.2.2 Zellspezifische Zuordnung der FDC-Kandidaten-Gene

Für eine zellspezifische Zuordnung sollte nun die Expression der ausgewählten Kandidaten-Gene in verschiedenen Zelltypen untersucht und im Milzgewebe lokalisiert werden.

3.2.2.1 FDC-Kandidaten-Gene sind hauptsächlich mesenchymalen Ursprungs

Um Kandidaten-Gene auszuschließen, die in hämatopoietischen Zellen exprimiert werden, wurden FACS-sortierte B- und T-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen der Milz analysiert. Für die Bestätigung von FDC als mesenchymalen Zelltyp wurde die Expression der Kandidaten-Gene in mesenchymale Stammzellen der *Calvaria* (Schädeldach) und ausdifferenzierten Mesenchymzellen am Beispiel von Osteoblasten und Adipozyten überprüft. Dazu wurde von allen Zellpopulationen die RNA isoliert, normalisiert und in einer PCR analysiert. Als Expressionskontrolle diente eine cDNA-Bibliothek der Milz. CXCL13 diente als Kontroll-Gen für FDC.

Das in Abbildung 14 dargestellte Ergebnis zeigt, dass alle vorausgesuchten Kandidaten-Gene in der Milz und in mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden. 9 von 11 Genen werden in Adipozyten und 7 von 11 Genen in Osteoblasten exprimiert. Im Gegensatz wurden jedoch nur zwei der 11 Gene in hämatopoietischen Zellen detektiert. Hierbei handelte es sich um *Ltbp3*, exprimiert in Dendritischen Zellen, und RIKEN cDNA 9130014G24, exprimiert in Makrophagen und Dendritischen Zellen.

Es kann somit angenommen werden, dass mindestens 9 der 11 Gene (*Biglycan*, *Cilp*, *Coch*, *Enpp2*, *Htra1*, *Lrat*, RIKEN cDNA 9130213B05, *Periostin* und *Serpina1*) im Follikel von FDC und nicht kolokalisierten hämatopoietischen Zellen exprimiert werden. Dass diese Gene mit mesenchymalen Zellen assoziiert werden können, ist eine Bestätigung der Annahme, dass FDC mesenchymalen Ursprungs sind.

Für weitere Untersuchungen kamen folgende Gene in die engere Auswahl: *Biglycan*, *Cilp*, *Coch*, *Enpp2*, *Htra1*, *Lrat*, RIKEN cDNA 9130213B05, *Periostin* und *Serpina1*. *Ltbp3* und

das unbekannte Gen RIKEN cDNA 9130014G24 wurden aufgrund ihrer Expression in hämatopoietischen Zellen nicht weiter analysiert.

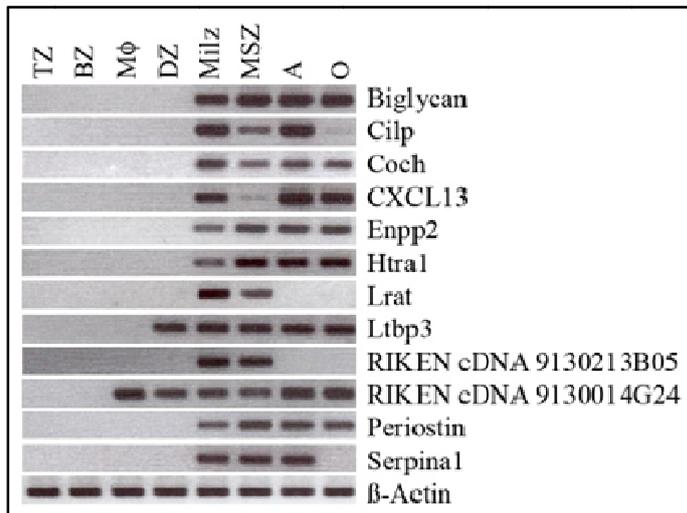


Abb. 14: Expressionsanalyse der FDC-Kandidaten-Gene in verschiedene hämatopoietischen und mesenchymalen Zellen. Als Expressionskontrolle diente eine cDNA-Bibliothek der Milz. CXCL13 diente als FDC-exprimiertes Kontroll-Gen. TZ = T-Zellen, BZ = B-Zellen, Mφ = Makrophagen, DZ = Dendritische Zellen, MSZ = Mesenchymale Stammzellen, A = Adipozyten und O = Osteoblasten.

3.2.2.2 *in situ*-Analyse der neu identifizierten FDC-Gene

Nach der PCR-Analyse wurden die Kandidaten-Gene Biglycan, Lrat, Cilp, Coch, Periostin, RIKEN cDNA 9130213B05 und Htra1 als potentielle FDC-Kandidaten-Gene gewertet. Um die Expression dieser Gene in der Milz zu lokalisieren, wurden die Methoden der Immunohistologie und *in situ*-Hybridisierung benutzt.

Die Expression von Biglycan im Milzgewebe wurde durch immunhistologische Färbungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Biglycan¹²² bestätigt. Eine starke Expression von Biglycan wurde in der Weißen Pulpa und an Endothelzellen der Roten Pulpa detektiert. Innerhalb der Weißen Pulpa gab es eine klare Abgrenzung zwischen der B- und T-Zone durch eine signifikant höhere Expression in der B-Zone. Die höchste Expression (Bgn^{stark}) innerhalb der B-Zone war in unmittelbarer Nähe zur T-Zone. In diesem Areal entstehen Keimzentren (Abb. 15 und 16).

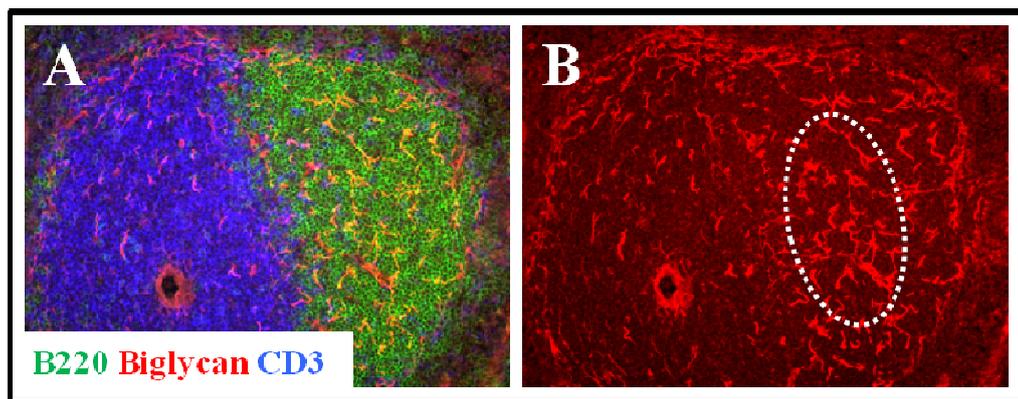


Abb.15: Expression von Biglycan in der Milz. Immunhistologische Färbungen von Gefrierschnitten. (A) Biglycan (rot), B-Zellen (grün) und T-Zellen (blau). (B) Selber Schnitt ohne Färbung der Lymphozyten; Bereich, in dem Keimzentren entstehen ist weiß markiert. 200-fache Vergrößerung.

Bei Betrachtung des stromalen Kompartiments der B-Zone zeigte sich, dass Biglycan im gesamten BP3^{stark} Stroma und somit auch im FDC-Netzwerk lokalisiert (Abb. 16A). Obwohl Biglycan ein sezerniertes Protein ist, verbleibt es auf der Oberfläche der sezernierenden Zellen und kann somit einem Zelltyp zugeordnet werden⁹⁵. Da FDC und FSC mit Biglycan kolokalisieren, konnte die Expression dieses Glykoproteins für beide folliculären Subpopulationen nachgewiesen werden (Abb. 16B).

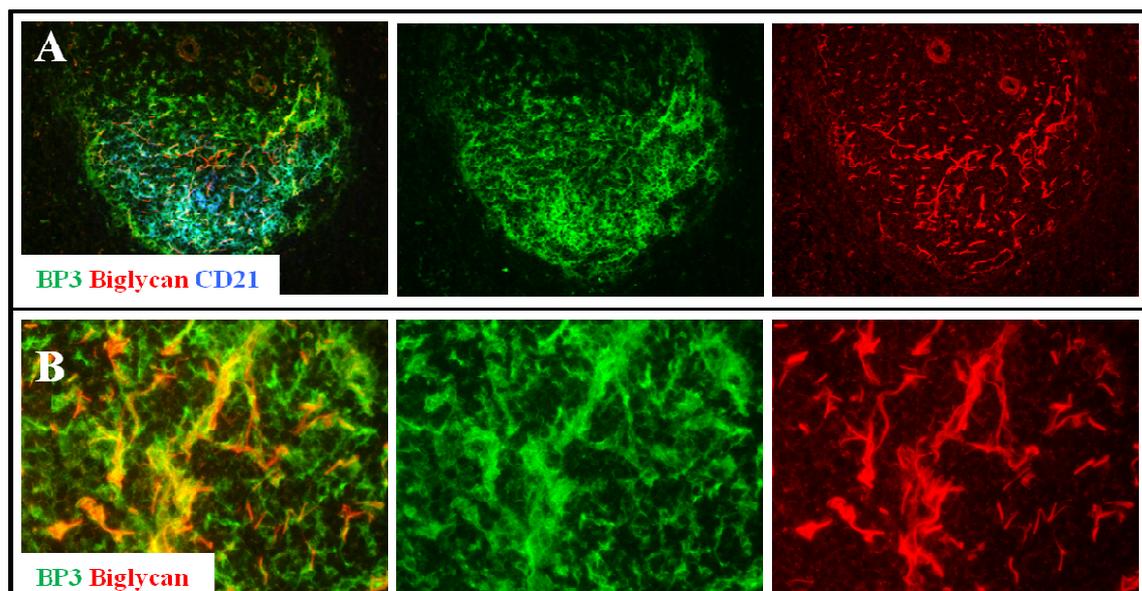


Abb. 16: Expression von Biglycan in der B-Zone. Fluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten der Milz. (A) 200-fache und (B) 400-fache Vergrößerung.

Die Lokalisierung der Expression der übrigen Gene wurde durch *in situ*-Hybridisierung gezeigt. Um eine Vorstellung über Lokalisierung von Hybridisierungs-Signalen FDC-exprimierter Gene im Milzgewebe zu erhalten, wurde das Chemokin CXCL13 als Referenz genommen. CXCL13 wird in der Milz nur in der B-Zone und dort nur von FDC und den übrigen FSC exprimiert⁹. Somit entspricht die CXCL13-Expression dem BP3^{stark}-Stroma (Abb. 17).

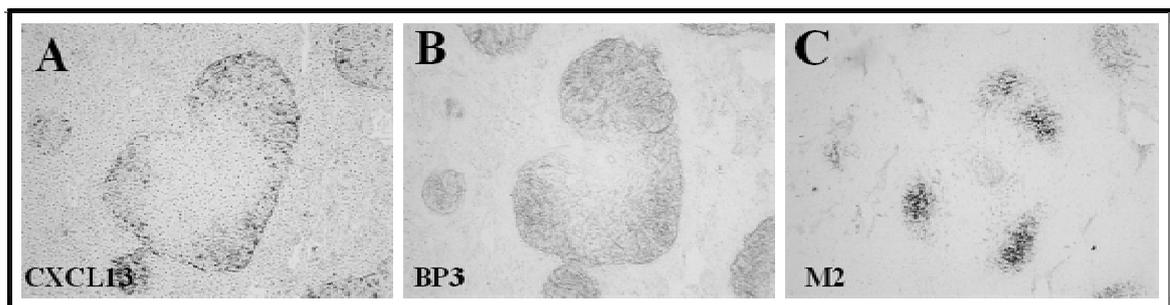


Abb. 17: Expression von CXCL13, BP3 und FDC-M2 in der Milz. (A) *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde für CXCL13 und Immunhistochemie mit (B) anti-BP3 und (C) FDC-M2. 100fache Vergrößerung.

Die Spezifität der Hybridisierungssonden (*anti-sense*; diese Sonden tragen die Komplementärsequenz zur RNA) wurde durch *sense*-Sonden (tragen die Sequenz der RNA) der gleichen Nukleotidsequenz kontrolliert. Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine *in situ*-Hybridisierung mit einer *anti-sense*- und *sense*-Sonde für CXCL13. Da mit der *sense*-Sonde keine Signale beobachtet wurden, waren die verwendeten Hybridisierungssonden der verschiedenen Gene spezifisch.

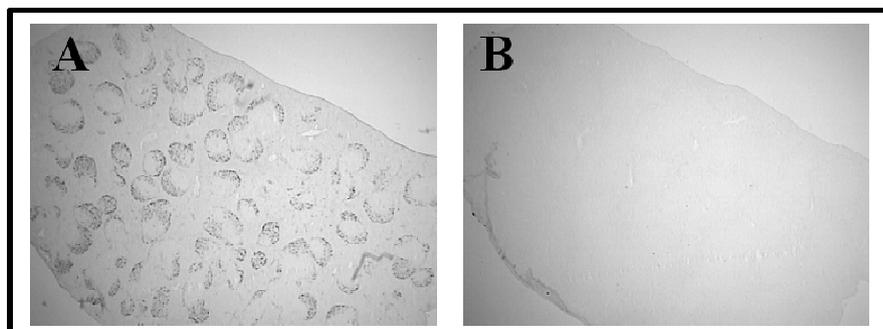
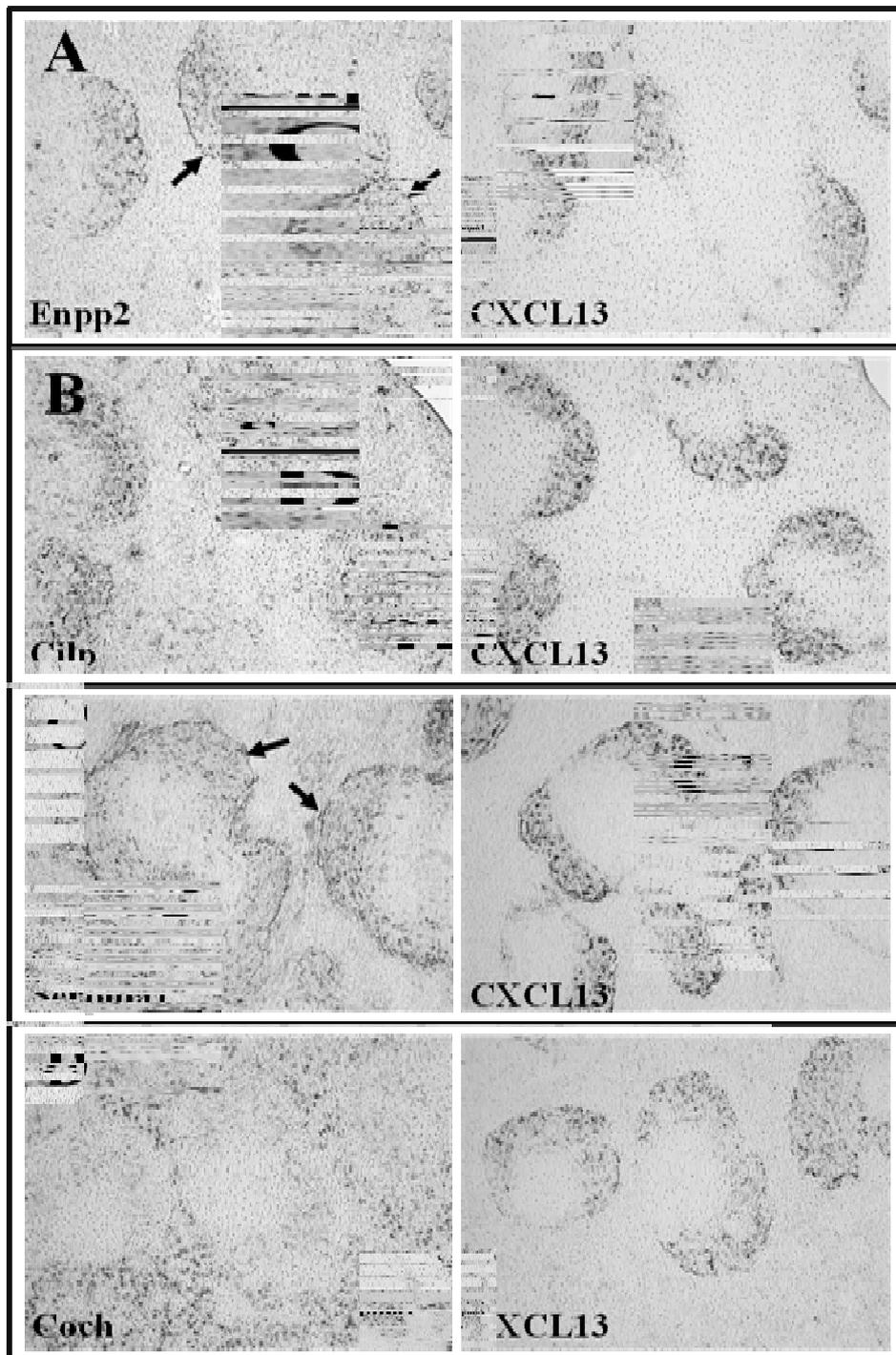


Abb. 18: *in situ*-Hybridisierung auf Milzschnitten mit (A) *anti-sense* und (B) *sense*-Sonden, exemplarisch gezeigt für CXCL13. 20-fache Vergrößerung.

Konsekutive Gewebsschnitte der Milz wurden mit Sonden der Kandidaten-Gene bzw. FDC-exprimierten Zytokins CXCL13 hybridisiert. Der unmittelbare Vergleich beider Hybridisierungen ermöglichte Rückschlüsse auf Lokalisierung und Zellspezifität der Expression der Kandidaten-Gene. Je nach Expressionsrate eines Gens fiel die Stärke des Hybridisierungs-Signales unterschiedlich aus. So musste bei Genen mit niedriger Expression die Substratreaktion der *in situ*-Hybridisierung zur Intensivierung des Signals entsprechend verlängert werden. Eine negative Folge der längeren Substratinkubation war eine Zunahme des Hintergrunds.

Abbildung 19 zeigt *in situ*-Hybridisierungen der FDC-Kandidaten-Gene auf Milzschnitten nicht-immunisierter Mäuse. Eine starke Expression wurde für *Enpp2*, *Serpina1* und *Cilp* in FDC und *Coch* in Stromazellen der Roten Pulpa nachgewiesen. Eher schwach war die in der B-Zone die Expression für *Periostin*, *Coch* und *Lrat*. RIKEN cDNA 9130213B05 zeigte zusätzlich zur schwachen Expression in der B-Zone eine noch schwächere in der T-Zone. Neben der Expression in der B-Zone wurde für *Serpina1* und *Enpp2* auch eine deutliche Expression in den Stromazellen des Marginalsinus nachgewiesen.

Obwohl *Htra1* von allen Kandidaten-Genen die höchste Signalstärke aufwies, konnte die Genexpression in der *in situ*-Hybridisierung aufgrund fehlender Signale nicht nachgewiesen. Dass die Signalstärken der Microarrays und *in situ*-Hybridisierung nur bedingt korrelierten, war auch für die übrigen Gene zu beobachten. So zeigte in der *in situ*-Hybridisierung z.B. *Cilp* ein deutlicheres Signal als *Lrat*, hatte aber auf dem Microarray nur eine halb so hohe Signalstärke.



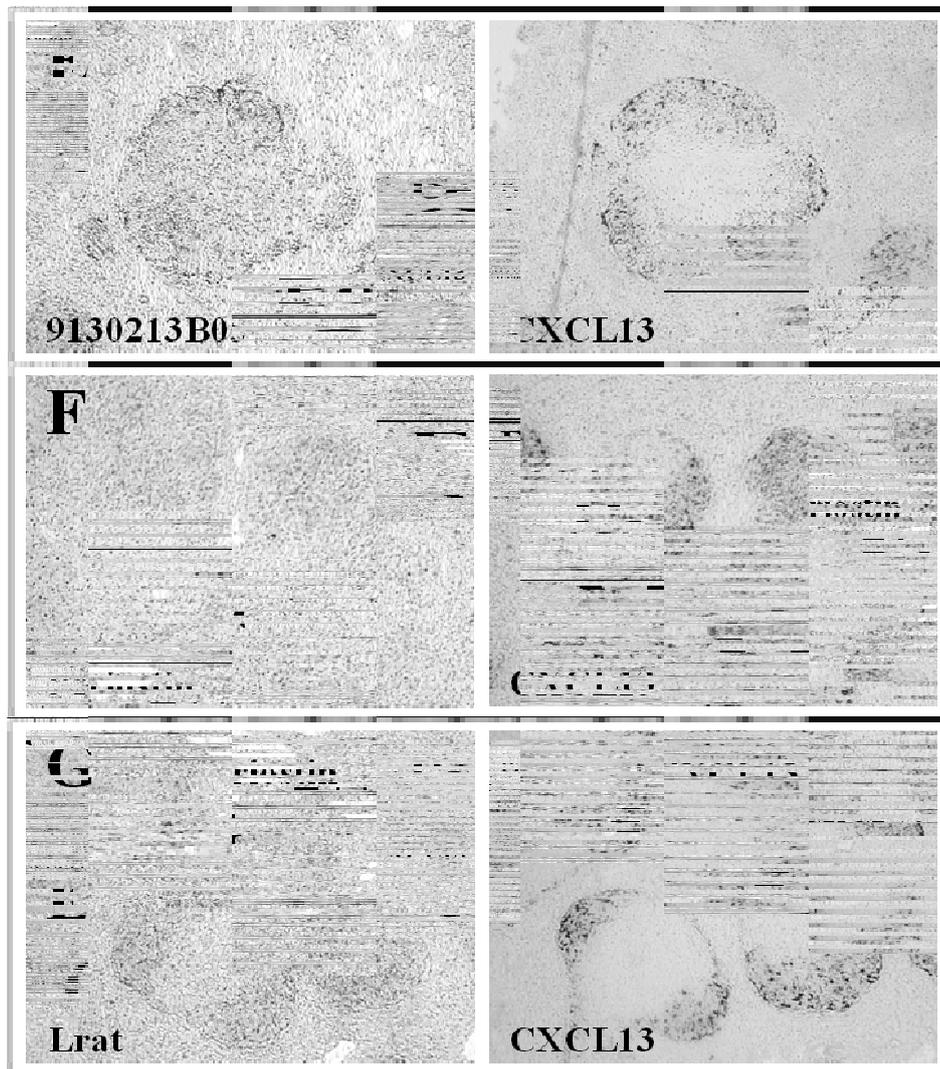


Abb. 19: Expression der neu identifizierten Gene in der Milz. *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden auf Gefrierschnitte nicht-immunisierter Mäuse. CXCL13 wurde auf konsekutiven Gewebsschnitten detektiert. 100-fache Vergrößerung.

Nach einer induzierten Immunantwort zeigte sich eine deutliche höhere Expression von Coch und Periostin in sekundären FDC. Dabei war das Expressionsniveau von Coch in sekundären FDC mit dem in Stromazellen der Roten Pulpa zu vergleichen. Die Expression von Periostin erhöhte sich in sekundären FDC so sehr, dass die Detektionszeit der hybridisierten Sonden mit Substrat nur ein Fünftel der von primären FDC betrug. In Abbildung 20 wird gezeigt, dass im Gegensatz zu Primärfollikel FDC im Sekundärfollikel Periostin und Coch hochregulieren. Da sich Primär- und Sekundärfollikel auf denselben Gewebsschnitten befanden, konnten Variationen durch unterschiedliche Reaktionsbedingungen (z.B. Substratreaktion) ausgeschlossen werden.

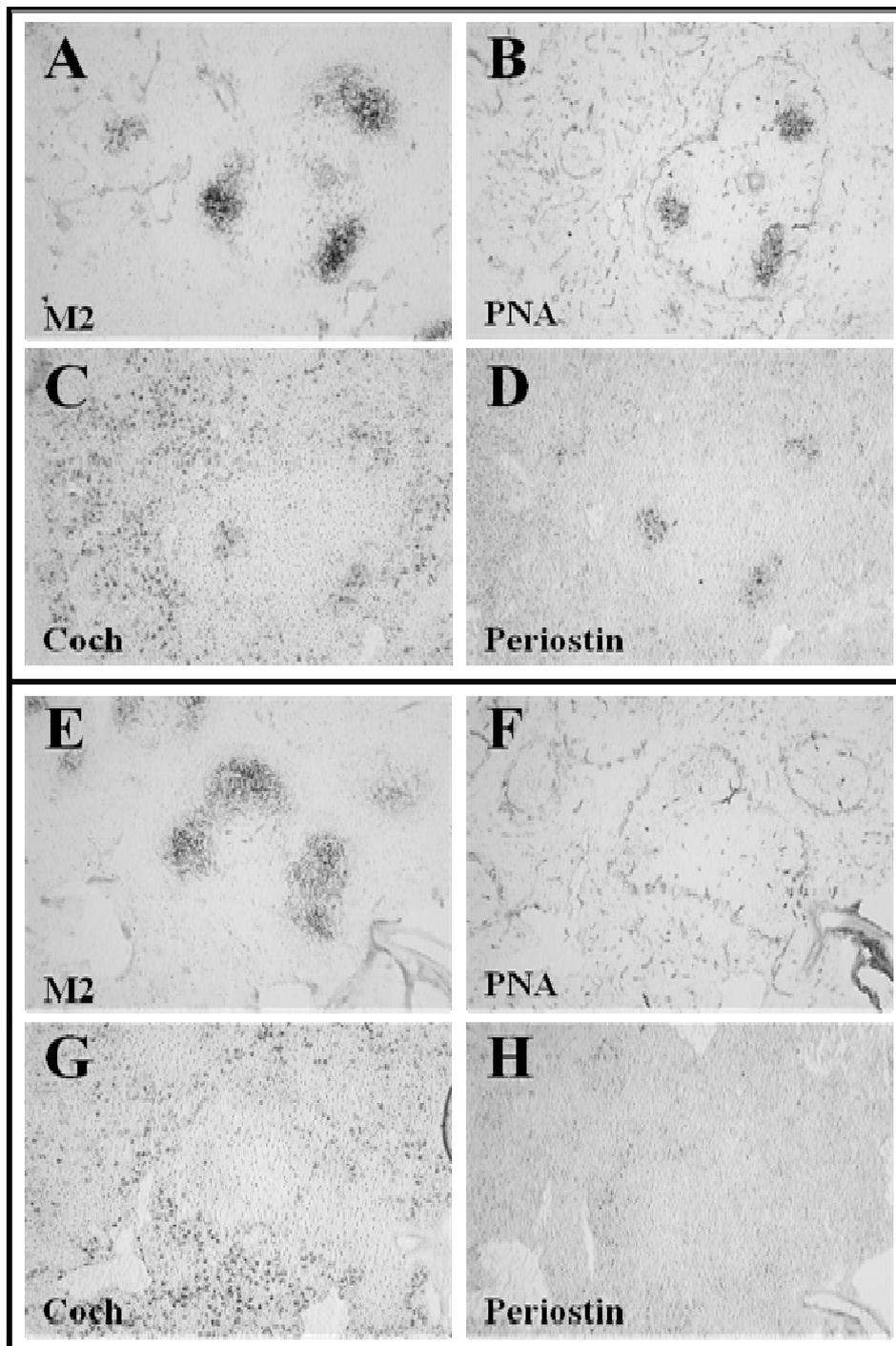


Abb. 20: Die Expression der FDC-Gene Coch und Periostin im Primär- und Sekundärfollikel der Milz. *in situ*-Hybridisierung von Gefäßerschnitten für Coch (C+G) und Periostin (D+H) und immunhistologische Färbung auf konsekutiven Gewebsschnitten mit dem Antikörper FDC-M2 (A+E) und PNA (B+F). 100-fache Vergrößerung.

3.2.3 Funktionelle Rolle neu identifizierter FDC-Gene

Mit Hilfe der Mikrodissektion und Microarray-Analyse wurden neue FDC-spezifische Gene identifiziert, deren Expression anschließend *in situ* bestätigt wurden. Um Hinweise über Funktion in der Milz zu erhalten, wurden die Gene *Enpp2*, *Periostin*, *Biglycan* und *Lrat* näher untersucht.

3.2.3.1 Der Rezeptor für das enzymatische Produkt von *Enpp2*

Das enzymatische Produkt von *Enpp2* ist LPA, welches von den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren LPa1 (*Edg2*), LPa2 (*Egd4*) und LPa3 (*Edg7*) gebunden wird. Laut der Microarray-Daten wird im FDC-Netzwerk LPa1 als einziger Rezeptor dieser Familie exprimiert. Die B-Zell-Präparationen der Microarrays sind für LPa-Rezeptoren negativ. Um herauszufinden, welche Zellen den im FDC-Netzwerk detektierten LPa1 exprimieren, wurden myeloide Zellen, Lymphozyten und mesenchymale Zellen mit einer semi-quantitative PCR analysiert.

Die PCR-Analyse bestätigte die Daten der B-Zell-Microarrays, dass B-Zellen negativ für diesen Rezeptor sind. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass weder myeloide Zellen noch T-Zellen den LPa1-Rezeptor exprimieren. Die Expression, die in der Milz nachgewiesen wurde, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf stromale Zellen zurückgeführt werden. Unter den analysierten mesenchymalen Zelltypen exprimieren nur Stammzellen, nicht aber ausdifferenzierten Osteoblasten und Adipozyten den Rezeptor (Abb. 21).

Die RT-PCR-Analyse deutet darauf hin, dass ausdifferenzierte mesenchymale Zellen die Expression des LPa1-Rezeptors reduzieren. Es stellte sich die Frage, ob diese Regulierung von LPa1 auch bei der Differenzierung zu FDC zu beobachten ist. Dazu wurden *wt* und SCID-Mäuse verglichen. Obwohl die Lymphozyten-defizienten SCID-Mäusen keine ausdifferenzierten B-Zonen mit FDC besitzen, sind die stromalen Zonen, wo sich B- und T-Zellen positionieren können, vordefiniert. So lässt sich in SCID wie in *wt* die weiße Pulpa mit dem stromalen Marker BP3 in eine periarterielle BP3^{schwach} Zone, umgeben von

einer BP3^{stark} Zone, einteilen. In Lymphozyten-defizienten Milzen wird die BP3^{schwach} Zone auch als T-Anlage und BP3^{stark} Zone als B-Anlage bezeichnet⁶⁶.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Microarrays von B-Anlagen der SCID angefertigt (Abschnitt 3.3.5) und die Expression von LPa1 im Stroma der B-Anlagen und in FDC miteinander verglichen. Die Microarray-Analysen der FDC-Netzwerken und B-Anlagen zeigten einen signifikanten Unterschied in der Expression von LPa1. So war in Stromazellen der B-Anlage, die aufgrund fehlender Signalvermittlung durch Lymphozyten nicht zu FDC differenzieren können, eine signifikant höhere Expression des LPa1-Rezeptors (Signalstärke: in FDC 160, im Stroma der B-Anlagen 770) zu beobachten. Ein Unterschied in der Expression des Enzyms Enpp2 konnte hingegen nicht beobachtet werden.

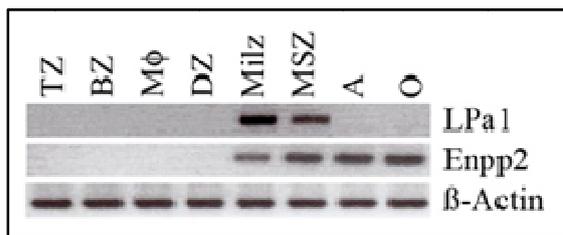


Abb. 21: Expressionsanalyse von LPa1, Enpp2 und β-Actin in hämatopoietischen und mesenchymalen Zellen. TZ = T-Zellen, BZ = B-Zellen, Mφ = Makrophagen, DZ = Dendritische Zellen, MSZ = Mesenchymale Stammzellen, A = Adipozyten und O = Osteoblasten.

Zusammenfassend deuten die Daten an, dass die Expression von Enpp2 in stromale Zellen der Weißen Pulpa autoregulatorische Funktionen hat, da der Rezeptor für das enzymatische Produkt von Enpp2 auch von folliculären Stromazellen und nicht von hämatopoietischen Zellen exprimiert wird.

Die daraus hervorgehende Fragestellung, ob sich die Expression von LPa1 in Stromazellen der Weißen Pulpa bei der Differenzierung zu FDC ändert, wurde durch Analyse der Milz von Neugeborenen adressiert (Abschnitt 3.3.3.2).

3.2.3.2 Lrat-defiziente Mäuse zeigten ein aktiviertes Immunsystem

Lrat ist ein Schlüsselenzym für die Speicherung von Vitamin A. Durch Ausschaltung des Lrat-Gens und somit der Speicherung von Vitamin A entwickeln Mäuse einen Defizienz an Retinsäure, der bioaktiven Form von Vitamin A⁶⁰. Lrat-defiziente Mäuse sind somit ein Model für Vitamin A-Mangel. Lrat wurde als ein Gen spezifisch für FDC identifiziert.

Um Hinweise zu bekommen, ob Lrat für das Immunsystem eine Rolle spielt, erfolgte im ersten Schritt die Untersuchung der Milzstruktur von Lrat-defizienten Mäusen mittels Immunohistologie und *in situ*-Hybridisierung.

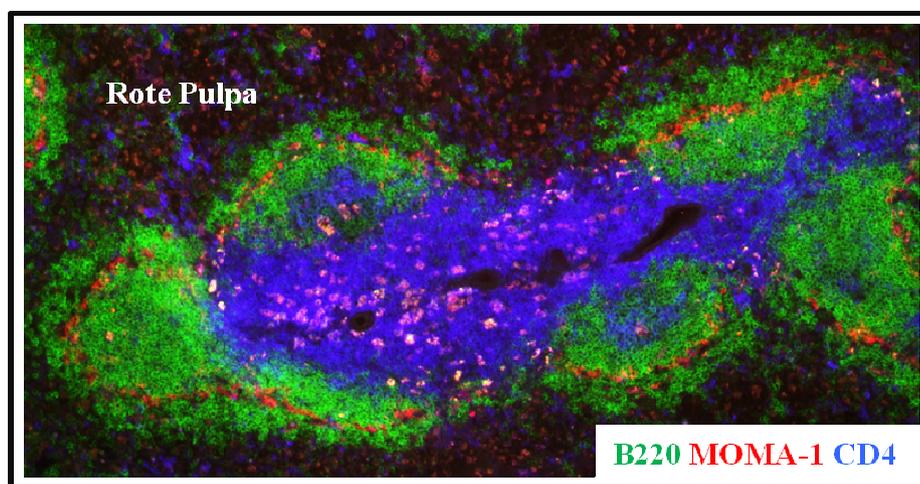


Abb. 22: Die Kompartimentierung einer Lrat^{-/-} Milz. Gefrierschnitte wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. 100fache Vergrößerung.

Die Milzen zeigten eine Trennung von Roter und Weißer Pulp und eine vollständige Kompartimentierung der Weißen Pulpa in B- und T-Zone (Abb. 22). Die Marginalzone war durch einen MOMA-1⁺/Madcma-1⁺ Marginalsinus von den B-Zonen getrennt. Auffällig war, dass die B-Zonen im Vergleich zu wt kleiner ausgeprägt waren. Dafür war die Marginalzone mit etwa 8-10 Lagen Marginalzonen-B-Zellen im Vergleich zu wt (etwa 2-3 Zellschichten) eindeutig vergrößert (Abb. 23). Die Expression der Chemokine zeigte hingegen keine Auffälligkeiten. Die Stromazellen der T-Zone exprimierten CCL21 und CCL19 und der B-Zone CXCL13.

Obwohl die Expression von BP3 im Vergleich zum wt schwächer war, ließ sich die Weiße Pulpa in eine BP3^{schwach} T-Zone und BP3^{stark} B-Zone unterteilen, wobei CD21⁺ FDC-M2⁺

FDC in der B- Zone lokalisierten. Jedoch bildeten FDC im Vergleich zu wt kleinere Netzwerke. Zudem war die Expression von Biglycan im Follikel negative.

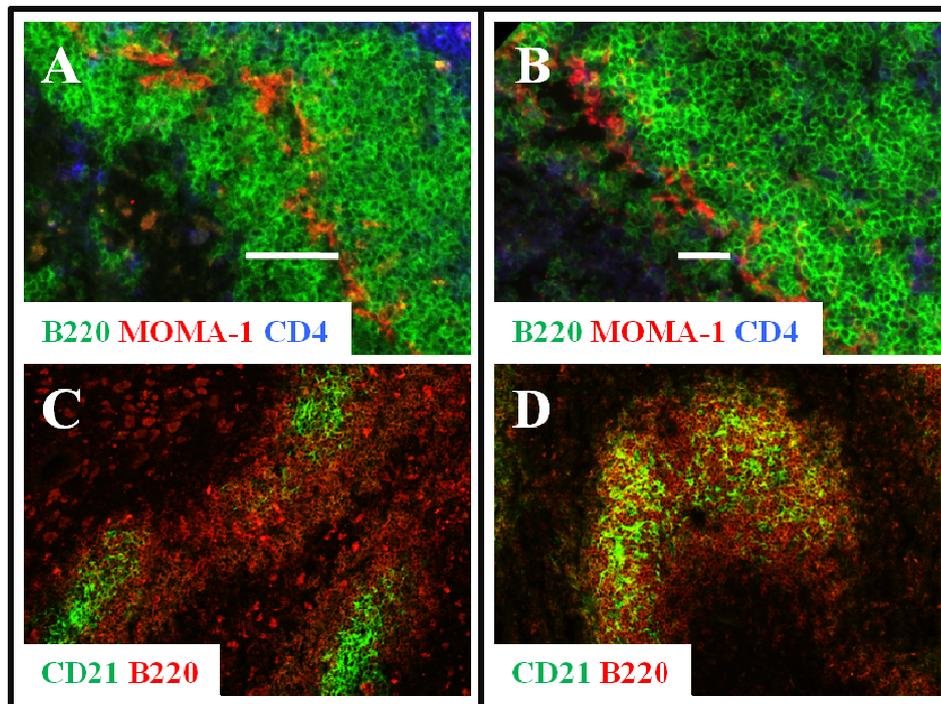


Abb. 23: Milzschnitte von Lrat^{-/-} (A+C) und wt (B+D). Gefrierschnitte wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. (A+B) Die Marginalzone ist durch einen weißen Balken markiert.

Die Daten deuten darauf hin, dass die Expression von BP3 und Biglycan und somit die Differenzierung des stromalen Kompartiments von der Speicherung und somit ständigen Verfügbarkeit der Retinsäure abhängt.

Die Regulierung von Vitamin A/Retinsäure hatte jedoch nicht nur Konsequenzen in der Differenzierung des Stromas, sondern führte zur Aktivierung von B-Zellen. So waren in fast allen B-Zonen aktivierte B-Zellen (PNA⁺ Ki67⁺ Keimzentrums-B-Zellen) nachweisbar. Diese erhöhte Anzahl von Keimzentren in der Milz deutete auf ein aktiviertes Immunsystem. Die Differenzierung von FDC zu sekundären FDC erschien aber weitgehend normal. So besaßen die FDC im Sekundärfollikel durch die Expression von Postn, Coch, Icam-1, Vcam-1, Madcam-1, FcγRIIb einen typischen Keimzentrumsphänotyp.

3.2.3.3 Lrat-defiziente Mäuse zeigten eine gestörte Keimzentrumsreaktion

Lrat^{-/-} besitzen eine erhöhte Anzahl von Keimzentren, die in ihrer Größe relativ klein sind. Da in diesen Mäusen keine Immunantwort durch Administration von Antigen induziert wurde, ist davon auszugehen, dass die Keimzentren zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstanden sind und sich somit die Entwicklungsstadien der einzelnen Keimzentren unterscheiden müssten. Histologische Analysen ergaben jedoch, dass sich jegliche Keimzentren, die in den Lrat^{-/-} beobachtet wurden, im Entwicklungsstadium II befanden. In diesem Stadium sind die FDC-Netzwerke komplett mit proliferierenden B-Zellen gefüllt und eine typische Helle Zone ist noch nicht ausgebildet¹⁶. Abbildung 24 zeigt exemplarisch ein Keimzentrum in der Milz der Lrat^{-/-}.

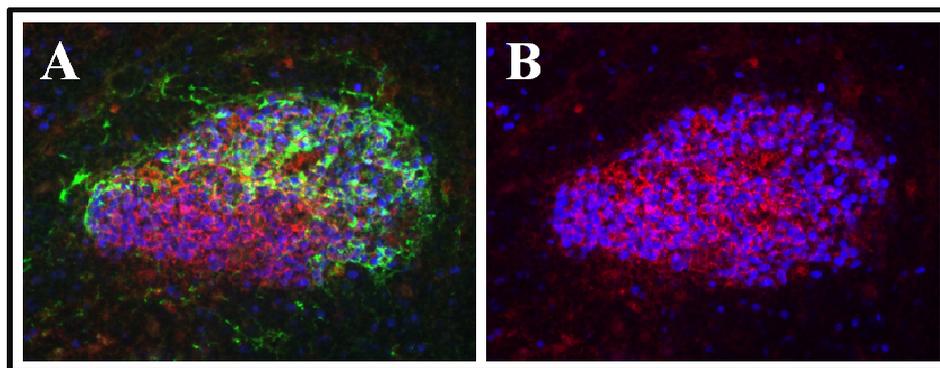


Abb. 24: Exemplarische Darstellung eines typischen Keimzentrums in der Lrat^{-/-} Milz. Gewebsschnitte wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern/Reagenz FDC-M2 (grün), PNA (rot) und Ki67 (blau) gefärbt. 400-fache Vergrößerung.

Für eine bessere Charakterisierung der Keimzentren wurden Repertoire der V_H-Gene und Isotyp der Immunglobuline analysiert. Dazu wurden Keimzentren von Gefrierschnitten mittels Laser-unterstützter Mikrodisektion isoliert, die RNA aufgereinigt und die V_H-Gene in einer PCR amplifiziert und sequenziert.

Die Analyse der V_H-Gene ergab im Vergleich zu einer normalen oligoklonalen Reifung eines Keimzentrums ein sehr heterogenes V_H-Gen-Repertoire. So konnte nur ein exponentieller Klon gefunden werden. Die überwiegende Mehrheit der analysierten V-Gene wies zudem keine oder kaum Mutationen auf. Aufgrund der Polyklonalität und

fehlender Selektion konnten keine B-Zell-Stammbäume gefunden werden. Auch wurde ein für Keimzentrums-B-Zellen typischer Klassenwechsel des Isotyps nur in Einzelfällen beobachtet. Auffällig war jedoch die Häufigkeit von V_H -Genen der relativ kleinen V_H4 -Familie (X24-Familie), die in unterschiedlicher Rearrangierung nachgewiesen wurden.

3.2.3.4 Analysen der Milz von Periostin- und Biglycan-defizienten Mäusen

Periostin und Biglycan sind für das stromale Kompartiment der B-Zonen neu definierte extrazelluläre Matrixproteine, die u.a. mit verschiedenen Regulatoren (z.B. TGF- β) assoziieren und im Kontext mit Migration erwähnt werden^{97,100,118}. Die Tiere mit Periostin-Defizienz zeichnen sich durch Kleinwuchs und dentalen Entwicklungsstörungen⁶¹ und die der Biglycan-Defizienz durch einen Osteoporose-ähnlichen Phänotyp mit verminderten Knochenvolumen und einer geringeren Mineralappositionsrate aus⁶².

Die Auswirkungen einer Periostin- bzw. Biglycan-Defizienz in Hinblick auf Organisation und Differenzierung der Milz wurde anhand von *knockout*-Tieren immunhistologisch untersucht.

Periostin-defiziente Milzen zeigten wie die für Biglycan keine Auffälligkeiten. Typisch war die Vcam-1-Expression in der Roten Pulpa und die Ausbildung des Marginalsinus (Madcama-1⁺ und MOMA-1⁺), der Rote und Weiße Pulpa trennt. In der Weißen Pulpa umgaben B-Zellen in charakteristischen Follikelstrukturen die T-Zonen und das Stroma hatte wie bei wt eine starke BP3-Expression in der B-Zone und eine schwache in der T-Zone. Außerdem wiesen die B-Zonen normale CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC-Netzwerke auf. Während wt-typisch in der Postn/-/-Milz Biglycan exprimiert wurde, fehlte dieser Marker aufgrund der Defizienz in Bgn/-/.

Da beide Tierstämme nicht unter pathogen-freien Bedingungen gehalten wurden, konnten vereinzelt Keimzentren mit PNA⁺ Ki67⁺ B-Zellen detektiert werden. Während der Immunantwort differenzierten in beiden Tierstämmen die FDC im Keimzentrum zu normalen sekundären FDC. Der Phänotyp war wie in wt durch Hochregulierung von

Icam-1, Vcam-1, Madcam-1 und Fc γ RIIb ausgezeichnet. Jedoch fehlte in beiden Tieren die Expression von CD23. Abgesehen von der geringen Größe der Keimzentren in Bgn $^{-/-}$ -Milzen schien die Entwicklung der Keimzentren normal.

Hingegen war in Postn $^{-/-}$ eine gestörte Keimzentrumsentwicklung auffällig. Obwohl diese Tiere ihr ganzes Leben Pathogenen ausgesetzt waren, konnten nur frühe Keimzentren, gekennzeichnet durch Proliferation von Keimzentrums-B-Zellen im FDC-Netzwerk und folgliches Fehlen einer Hellen Zone, beobachtet werden (Abb. 25)¹⁶.

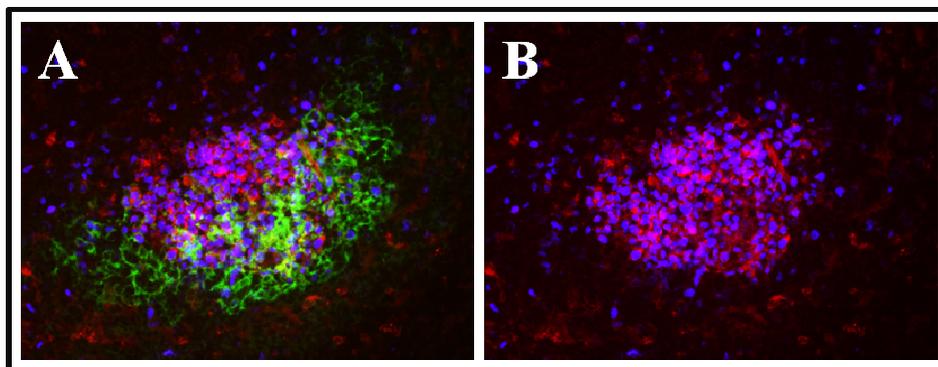


Abb. 25: Exemplarische Darstellung eines typischen Keimzentrums der Periostin-defizienten Milz. Gewebsschnitte wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern/Reagenz FDC-M2 (grün), PNA (rot) und Ki67 (blau) gefärbt. 400-fache Vergrößerung.

3.2.4 Zusammenfassung

Nach Isolierung von FDC und bioinformatische Auswertung ihrer Genexpression wurde anhand verschiedener Parameter ein Satz von Genen selektiert und ihre Expression in FDC *in situ* bestätigt. In Tabelle 9 sind die neu identifizierten FDC-Gene und ihre Expression im Laufe der Immunantwort dargestellt. Erste Analysen von *knockout*-Mausmodellen gab Auskunft über die Funktion neu identifizierter FDC-Gene in der Milz. Für die FDC-spezifischen Gene Lrat und Periostin konnte eine Rolle in der Entwicklung von Keimzentrumsreaktionen nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Überblick über die Expression der neu identifizierten FDC-Gene.

FDC-Gene	Primärfollikel	Sekundärfollikel	
		frühes	spätes
Biglycan	+	+	+
Enpp2	+	+	+
Serpina1	+	↓	↓
Cilp	+	+	+
Lrat	+	+	+
RIKEN cDNA 9130213B05	+	+	+
Periostin	+	↑	↑
Coch	+	↑	↑

Gene sind exprimiert (+) oder im Vergleich zum Primärfollikel hochreguliert (↑) bzw. herunterreguliert (↓).

3.3 Entwicklung des FDC-Netzwerks

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden neue FDC-Gene identifiziert, die sowohl bei der B-Zell-Interaktion als auch für ein besseres Verständnis der FDC-Entwicklung von Bedeutung sind.

Unter Berücksichtigung der neu definierten und bereits bekannten FDC-Gene sollte nun die Differenzierung der Stromalen Milzkompartimente bis hin zur Ausbildung von Follikeln mit reifen FDC untersucht werden.

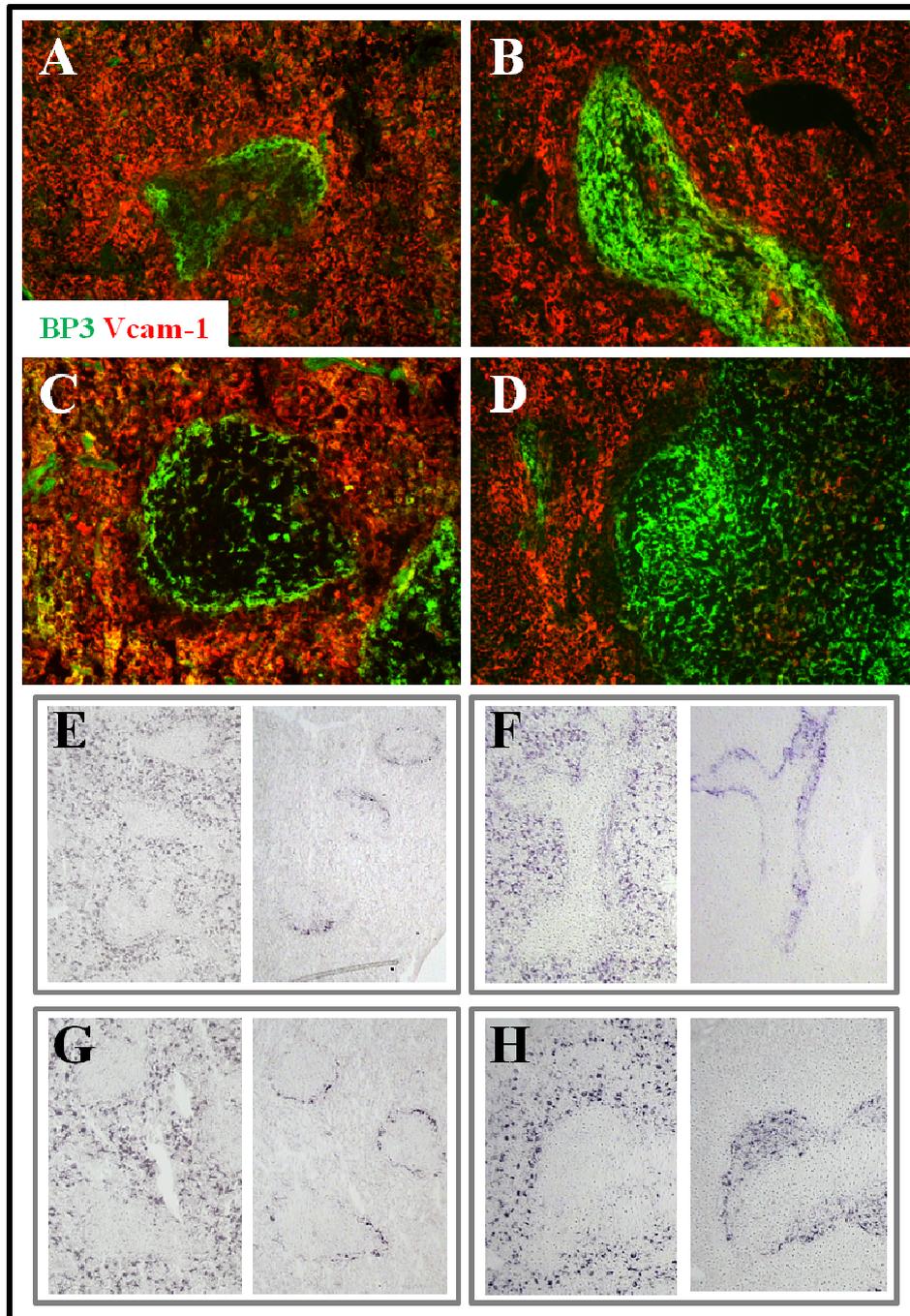


Abb. 26: Differenzielle Genexpression in Stromazellen der Roten und Weißen Pulpa von B- und T-Zell-defizienten Rag1^{-/-} (A+E) und SCID (B+F), sowie B-Zell-defizienten JHT (C+G) und T-Zell-defizienten TCRβδ^{-/-} (D+H) Milz. (A-D) Fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte: Vcam-1 (rot) und BP3 (grün). 200-fache Vergrößerung. (E-F) *In situ*-Hybridisierung von Milzen mit spezifischen Sonden für Coch (jeweils links) und CXCL13 (jeweils rechts) auf konsekutiven Gefrierschnitten. 100-fache Vergrößerung.

3.3.1 Die Rolle von Lymphozyten in der Differenzierung des stromalen Immunkompartiments

Durch Analyse von B- und/oder T-Zell-defizienten Mäusen kann der Einfluss von Lymphozyten auf die Differenzierung der stromalen Milzkompartimente und besonders des folliculären Stromas zu FDC beobachtet werden. Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen das Fehlen von B- und/oder T-Zellen auf die Differenzierung der Weißen Pulpa und ins Besondere auf die Entwicklung von FDC hat. Hierbei wurden T-Zell-defiziente $\text{TCR}\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse⁵⁵, B-Zell-defiziente JHT-Mäuse⁵⁶, sowie B- und T-Zell-defiziente Mäuse ($\text{Rag1}^{-/-}$, SCID)^{53,54} mittels Immunhistologie und *in situ*-Hybridisierung analysiert und mit wt verglichen.

Die Milzen aller vier lymphopenischen Mausstämme zeigten eine deutliche Trennung der Roten und Weißen Pulpa. Wie in wt war die Rote Pulpa durch die Expression von Vcam-1 und Coch und die Weiße Pulpa durch den stromalen Marker BP3 definiert (Abb. 26). Umgeben war das BP3^+ Stroma der analysierten Mausstämme von Marginalsinus-markierenden MOMA-1^+ Metallophilen Makrophagen (Abb. 27). Die Analysen vom wt befinden sich zum Vergleich in Abschnitt 3.2.2.

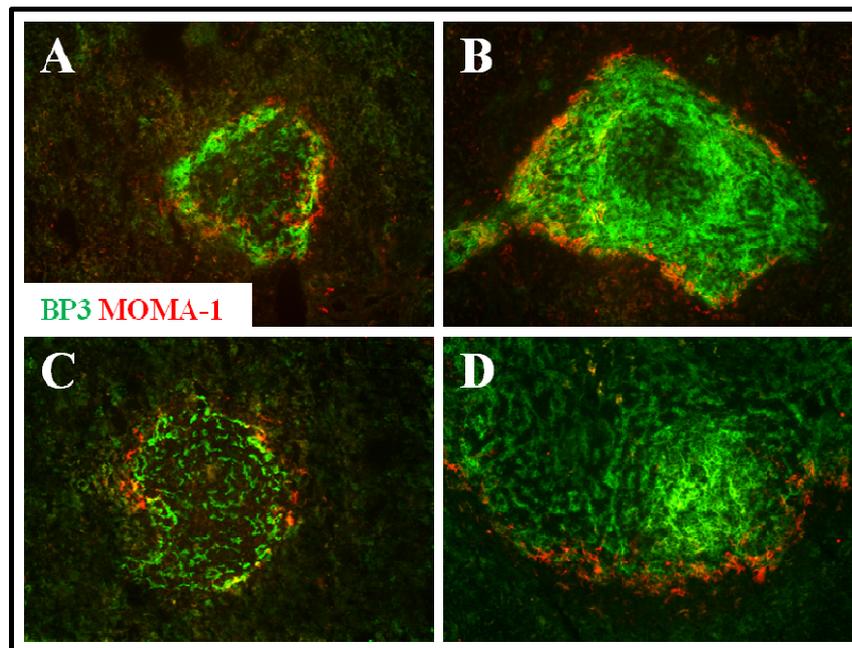


Abb. 27: Entwicklung des Marginalsinus von B- und T-Zell-defizienten $\text{Rag1}^{-/-}$ (A) und SCID (B), sowie B-Zell-defizienten JHT (C) und T-Zell-defizienten $\text{TCR}\beta\delta^{-/-}$ (D) Mäusen. Fluoreszenzgefärbt ist BP3 (grün) und MOMA-1 (rot). 200-fache Vergrößerung.

3.3.1.1 Entwicklung der Milz in Lymphozyten-defizienten Mäusen

(1) RAG1^{-/-}: Trotz Lymphozyten-Defizienz differenziert das Stroma der Weißen Pulpa

Das Fehlen von Lymphozyten in RAG1^{-/-} hatte ausgeprägte Folgen für die Entwicklung der Milz. So war die Weiße Pulpa in ihrer Größe reduziert und wies eine nicht ausdifferenzierte Struktur auf. Das Stroma der Weißen Pulpa bestand aus BP3^{schwach} Zellen, eingefasst von einem Ring aus BP3^{stark}-exprimierenden Zellen. Dieses BP3^{stark} Stroma war außerdem positiv für Madcam-1 und zeigte dadurch die Charakteristika von Stromazellen des Marginalsinus. Diese Zellen exprimierten zudem CXCL13 und schwach Biglycan und Enpp2 (Abb. 28 und 29). Die Expression von Serpina1, Cilp, Lrat, Periostin und RIKEN cDNA 9130213B05 konnte nicht nachgewiesen werden und CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC waren nicht differenziert (Daten nicht gezeigt).

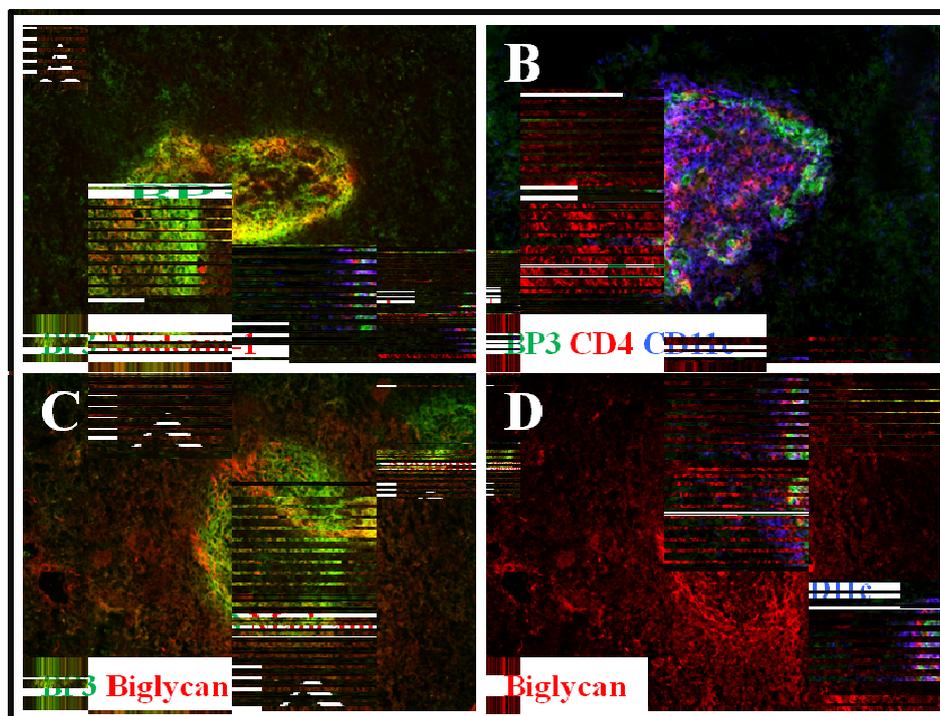


Abb. 28: Kompartimentierung der Milz von Rag1^{-/-} Mäusen. (A-D) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der Milz. (C+D) dieselbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Gegenfärbung mit BP3. 200-fache Vergrößerung.

Die Expression der T-Zonen-Chemokine CCL21 und CCL19 wurden im Gegensatz zu wt nur in der BP3^{schwach} Zone der Milz detektiert, sondern in der gesamten Weißen Pulpa. Folglich überlappte die Expression von CCL19 und CCL21 mit der Expression von CXCL13 des BP3^{stark}-Stromas (Abb. 29). In der Weißen Pulpa lokalisierten Dendritische Zellen (CD11c⁺) und einige LTi (CD4⁺ CD3⁻) (Abb. 28B).

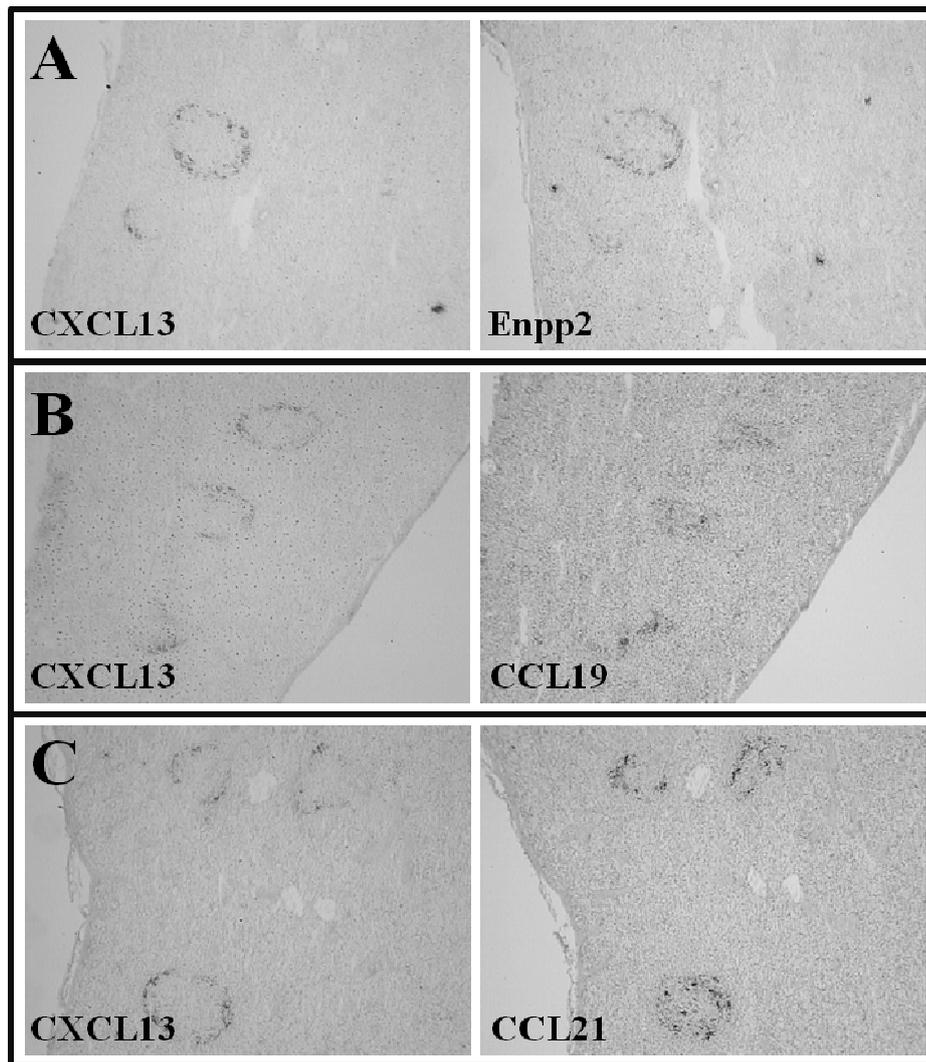


Abb. 29: Kompartimentierung der Weißen Pulpa von Rag1^{-/-} Mäusen. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A-C, links), Enpp2 (A, rechts), sowie CCL19 (B, rechts) und CCL21 (C, rechts) auf konsekutiven Gewebsschnitten der Milz. 100-fache Vergrößerung.

(2) SCID: Die Milz besitzt Follikel-ähnliche B-Anlagen

Überraschend war die unterschiedliche Entwicklung der Weißen Pulpa von Rag1^{-/-} und SCID-Mäusen. Obwohl beide Mausstämme T- und B-Zell-defizient sind, unterschieden sich beide phänotypisch.

In der Milz einer SCID war die BP3^{stark}-exprimierende B-Anlage follikel-ähnlich ausgeprägt und umgab die BP3^{schwach} T-Anlage. Madcam-1 wurde vom gesamten BP3^{stark}-Stroma exprimiert, fand aber seine höchste Expression in den Stromazellen des Marginalsinus (Abb. 30). BP3^{stark} Stromazellen waren außerdem positiv für CXCL13, Biglycan und Enpp2 (Abb. 30 und 31).

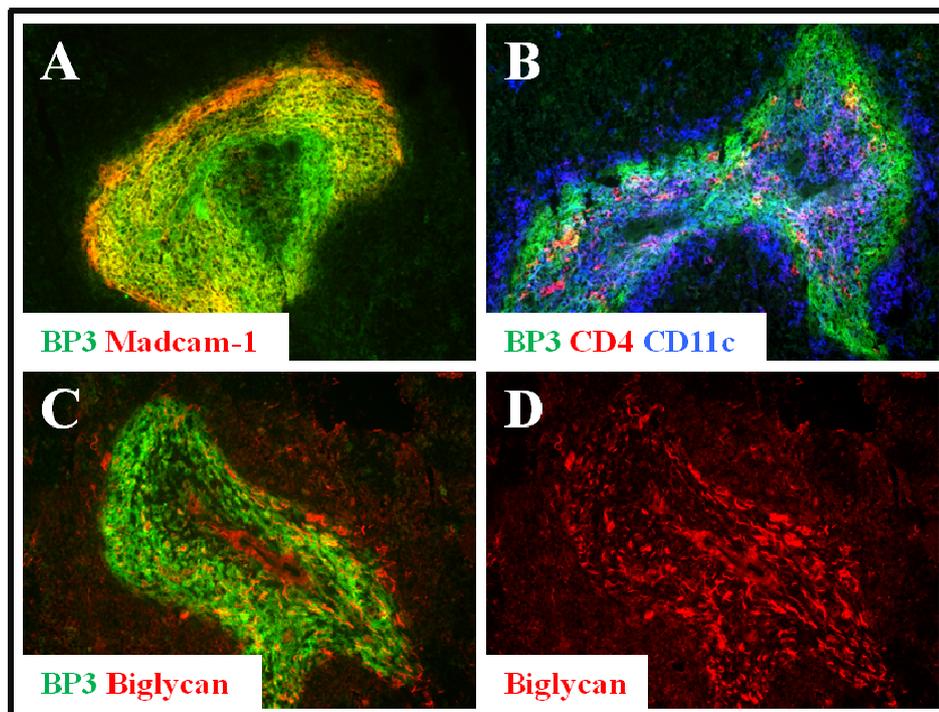


Abb. 30: Kompartimentierung der Milz von SCID Mäusen. (A-D) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der Milz. (C+D) Dieselbe Aufnahme, mit (C) und ohne (D) Gegenfärbung mit BP3. 200-fache Vergrößerung.

Die charakteristischen Chemokine der T-Zonen CCL19 und CCL21 wurden sowohl in der T-Anlage als auch in der B-Anlage detektiert. Im Gegensatz zu CCL21, dessen Expressionsniveau in B- und T-Anlage vergleichbar war, wurde CCL19 deutlich niedriger

von den Stromazellen der B-Anlage exprimiert (Abb. 31). Wie auch in RAG1^{-/-} konnte die Expression von *Serpina1*, *Cilp*, *Lrat*, *Periostin* und RIKEN cDNA 9130213B05 und Differenzierung von FDC in der SCID-Milz nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In der Weißen Pulpa lokalisierten vorwiegend Dendritische Zellen und LTi (Abb. 30B).

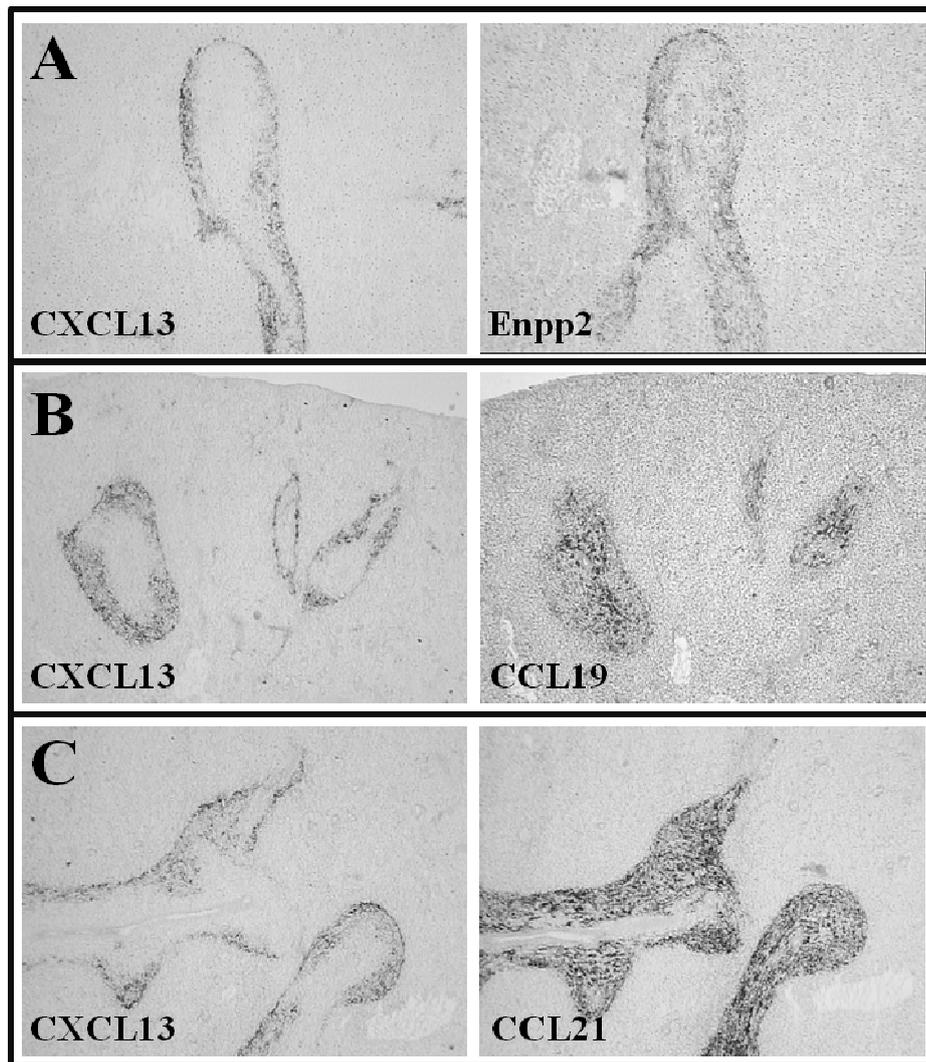


Abb. 31: Kompartimentierung der Weißen Pulpa von SCID Mäusen. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A-C, links), Enpp2 (A, rechts), sowie CCL19 (B, rechts) und CCL21 (C, rechts) auf konsekutiven Gewebsschnitten der Milz. 100-fache Vergrößerung.

3.3.1.2 Die Entwicklung der Milz in T- bzw. B-Zell-defizienten Mäusen

(3) TCR $\beta\delta$ -/-: B-Zellen alleine genügen nicht zur vollständigen Differenzierung des folliculären Stromas

Trotz des Fehlens von T-Zellen in TCR $\beta\delta$ -/- waren keine Anomalitäten in der Kompartimentierung der Weißen Pulpa auffällig. Das Stroma der Weißen Pulpa T-Zell-defizienter Mäuse war wie bei wt in eine BP3^{stark} Bgn^{stark} und BP3^{schwach} Bgn^{schwach} Zone segregiert (Abb. 32). Die BP3^{stark}-Zone wies charakteristische Merkmale einer differenzierten B-Zone durch die Präsenz von B-Zellen und CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC aus (Abb. 32C). Die BP3^{schwach} Zone bildete aufgrund des Fehlens von T-Zellen eine freie Nische für Dendritische Zellen und LTi (Abb. 32B).

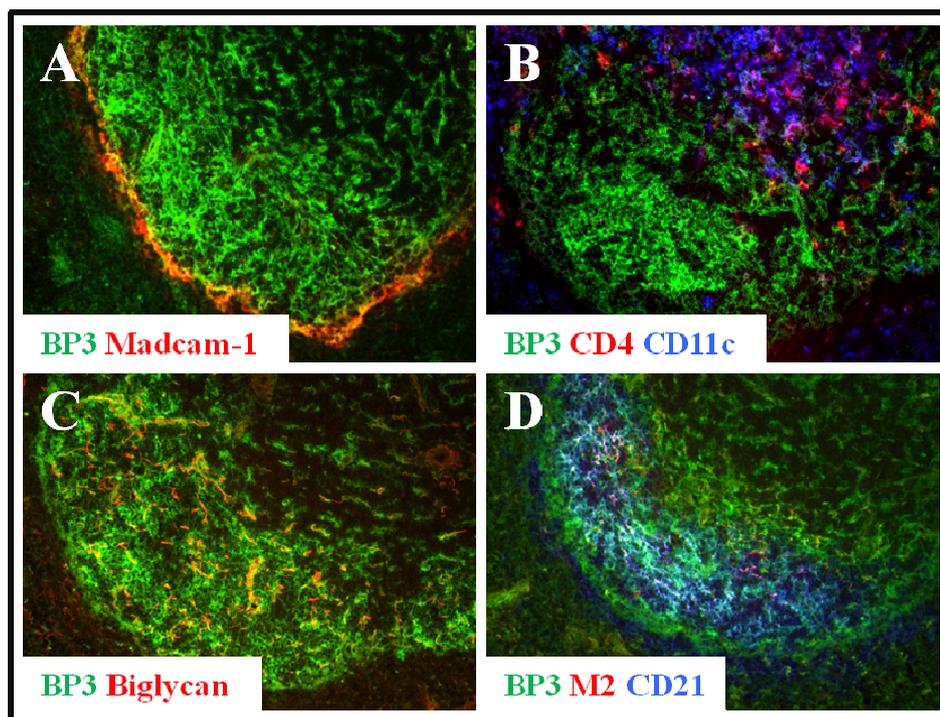


Abb. 32: Kompartimentierung der Milz von TCR $\beta\delta$ -/- Mäusen. Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der Milz. 200-fache Vergrößerung.

Die Expression von CXCL13, Enpp2, Cilp, Coch, Lrat, Periostin und RIKEN cDNA 9130213B0 entsprach dem wt (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigte die schwache

Expression von Serpina1 der *in situ*-Hybridisierung, dass trotz vorhandener B-Zell-Signale die Stromazellen der B-Zonen nur unvollständig ausdifferenzierten (Abb. 33A). Trotz des Fehlens von T-Zellen besaß die T-Zone eine vergleichbare Größe wie in wt und die Stromazellen der T-Anlage zeigten T-Zonen-typische Expression der Chemokine CCL21 und CCL19 (Abb. 33).

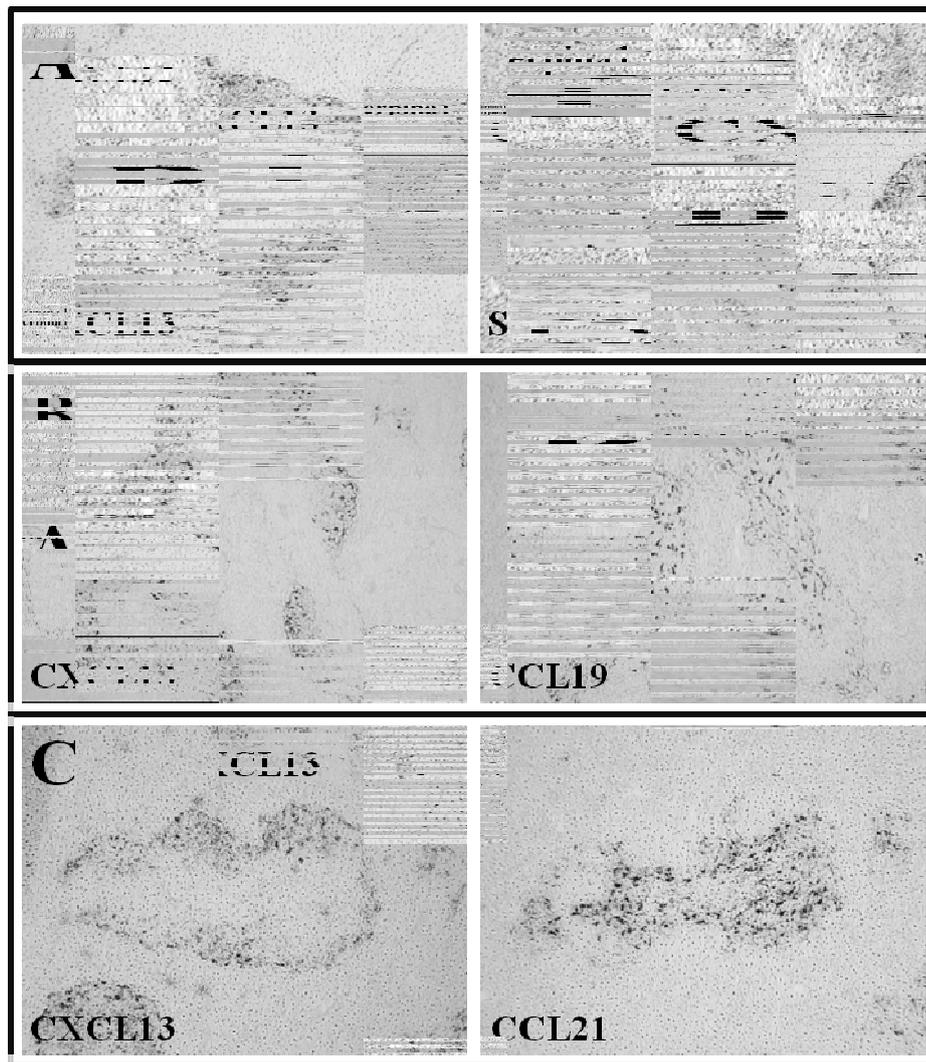


Abb. 33: Kompartimentierung der Weißen Pulpa von TCR β ^{-/-} Mäusen. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A-C, links), Serpina1 (A, rechts), sowie CCL19 (B, rechts) und CCL21 (C, rechts) auf konsekutiven Gewebsschnitten der Milz. 100-fache Vergrößerung.

(4) JHT: Einfluss der T-Zellen auf die Entwicklung des B-Zell-Stromas

Obwohl JHT-Mäuse im Vergleich zu RAG1^{-/-} T-Zellen besitzen, hatten diese beiden Mausstämmen große strukturelle Übereinstimmungen in der Milz: die Weiße Pulpa bestand aus BP3^{schwach}-, eingefasst von einem Ring aus BP3^{stark}-exprimierenden Stromazellen. Das BP3^{stark} Stroma war auch positiv für Madcam-1, Biglycan, CXCL13 und schwach Enpp2 (Abb. 34). CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC waren nicht differenziert (Daten nicht gezeigt).

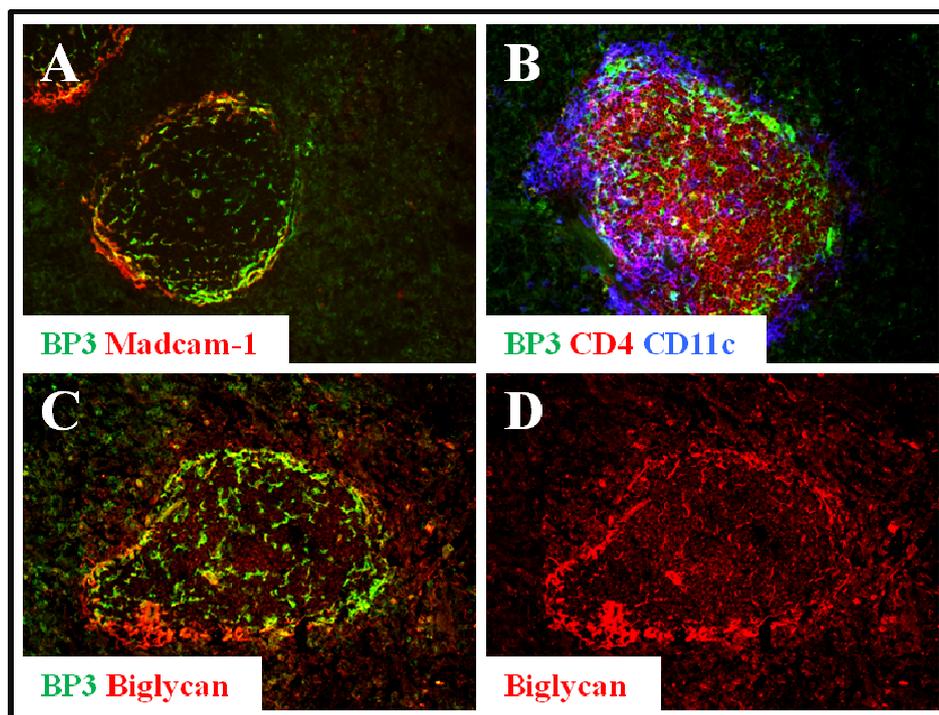


Abb. 34: Kompartimentierung der Milz von JHT Mäusen. (A-D) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der Milz. (C+D) Dieselbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Gegenfärbung mit BP3. 200-fache Vergrößerung.

Wie in Rag1^{-/-} beobachtet, exprimierten Stromazellen der gesamten Weißen Pulpa CCL19 und CCL21 und die Stromazellen der B-Anlage zusätzlich CXCL13. Obwohl wie in Rag1^{-/-} auch Cilp, Lrat, Periostin und RIKEN cDNA 9130213B05 nicht detektierbar waren (Daten nicht gezeigt), konnte in der B-Zell-defizienten Milz ein eindeutiges Signal für Serpina1 in den BP3^{stark} CXCL13⁺ Stromazellen nachgewiesen werden (Abb. 35). In der Weißen Pulpa lokalisierten T-Zellen sowie einige Dendritische Zellen und außerhalb des Marginalsinus Dendritische Zellen und LTi (Abb. 34B).

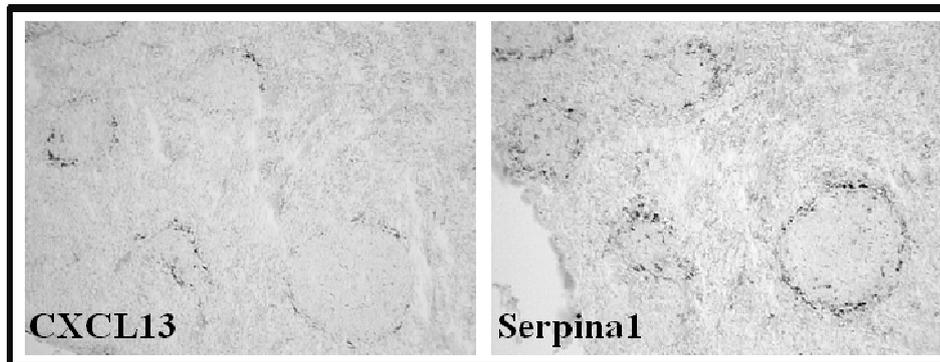


Abb. 35: Kompartimentierung der Weißen Pulpa von JHT Mäusen. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (links) und Serpina1 (rechts). 100-fache Vergrößerung.

3.3.1.3 Expression von T- und B-Zell-Chemokinen in unvollständig differenzierten Stromazellen der B-Anlage

In einer ausdifferenzierten Milz exprimieren Stromazellen der T-Zone CCL21 und CCL19 und Stromazellen und FDC der B-Zone CXCL13. *In situ*-Hybridisierungen mit CCL21, CCL19 und CXCL13 auf Milz-Gefrierschnitten Lymphozyten-defizienter Mäuse zeigte zwar eine typische Expression von CCL21 und CCL19 im BP3^{schwach} Stroma der T-Anlage, aber dafür eine kolokalisierende Expression von CCL19, CCL21 und CXCL13 in der B-Anlage.

Für die Beantwortung, ob Stromazellen T- und B-Zonen-Chemokine koexprimieren oder Stromazellen mit unterschiedlicher Expression nebeneinander lokalisieren, wurden Doppel-*in situ*-Hybridisierungen mit CCL21 und CXCL13 auf Milzschnitten von SCID und zur Kontrolle von wt durchgeführt.

Die Analyse zeigte einen klaren Unterschied zwischen wt und SCID. Im Gegensatz zu FDC-tragenden wt, wo die Expression beider Chemokine zellulär und lokal getrennt war, koexprimierten Stromazellen der B-Anlage in FDC-defizienten SCID B- und T-Zonen-Chemokine (Abb. 36).

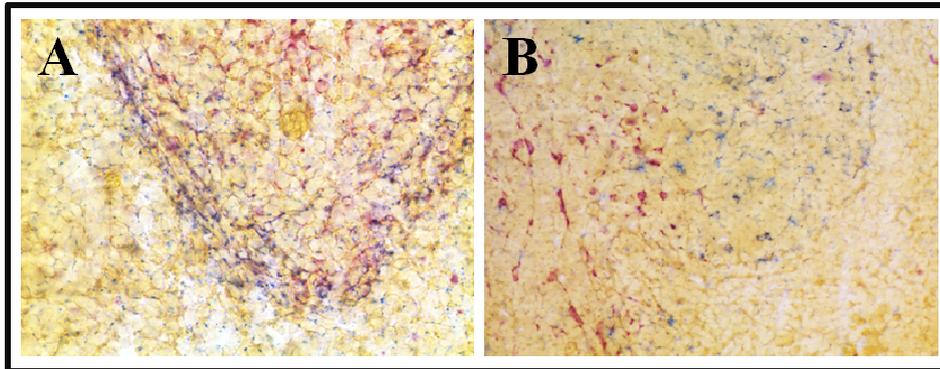


Abb. 36: Doppel-*in situ*-Hybridisierung von Milzschnitten von SCID-Mäusen (A) und wt (B) mit spezifischen Sonden für CXCL13 (blau) und CCL21 (rot). 200-fache Vergrößerung.

3.3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein vollständiger Verlust von Lymphozyten keine Auswirkung auf die Segregation der Milz in Rote und Weiße Pulpa hatte. Auch innerhalb der Weißen Pulpa erfolgte eine Kompartimentierung, wie anhand von Markern wie BP3, Biglycan und Enpp2 gezeigt wurde. Aufgrund des Fehlens von B- und/oder T-Zellen wurden die freien Nischen der stromalen B- und/oder T-Anlagen hauptsächlich von Dendritischen Zellen und LT_i besiedelt.

Obwohl T- und B-Zellen in SCID und Rag1^{-/-} fehlten, wurden die typischen stromalen Chemokine der T-Zone CCL19 und CCL21, sowie der B-Zone CXCL13 exprimiert. Überraschend war jedoch, dass das Stroma der B-Anlagen nicht nur das B-Zonen-Chemokin CXCL13, sondern auch die T-Zonen-Chemokine CCL19 und CCL21 exprimierte.

Der Vergleich der lymphopenen Tiere demonstrierte den unterschiedlichen Einfluss, den B- und T-Zellen auf die Entwicklung der Weißen Pulpa und ins Besondere der Stromazellen der B-Zone haben. Es wurde deutlich, dass Tiere mit B-Zell-Defizienz schwerwiegendere Entwicklungsdefizite aufwiesen als solche, bei denen nur T-Zellen fehlten. So waren FDC nur in T-Zell-defizienten Milzen, nicht aber in Milzen, wo auch B-Zellen fehlten, nachweisbar. Darüberhinaus konnte beobachtet werden, dass B-Zellen nicht nur die Entwicklung der stromalen B-Zone, sondern auch T-Zone steuern. Reziprok beeinflussten Signale von T-Zellen nicht nur die Differenzierung des Stromas der T-Zone,

sondern auch der B-Zone. In Tabelle 10 ist die Kompartimentierung und Expression wichtiger FDC-Marker gegenüber gestellt.

Tabelle 10: Der Einfluss von Lymphozyten auf die Differenzierung der Milz

	Wildtyp	TCR$\beta\delta$-/-	JHT	RAG1-/-	SCID
rote und weiße Pulpa	+	+	+	+	+
weiße Pulpa-Kompartimente	+	+	+	+	+
BP3 ^{stark}	B-Zone	B-Zone	B-Anlage	B-Anlage	B-Anlage
BP3 ^{schwach}	T-Zone	T-Anlage	T- Zone	T-Anlage	T-Anlage
BP3 ^{stark} Zone	Follikel- struktur mit FDC	Follikel- struktur mit FDC	ringförmig und Madcam ⁺	ringförmig und Madcam ⁺	Follikel- ähnlich und Madcam ⁺
MOMA-1	+	+	schwach	schwach	+
CXCL13	B- Zone	B- Zone	B-Anlage	B-Anlage	B-Anlage
CCL21/CCL19	T- Zone	T- Anlage	T- und B- Zone/Anlage	T - und B- Anlage	T- und B- Anlage
Biglycan - B-Zone/Anlage - T-Zone/Anlage	stark schwach	stark schwach	stark schwach	schwach -	stark schwach
Enpp2	+	+	schwach	schwach	+
Serpina1	+	schwach	-	-	-
Cilp	schwach	schwach	-	-	-
Lrat	schwach	schwach	-	-	-
RIKEN cDNA 9130213B05	schwach	schwach	-	-	-
Periostin - Keimzentrum	schwach +	- *	- *	- *	- *

Coch					
- rote Pulpa	+	+	+	+	+
- weiße Pulpa	schwach	-	-	-	-
- Keimzentrum	+	*	*	*	*

* Tierstämme bilden keine Keimzentren

3.3.2 Expressionsmuster von FDC und stromalen B-Anlagen in SCID

Trotz Lymphozyten-Defizienz zeigten das Stroma der B-Anlage in SCID und FDC eine überraschend hohe Konkordanz in der Expression von Genen (Tabelle 10) und Kompartimentierung der Milz (Abb. 37). Hingegen fehlten die Expression der FDC-typischen Gene CD21 und das FDC-M2-Antigen, sowie Serpina1. Für eine globale Analyse der Genexpression und Vergleich mit der Genexpression in FDC, wurden Microarrays von B-Anlagen angefertigt.

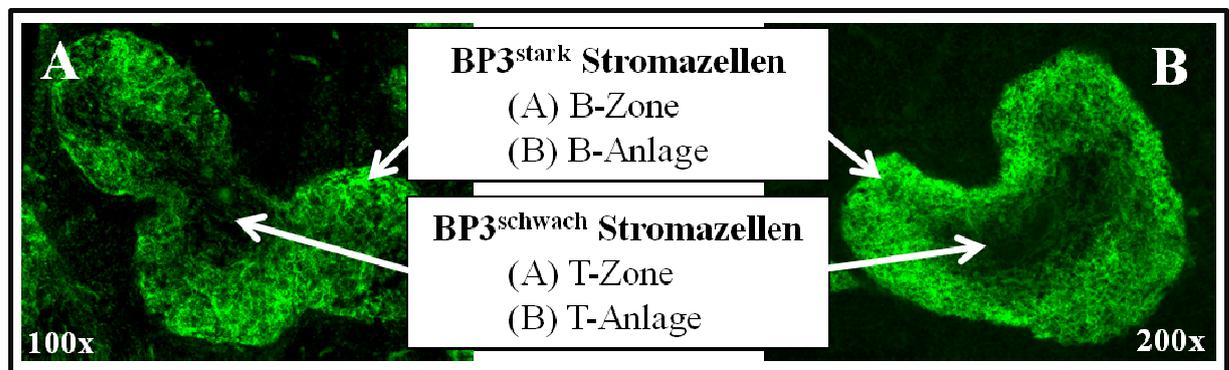


Abb. 37: Das Stroma der Weißen Pulpa von wt (A) und SCID (B) zeigen eine vergleichbare Kompartimentierung. Fluoreszenzfärbung von Gewebsschnitte der Milz mit BP3 (grün).

Für eine umfassende Identifizierung von Genen, die in der stromalen B-Anlage (BP3^{stark} Stromazellen) von B-Zell-defizienten SCID und FDC von wt gleich und unterschiedlich exprimiert werden, wurde das Transkriptom der BP3^{stark} Stromazellen in SCID mittels Microarray-Analysen untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte von SCID-Milzen gefärbt, die B-Anlage (BP3^{stark} Stromazellen) dissektiert, die RNA isoliert, amplifiziert und auf

Microarrays hybridisiert. Es wurden Duplikate angefertigt und mit Microarray-Daten von FDC-Netzwerken verglichen.

Für die Identifizierung von FDC-Genen wurden B-Zell-Gene und *housekeeping*-Gene aus den Präparationen der FDC-Netzwerke mittels Bioinformatik ausgeschlossen (Abschnitt 3.1.3.3). Um das Expressionsmuster der Stromazellen in B-Anlagen und FDC vergleichen zu können, wurden von den Stroma-Präparationen auch Gene, die in B-Zellen exprimiert werden und somit u.a. auch *housekeeping*-Gene sind, subtrahiert.

Dazu wurden zuerst Gene ausgeschlossen, die auch in den B-Zell-Präparationen detektiert (*present*) wurden und eine Signalstärke von ≥ 100 hatten. Zur Eliminierung von Genen ohne signifikanter Signalstärke, wurden Stroma-Kandidaten-Gene ausgewählt, die in $\geq 75\%$ der Vergleiche der B-Anlagen mindestens 3-fach höher (*Signal Log Ratio* $> 1,58$) exprimiert waren als in B-Zellen. Zusätzlich mussten diese Gene als *Change Call* ein *Increase* (Anstieg) aufweisen.

Kandidaten-Gene mussten außerdem auf beiden B-Anlage-Microarrays als *present* oder *marginal* detektiert worden sein. Gene mit einer Signalstärke ≤ 300 wurden vernachlässigt. Die Liste der Gene umfasste somit 541 Kandidaten-Gene.

Die Ontologie der 541 Kandidaten-Gene der stromalen B-Anlage wurde mit Hilfe der DAVID-Datenbank analysiert. Dabei wurden die Gene unter verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet. Etwa 30% der Gene zählten zu den extrazellulären Proteinen (entweder sezerniert oder mit einer extrazellulären Region), wovon ca. 7% Matrixproteine waren. Funktionell sind die Gene in Zellmetabolismus (20%), Entwicklungsprozessen (18%), Zytoskelett (8%), Zellmigration (6%), Zelltod (5%), Zellzyklus (4%) und immunologischen Prozessen (1%) involviert.

Die Microarrays von B-Anlagen und primären FDC (FDC Tag 0) wurden hinsichtlich der 541 Gene mittels der GCOS-Software untereinander verglichen und die *Signal Log Ratio* ermittelt.

Bei der anschließenden Auswertung musste berücksichtigt werden, dass bei der Isolierung von FDC-Netzwerken viele B-Zellen mitisoliert wurden. Hingegen befanden sich in den Stromazellen der B-Anlagen kaum andere Zelltypen. Die Konsequenz war, dass die RNA

der FDC aufgrund mitisolierter B-Zellen stärker durch „fremde“ RNA verdünnt war als die RNA der Stromazellen der B-Anlage. Dies führte zu einer Verminderung der Signalstärke der FDC-exprimierten-Gene. Deutlich wurde dieser Effekt durch Errechnung des Median der *Signal Log Ratio* zwischen B-Anlage- und FDC-Netzwerk-Präparationen für die 541 Gene. Dieser lag nicht wie typisch für eine Normalverteilung bei Null, sondern bei 1,7. Dies bedeutet, dass die FDC-RNA in den FDC-Netzwerk-Präparationen 1,7fach verdünnter war, als die Stromazell-RNA in den B-Anlagen. Um eine Aussage über stärker, schwächer und gleich exprimierte Gene zwischen den beiden Präparationen treffen zu können, wurden die *Signal Log Ratio* um 1,7 extrapoliert. Als gleich exprimiert wurden Gene beider Präparationen beurteilt, die einen Unterschied von $\leq 1,5$ fach ($SLR \pm 0,58$) zeigten. In Abbildung 38 sind die *Signal Log Ratio* (vor Extrapolation) der B-Anlage-Stromazellen und FDC graphisch dargestellt.

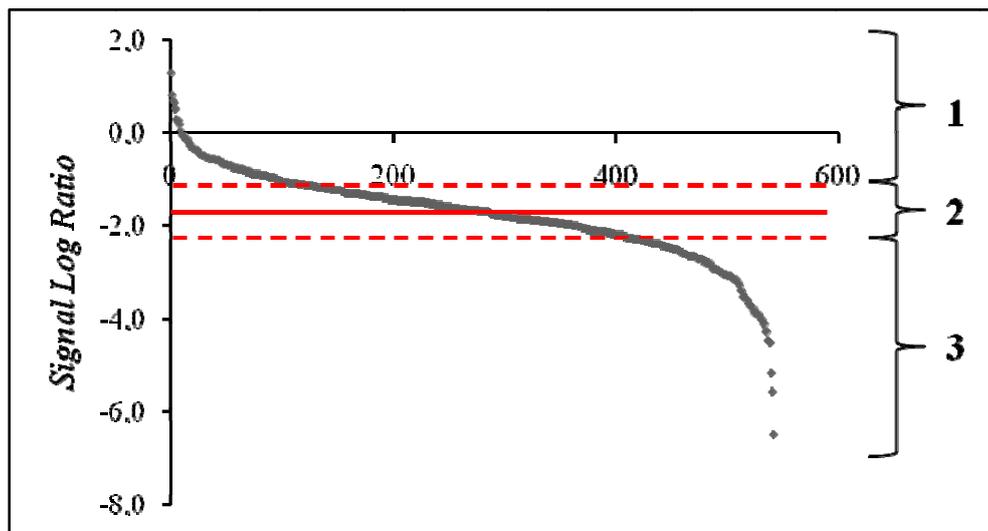


Abb. 38: Korrelation der *Signal Log Ratio* von Stromazellen der B-Anlage (SCID) und FDC (wt). 1 = höher in FDC exprimiert, 2 = in FDC und Stromazellen der B-Anlage gleich exprimiert, 3 = höher in Stromazellen der B-Anlage, X-Achse = 541 durchnummerierten Gene, rote durchgehende Linie = Median, rote gestrichelte Linie = Median \pm 1,5-fach reguliert.

Von den 541 Genen wurden 303 als gleich exprimiert und 238 als unterschiedlich exprimiert zwischen FDC und Stromazellen der B-Anlage eingeordnet. Unter den 106 Genen, die in FDC höher exprimiert wurden befanden sich z.B. CXCL13, Periostin, Lrat, Enpp2, Coch, Prion-Protein, Dsg2, Gja2 und Clusterin. In der Gruppe der 132 Gene, die

in stromalen B-Anlagen höher exprimiert wurden, befanden sich z.B. CCL21, CCL19, Edg2, IL7R und BAFF (Anhang, Tabelle 18). FDC-Spezifische Gene wie *Serpina1* und *Cilp* fehlten in der Liste, da sie in Stromazellen der B-Anlage nicht exprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Daten zeigten, dass das Expressionsmuster der Stromazellen der B-Anlagen und FDC im wt einen hohen Grad an Übereinstimmung aufwiesen. Nur 30 der 541 Gene (6%) wurde nicht in den FDC-Präparationen detektiert. Es kann somit angenommen werden, dass die Interaktion zwischen Lymphozyten und Stromazellen das Expressionsniveau der identifizierten Gene reguliert, wodurch lokale Stromazellen zu FDC differenzieren.

3.3.3 Die Entwicklung des Immunkompartiments der neonatalen Milz

Die Milz übernimmt als Immunorgan primär die Aufgabe Pathogene zu bekämpfen, die sich über das Blut im Körper verbreiten. In Mäusen ist die Milz ab Embryonaltag 10.5 (E10.5) detektierbar und wird ab Tag E13.5 von LT_i und ab Tag E16.5 von Lymphozyten besiedelt. Ein signifikanter Anstieg von Lymphozyten ist erst postnatal zu verzeichnen^{123,124}.

Obwohl viele der für eine normale Milzentwicklung essentiellen Faktoren, wie Lymphozyten, Chemokine und das LT/TNF-System, bekannt sind, ist die Beschreibung der neonatalen Milzentwicklung mit der schrittweisen Differenzierung von FDC noch sehr lückenhaft^{45,52}.

3.3.3.1 Die neonatale Entwicklung der Milz im Wildtyp

Um Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Lymphozyten-vermittelten Signalen und Differenzierung des stromalen Immunkompartiments bis hin zur Entwicklung von FDC zu erhalten, wurde die Entwicklung der Milzen neugeborener Mäuse analysiert.

Neben bereits etablierten Stroma- und FDC-Markern wie die BP3, CD21, Vcam-1, Madcam-1, CXCL13 und CCL21, sollten auch die neu definierten FDC-Gene wie

Biglycan, Serpina1, Enpp2, Lrat, RIKEN cDNA 9130213B05 und Cilp Auskunft über die verschiedenen Entwicklungsstufen des stromalen Kompartiments geben.

Tag 1 postnatal: Biglycan als neuer Marker für die neonatale weiße Pulpa

In der Milz adulter Mäuse lokalisieren in der perivaskulären Zone dicht gepackte T-Zellen, die follikelartig von B-Zellen umgeben sind. Wie schon in früheren Analysen von Friedberg *et al.* konnten in neonatalen Milzen am Tag 1 keine CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden⁵⁰. Stattdessen akkumulierten in der perivaskulären Region locker gepackte B-Zellen. Diese B-Zellen exprimierten IgM, wobei eine kleine Subpopulation auch IgD⁺ war (Abb. 39A). Hierbei handelt es sich um unreife B-Zellen, die in FACS-Analysen weder einen follikulären B-Zell-, noch Marginalzonen-B-Zell-Phänotyp zeigten (Daten nicht gezeigt).

LTi, die als erste hämatopoietischen Zellen in die pränatale Milz einwandern⁴⁴, kolokalisierten mit den B-Zellen in unmittelbarer Umgebung der Arteriolen (9F1⁺ Endothel). Eine weitere kleine hämatopoietische Zellpopulation konnte in der B-Zell-Region und in ihrer unmittelbaren Nähe identifiziert werden. Obwohl diese Zellen positiv für den T-Zell-Marker CD3 waren, handelte es sich nicht um reife T-Zellen, da die Expression von CD4 bzw. CD8 fehlte (CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen) (Ab. 39B). Um welchen Zelltyp es sich handelt, ist noch unbekannt.

Das Stroma der Roten Pulpa zeichnet sich wie bei adulten Tieren durch die Expression von Vcam-1 aus. Während das Stroma der Weißen Pulpa einer ausdifferenzierten Milz Vcam-1^{-schwach} ist und sich dadurch klar von dem der Roten Pulpa abhebt, war die weiße Pulpa am Tag 1 postnatal noch durch eine deutliche Vcam-1-Expression definiert. Diese Vcam-1-Expression war aber schon leicht reduziert im Vergleich zu der in der Roten Pulpa (Abb. 39C+D). Eine deutlichere Definition der Weißen Pulpa wurde durch Nachweis des neu identifizierten follikulären Stromamarkers Biglycan erreicht. Da sich die Expression von Biglycan über die gesamte weiße Pulpa erstreckt, kann dieser als neuer Marker für Stromazellen der neonatalen Weißen Pulpa genutzt werden (Abb. 39E). Obwohl sich B-Zellen in der Weißen Pulpa befinden, waren noch keine CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC nachweisbar. Auch BP3, ein Marker für das Stroma von T- und B-Zone in adulten Tieren, war nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

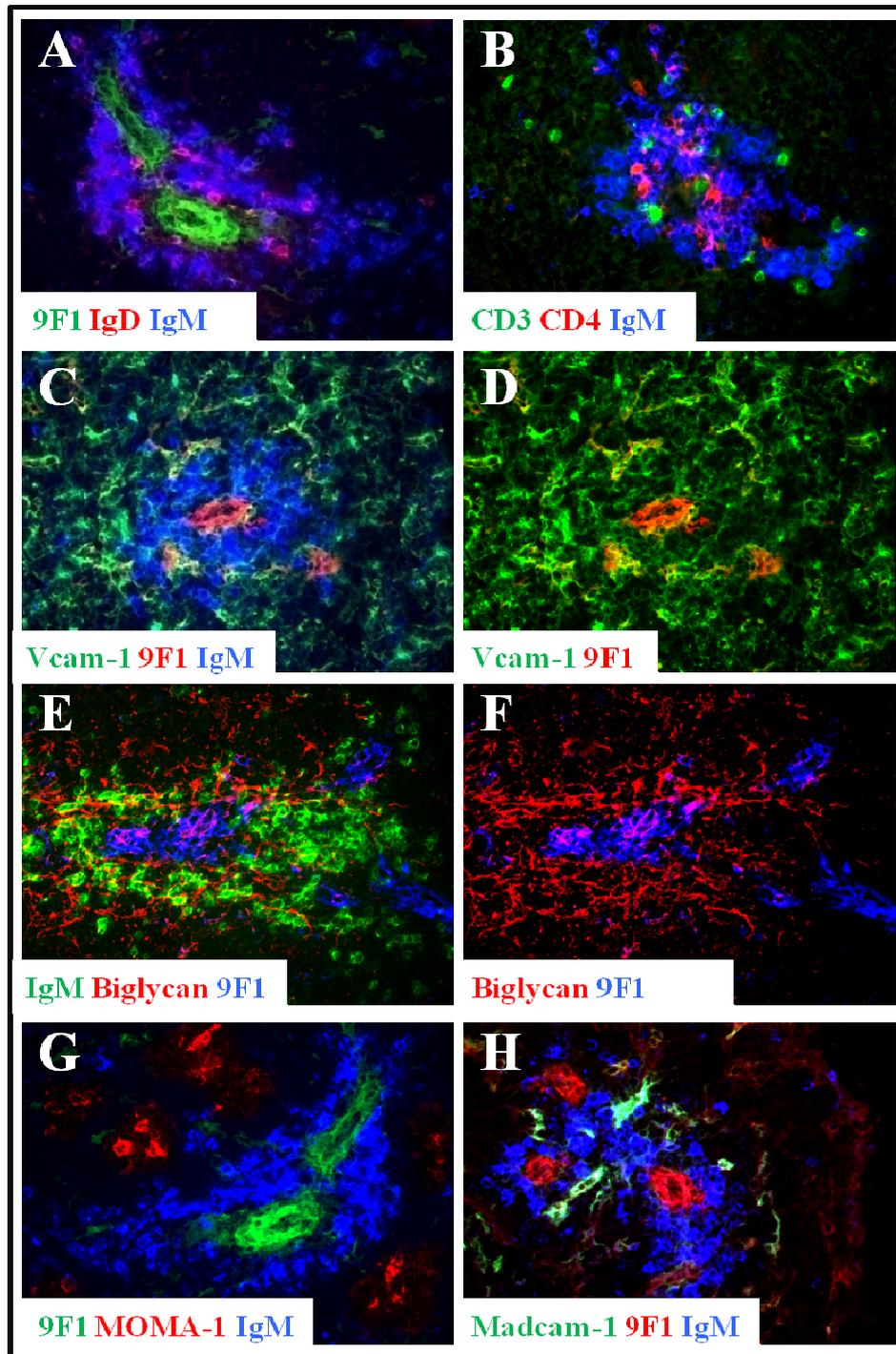


Abb. 39: Entwicklung der Milz Tag 1 postnatal. (A-H) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten. (C+D) Dieselbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Färbung für B-Zellen (blau). (E+F) Selbe Aufnahme, (E) mit und (F) ohne Färbung von B-Zellen (grün). 400-fache Vergrößerung.

Die Expression der Chemokine, die in Adulten von Stromazellen der B-Zone (CXCL13) und T-Zone (CCL21) exprimiert werden, wurde im nächsten Schritt mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Während die Expression von CXCL13 und CCL21 in der ausdifferenzierten Milz räumlich getrennt sind, kolokalisieren CXCL13 und CCL21 in der neonatalen Milz am Tag 1 perivaskulär (Abb. 40). Das Expressionsniveau beider Chemokine war jedoch im Vergleich zu adulten Tieren sehr niedrig.

Ein typischer Marginalsinus in wt wird von MOMA-1⁺ Metallophilen Makrophagen und Madcam-1⁺ Stromazellen gebildet. Solch ein ausdifferenzierter Marginalsinus war in Neugeborenen am Tag 1 nicht nachzuweisen. Stattdessen befanden sich Metallophile Makrophagen in der Roten Pulpa und nur wenige Madcam-1⁺ Zellen in unmittelbarer Nähe der B-Zellen (Abb. 39G+H).

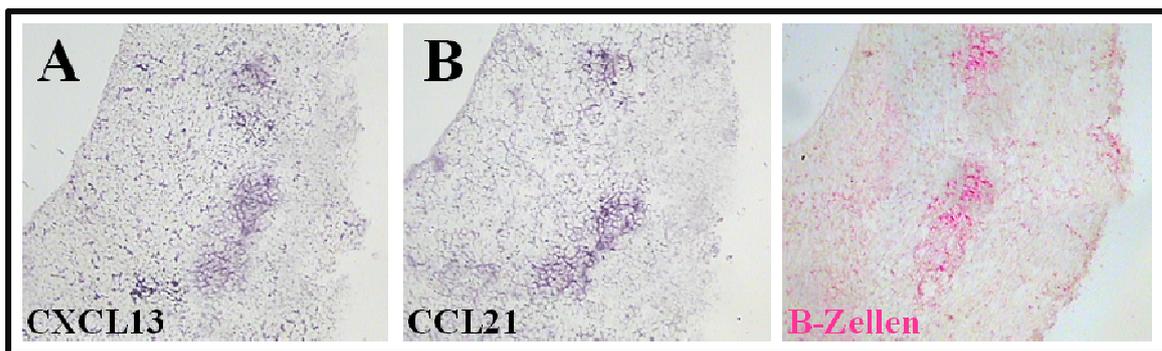


Abb. 40: Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz am Tag 1 postnatal. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A) und CCL21 (B). (C) Immunfärbung mit anti-B220. Konsekutive Gewebsschnitte. 100-fache Vergrößerung.

Tag 3 postnatal: Differenzielle Expression der Chemokine CCL21 und CXCL13

Bis Tag 3 hat sich die Anzahl von IgM⁺ und IgM⁺ IgD⁺ B-Zellen in der Milz deutlich erhöht (Abb. 41A). Parallel zur Expansion der B-Zell-Population regulierten die Stromazellen der Weißen Pulpa Vcam-1 herunter, womit der Unterschied zwischen Roter (Vcam-1⁺) und Weißer Pulpa (Vcam-1^{-/schwach} Bgn⁺) ausgeprägter war (Abb. 41C+D). Darüberhinaus bildeten Madcam-1⁺ Zellen eine ringartige Zellschicht um die weiße Pulpa. Diese Madcam-1⁺ Zellen waren jedoch noch nicht wie bei adulten Tieren in einer dünnen

Zellschicht organisiert, sondern lokalisierten in einer eher breiten Zone, die von B-Zellen besiedelt wurde (Abb. 41B).

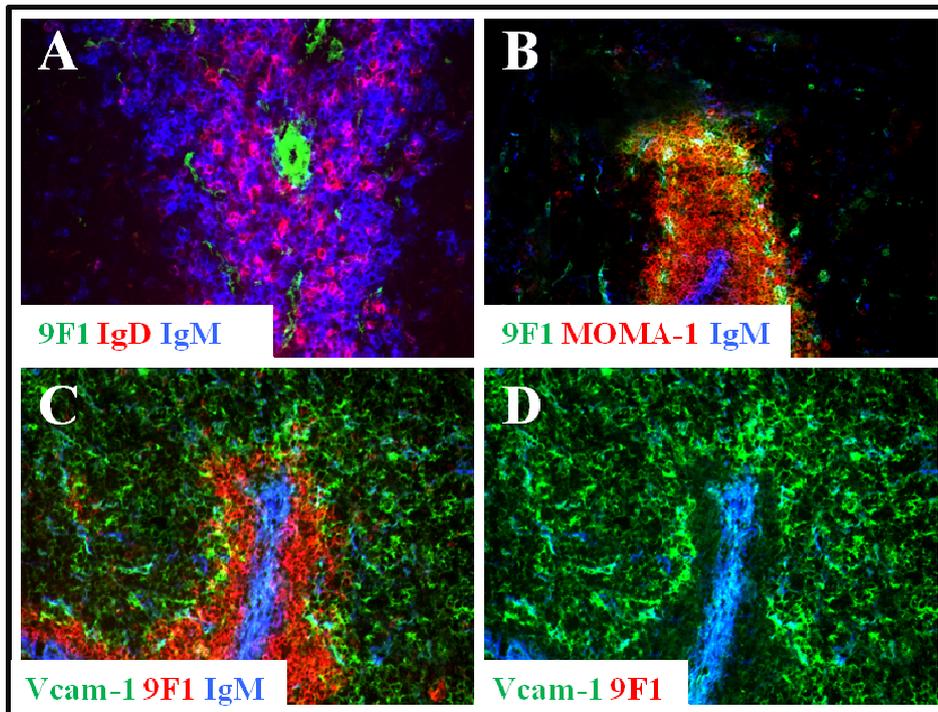


Abb. 41: Entwicklung der Milz Tag 3 postnatal. (A-D) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten. (C+D) Dieselbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Färbung für B-Zellen (rot). 200-fache Vergrößerung.

Obwohl die Weiße Pulpa komplett von B-Zellen und nur ganz vereinzelt von $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen besiedelt wurde, war das Stroma der Weißen Pulpa durch unterschiedliche Expression der Chemokine CCL21 und CXCL13 definiert. Den Großteil der Stromazellen in der Weißen Pulpa exprimierten das T-Zonen-Chemokin CCL21. Nur die Stromazellen, die den äußeren Rand der B-Region bilden ($Madcam-1^+$ Stromazellen) exprimierten CXCL13. Der Übergang von CCL21- zu CXCL13-exprimierendem Stroma war fließend und deutete an, dass ein Teile der Stromazellen beide Chemokine exprimieren (Abb. 42).

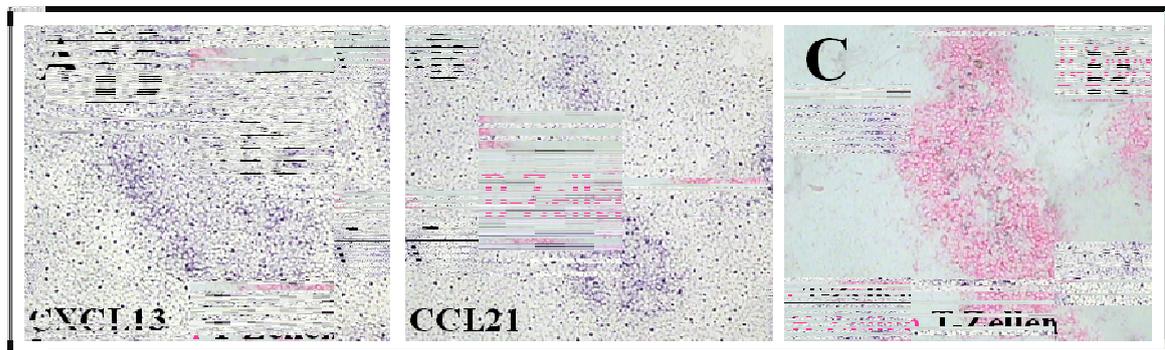


Abb. 42: Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz am Tag 3 postnatal. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A) und CCL21 (B). (C) Immunfärbung mit anti-B220 (rot) und anti-CD3 (T-Zellen). Konsekutive Gewebsschnitte. 100-fache Vergrößerung.

Tag 4 postnatal: Massive Einwanderung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Ein deutlicher Unterschied zu Tag 3 bestand in der signifikant angestiegenen Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen am Tag 4 postnatal. Die immigrierenden T-Zellen vermischten sich jedoch nicht mit den anwesenden B-Zellen, sondern formten gleich nach Einwanderung eine segregierte T-Zell-Region um die Zentralarteriole. Durch Akkumulation der T-Zellen um die Zentralarteriole (9F1⁺ Endothel), wurden die B-Zellen aus ihrer perivaskulären Nische verdrängt und lokalisierten ringförmig um die T-Zell-Region herum. Mit der Einwanderung von T-Zellen verließen wie B-Zellen auch LTi und CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen die nahe Umgebung der Arteriole und waren nur in der B-Zell-, aber nicht in der T-Zell-Region zu finden. Die Mehrheit der B-Zellen, LTi und CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Zellen lokalisierte somit im Madcam-1⁺ Stroma. Eine typische Follikelstruktur hatte sich jedoch noch nicht entwickelt (Abb. 43 A+B).

Obwohl in der ausdifferenzierten Milz Biglycan hauptsächlich von follikulären Stromazellen exprimiert wird, wurde auch nach Einwanderung von T-Zellen in die neonatale Milz Biglycan nicht nur in der B-Zell-Region, sondern in der gesamten Weißen Pulpa detektiert (Abb. 43 C+D).

In einer ausdifferenzierten Milz lokalisieren B-Zellen im CXCL13⁺ Stroma und T-Zellen im CCL21⁺ Stroma. Dies wurde in der neonatalen Milz jedoch nicht beobachtet. Obwohl sich T- und B-Zellen in segregierten Zonen positionierten, exprimierten die Stromazellen

der B-Zell-Region neben CXCL13 auch CCL21. Die T-Zellen hingegen lokalisierten im CCL21^{-/schwach} Stroma (Abb. 44).

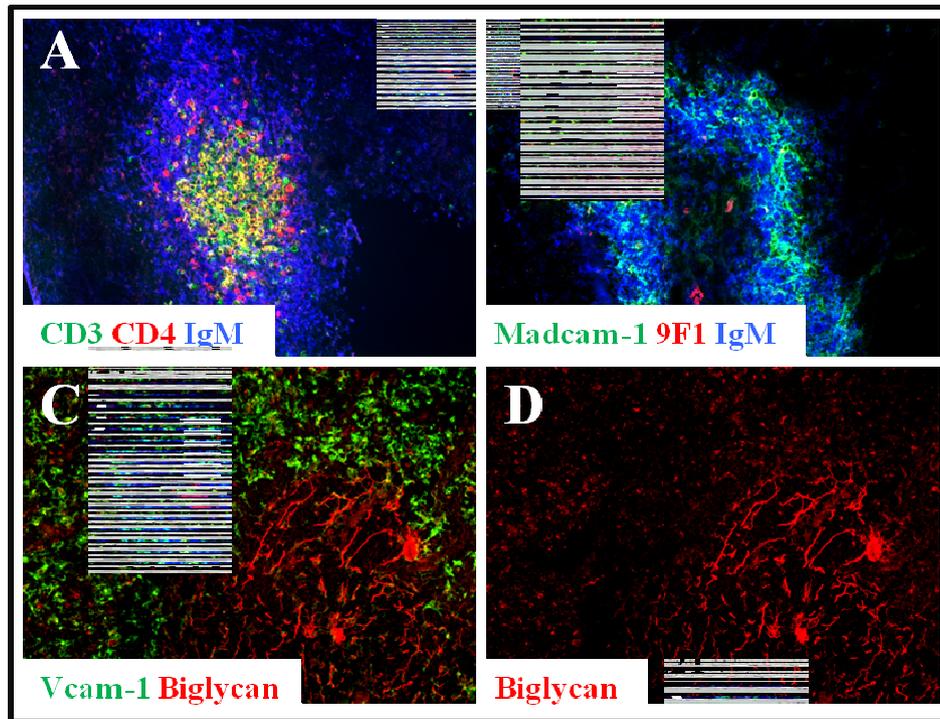


Abb. 43: Entwicklung der Milz Tag 4 postnatal. (A-D) Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten. (C+D) Dieselbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Färbung von Vcam-1 (grün). 200-fache Vergrößerung.

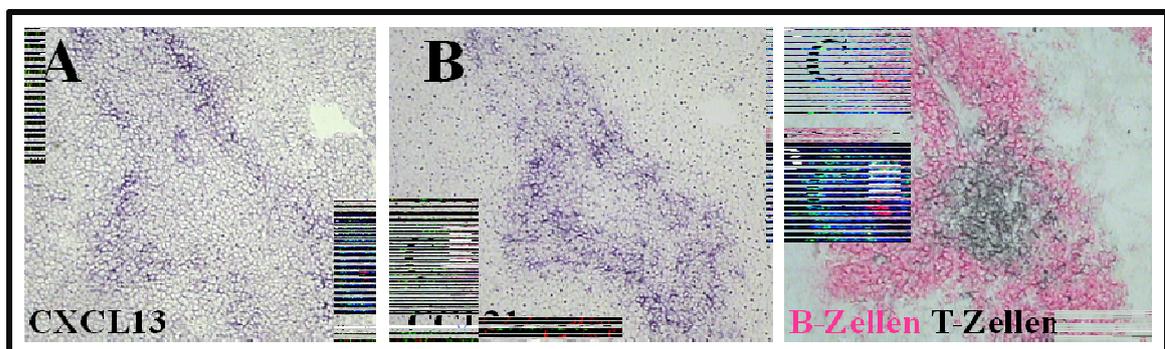


Abb. 44: Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz am Tag 4 postnatal. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A) und CCL21 (B). (C) Immunfärbung mit anti-B220 (rot) und anti-CD3 (T-Zellen). Konsekutive Gewebsschnitte. 100-fache Vergrößerung.

Da sich die Mehrheit der T-Zellen nicht im CCL21⁺, sondern im CCL21^{-/schwach} Stroma lokalisierte, wurde untersucht, ob das T-Zonen-Chemokin CCL19 für die Positionierung der T-Zellen verantwortlich ist. *In situ*-Hybridisierungen zeigten zwar eine deutliche Expression von CCL19 in der CCL21^{-/schwach} Zone, aber auch in der CCL21⁺ Zone wurde CCL19 im vergleichbaren Niveau exprimiert (Abb. 45).

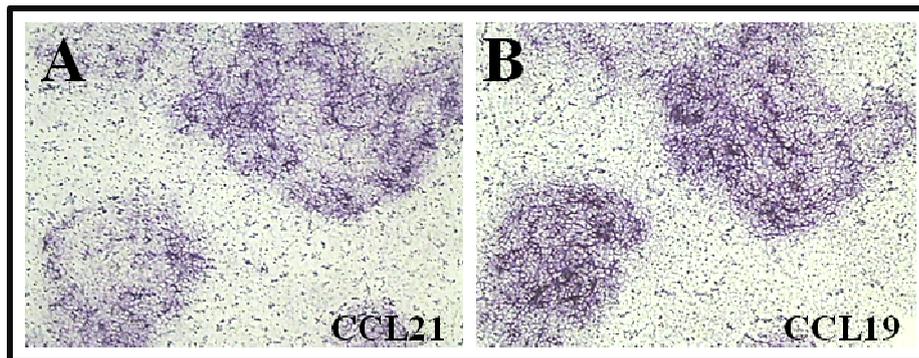


Abb. 45: Expression von CCL21 und CCL19 in der Milz am Tag 3 postnatal. *In situ*-Hybridisierung auf konsekutive Gewebsschnitte mit spezifischen Sonden für CCL21 (A) und CCL19 (B). 100-fache Vergrößerung.

Unter Berücksichtigung der Expression des zweiten T-Zonen-Chemokins CCL19 konnte das Stroma der Weißen Pulpa in 3 stromale Zonen geteilt werden: (1) Madcam-1⁺ CXCL13⁺ CCL21^{-/schwach} Zone, besiedelt von B-Zellen, (2) CCL21⁺ CCL19⁺ Zone, besiedelt von B-Zellen und nur vereinzelt T-Zellen; (3) CCL21^{-/schwach} CCL19⁺ Zone, besiedelt von T-Zellen.

Tag 6 postnatal: Differenzierung von BP3^{stark} und BP3^{schwach} Stromazellen

In der ausdifferenzierten Milz wird der stromale Marker BP3 von den Stromazellen der Weißen Pulpa exprimiert. Darüberhinaus ist es ein guter Marker für die Unterscheidung von Stroma der B- (BP3^{stark}) und T- (BP3^{schwach}) Zone.

Von Tag 6 postnatal an exprimierte die weiße Pulpa BP3. Obwohl die Expression noch recht schwach ist, konnten eindeutig eine innere BP3^{schwach} Zone, okkupiert von T-Zellen, und eine ringförmige BP3^{stark} Zone, okkupiert von B-Zellen, identifiziert werden (Abb. 46A+B).

Gegenfärbungen mit Madcam-1 zeigten eine Differenzierung des Stromas, in dem B-Zellen lokalisierten. So zeigten die Stromazellen, die der Roten Pulpa zugewandt waren, eine starke Madcam-1-, aber eine schwache bis keine BP3-Expression. Eine starke BP3-Expression hingegen war in den Stromazellen, die der T-Zone zugewandt waren, zu beobachten. Wiederum war Madcam-1 hier schwach bis negativ exprimiert (Abb. 46A).

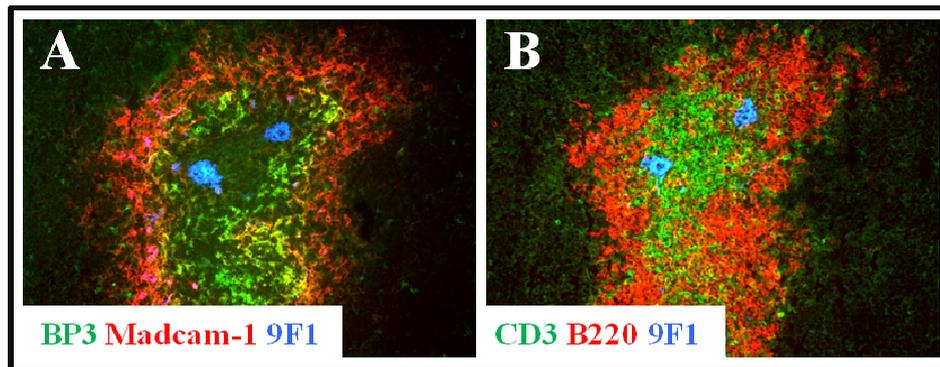


Abb. 46: Entwicklung der Milz Tag 6 postnatal. Fluoreszenzfärbung von Gewebsschnitten. 400-fache Vergrößerung.

Die Expression der Chemokine CXCL13 und CCL21 korrelierte mit der Expression der beiden BP3-Subpopulationen. So exprimierten die BP3^{stark} Stromazellen CXCL13 und die BP3^{schwach} Stromazellen CCL21. Jedoch überlappte weiterhin die Expression beider Chemokine am Berührungspunkt (Abb. 47).

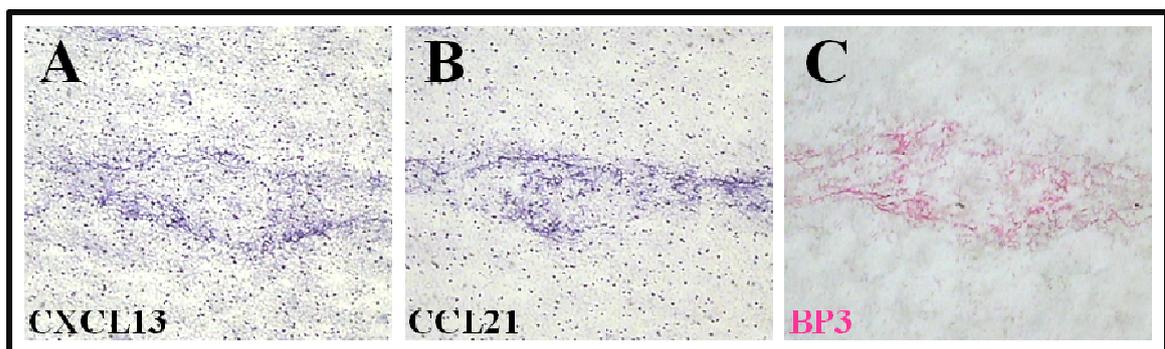


Abb. 47: Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz am Tag 6 postnatal. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A) und CCL21 (B). (C) Immunfärbung mit anti-BP3. Konsekutive Gewebsschnitte. 100-fache Vergrößerung.

Auf dieser Stufe der neonatalen Entwicklung ließen sich folgende Stromakompartimente definieren: (1) Madcam-1⁺ BP3^{schwach} Stroma, besiedelt von B-Zellen; (2) Madcam-1^{schwach} BP3⁺ CXCL13⁺ Stroma, besiedelt von B-Zellen; (3) BP3⁺ CXCL13⁺ CCL21⁺ Stroma (Interphase), besiedelt von B- und T-Zellen; (4) BP3^{schwach} CCL21⁺ Stroma, besiedelt von T-Zellen.

Tag 8 postnatal: Die Ausbildung von B-Zell-Follikel korrespondiert mit der Differenzierung von FDC

Am Tag 8 postnatal begann die letzte Stufe der Milzdifferenzierung. Mit der Verstärkung der BP-Expression in den Stromazellen der Weißen Pulpa, fingen die ersten ringförmigen B-Zell-Regionen an, Follikelstrukturen zu bilden (Abb. 48A). Das Madcam-1⁺ Stroma war nicht mehr breitflächig und von B-Zellen durchsetzt, sondern wie im Marginalsinus ausdifferenzierter Milzen auf eine schmale Zellschicht, die das Follikel umgibt, reduziert (Abb. 48B). Erste IgM⁺ CD21⁺ B-Zellen lokalisierten in der Marginalzone (Abb. 48C).

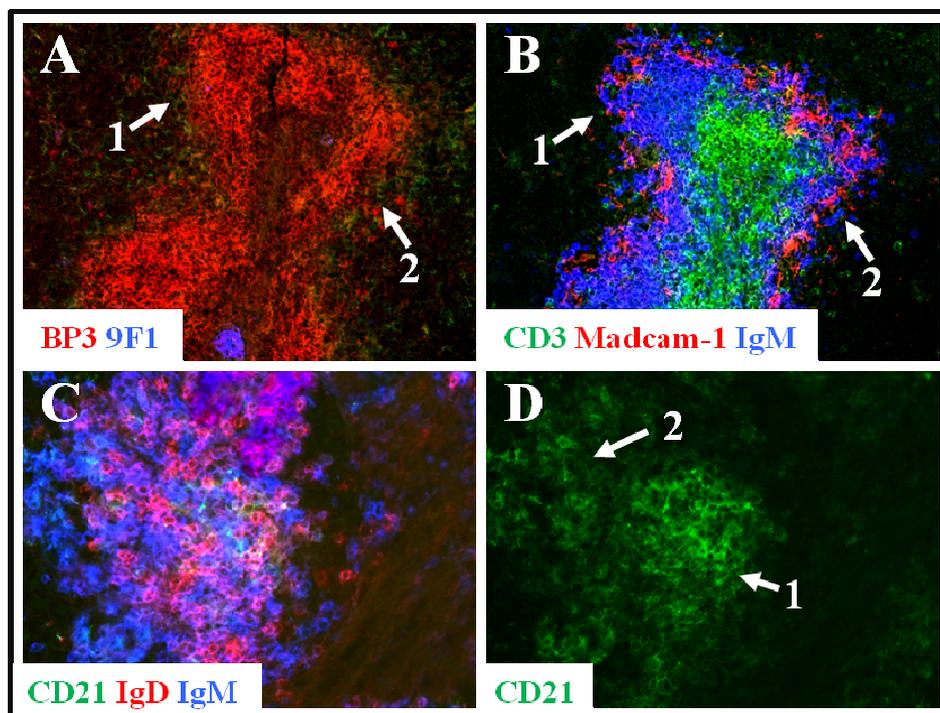


Abb. 48: Entwicklung der Milz Tag 8 postnatal. (A+B) konsekutiver Gewebsschnitt mit differenzierenden Follikeln (1) und neonatalen B-Zell-Regionen (2), 200-fache Vergrößerung. (C+D) Selbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne Färbung für IgD⁺ und IgM⁺ B-Zellen, (1) FDC-

Netzwerk und (2) Marginalzonen-B-Zellen, 400-fache Vergrößerung. Fluoreszenzfärbungen von konsekutiven Gewebsschnitten.

Färbungen mit anti-CD21 zeigte eine Hochregulierung der Komplementrezeptoren auf Stromazellen innerhalb des sich entwickelnden Follikels. Die schwache Expression von CD21 dieser Stromazellen, die vergleichbar mit der CD21-Expression auf B-Zellen der Marginalzone war, deutete eine gerade stattfindende Differenzierung von Stromazellen zu reifen FDC an (Abb. 48C+D). Zeitgleich reduzierten diese Stromazellen die Expression von CCL21 und exprimierten von nun an nur noch das B-Zonen-Chemokin CXCL13 (Abb. 49). FDC-M2⁺ Zellen wurden noch nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Entwicklung aller Follikel und damit verbundene Differenzierung von Stromazellen zu FDC vollzog sich innerhalb der Milz nicht zeitgleich, sondern war ein Prozess, der mehrere Tage dauerte. Die ersten differenzierten CD21⁺ FDC-M2⁺ FDC waren in einigen Follikel am Tag 9 postnatal zu beobachten (siehe adulter Milz Abb. 5).

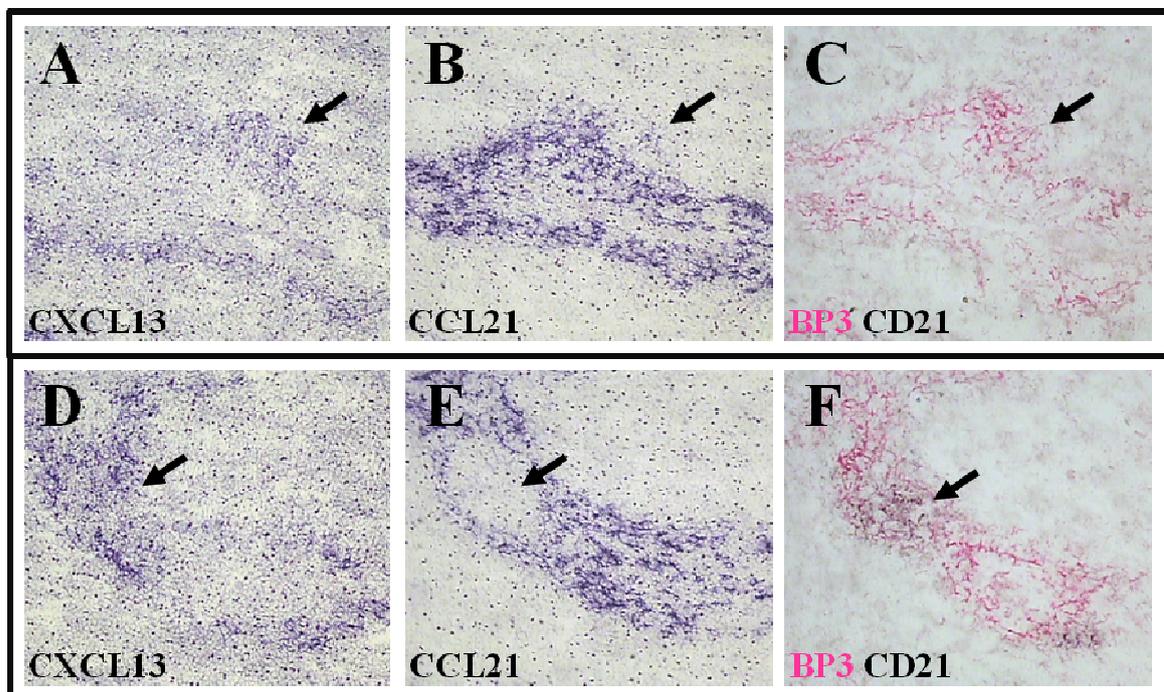


Abb. 49: Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz am Tag 8 (A-C) und ab Tag 9 (D-F) postnatal. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A+D) und CCL21 (B+E). (C+F) Immunfärbung mit anti-BP3 und anti-CD21. Konsekutive Gewebsschnitte. 100-fache Vergrößerung.

Biglycan wird in der neonatalen Milz von Stromazellen der B- und T-Zell-Regionen, in der ausdifferenzierten Milz jedoch nur von Stromazellen der B-Zone exprimiert. Der Zeitpunkt, an dem Biglycan in der Region der T-Zellen herunterreguliert wurde und somit nur FDC und die übrigen FSC definiert, war erst zu beobachten, nachdem die T-Zone vollständig von Follikeln mit reifen FDC umgeben wurde. Auch erst dann kam es durch Kollokalisierung von Madcam-1⁺ Stromazellen, Metallophilen Makrophagen und Marginalsinus-Endothel zur vollständigen Ausdifferenzierung des Marginalsinuses, der Rote und Weiße Pulpa trennte. Die Entwicklung der neonatalen Milz war an Tag 14 abgeschlossen und wies einen adulten Phänotyp auf.

3.3.3.2 Expression der neu identifizierten FDC-Gene in der neonatalen Milz

Neben Biglycan wurden auch Enpp2, Serpina1, Cilp, Lrat, Postn, RIKEN cDNA 9130213B05 und Coch als spezifische Gene für FDC definiert. Es konnte anhand von B- und/oder T-Zell-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Expression dieser neu definierten Gene von Lymphozyten-Signalen abhängt. Nun sollte überprüft werden, wie die Expression dieser Gene innerhalb der neonatalen Entwicklung bis hin zu ausdifferenzierten FDC reguliert wird. Dazu wurde die RNA von neonatalen Milzen präpariert und die Genexpression von Enpp2, Serpina1, Cilp, Lrat, Postn, RIKEN cDNA 9130213B05 und Coch in einer semi-quantitativen RT-PCR analysiert. Als Vergleich diente die isolierte Milz-RNA eines adulten Tieres.

Die vorhergehenden immunhistologischen Beobachtungen zur Differenzierung von FDC durch Erhöhung der CD21-Expression von Tag 8 postnatal an konnten in diesem Experiment belegt werden. So wurde auch in der molekularbiologischen Analyse ein drastischer Anstieg der Expression von CD21 beobachtet. Desweiteren zeigte die Analyse, dass auch CXCL13, Enpp2, Lrat und Serpina1 in der Differenzierungsphase der neonatalen Milz tendenziell hochreguliert wurden. Im Gegensatz schwankte die Expression einiger Gene (Cilp, Ltbp3 und RIKEN cDNA 9130213B05), nahm ab (Periostin) oder blieb unverändert (Coch) innerhalb der neonatalen Entwicklung. Auffällig war, dass die Expression der Gene Cilp, Lrat, Ltbp3, RIKEN cDNA 9130213B05 und

Serpina1 mit Beginn der Ausdifferenzierung von FDC am Tag 8 postnatal deutlich reguliert wurden (Abb. 50).

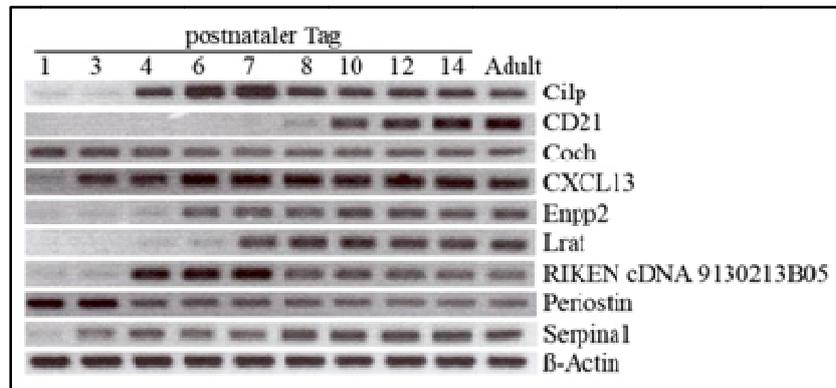


Abb. 50: Expressionsanalyse neuer und bekannter FDC-Gene in der neonatalen Milz. Milz-cDNA von Tag 1 bis 14 postnatale wurden in einer semi-quantitativen PCR analysiert. Die Expressionskontrolle ist β -Actin.

In Abschnitt 3.2.3.1 wurde gezeigt, dass der Rezeptor LPa1, der das enzymatische Produkt von Enpp2 bindet, nicht von hämatopoietischen Zellen sondern von Zellen des folliculären Stromakompartiments exprimiert wird. Da weiterhin gezeigt werden konnte, dass eine höhere Expression von LPa1 mit einem unreifen mesenchymalen Zelltyp assoziiert wird, stellte sich die Frage, ob eine Regulierung der Expression von LPa1 innerhalb der neonatalen Entwicklung der Milz zu verzeichnen ist und mit der Expression von Enpp2 korreliert. Dazu wurde die Expression von LPa1 in isolierter RNA der neonatalen Milzen mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert.

Die Analyse zeigte einen drastischen Anstieg der Expression nach massiver Einwanderung von T-Zellen am Tag 4. Eine deutliche Reduzierung der LPa1-Expression wurde nach Beginn der Differenzierung von reifen FDC durch Expression von CD21 (ab Tag 8) beobachtet. Die Erhöhung der Expression von Enpp2 erfolgte zeitlich etwas versetzt (Abb. 51).

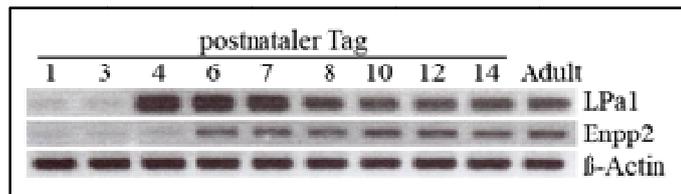


Abb. 51: Expressionsanalyse von LPa1 und Enpp2 in der neonatalen Milz. Milz-cDNA von Tag 1 bis 14 postnatale wurden in einer semi-quantitativen PCR analysiert. Die Expressionskontrolle ist β -Actin.

3.3.3.3 Zusammenfassung

Bei den Analysen von Milzen neugeborener Mäuse konnte Biglycan als neuer Stromamarker der neonatalen Weißen Pulpa definiert werden. Erst nach vollständiger Differenzierung der murinen Milz (ab Tag 14 postnatal) wird Biglycan in den Stromazellen der T-Zone herunterreguliert und definiert sich dann als Marker von FDC.

Die Regulierung der neu identifizierten FDC-Gene im Laufe der neonatalen Milzentwicklung ist in Abbildung 50 zusammengefasst. Die Expression dieser Gene zeigte ein dynamisches Muster. Dabei war auffällig, dass die Regulierung der Mehrheit der analysierten Gene um den Zeitpunkt der FDC-Differenzierung erfolgte.

Die prominenten Chemokine CXCL13 und CCL21, deren Expression das B- bzw. T-Zonen-Stroma in einer ausdifferenzierten Milz unterscheidet, wurden erst in separaten Stromakompartimenten exprimiert, nachdem Lymphozyten in großer Anzahl eingewandert sind. Dabei war jedoch die Expression beider Chemokine nicht klar getrennt. An den Berührungsflächen beider Kompartimente befanden sich Stromazellen, die CXCL13 und CCL21 exprimierten.

Überraschend war die dynamische Besiedlung der Kompartimente durch Lymphozyten. B-Zellen besiedelten nicht nur das CXCL13⁺ Stroma, sondern auch überwiegend das CCL21⁺ Stroma. Eine vollständige Trennung des Stromas der B- und T-Zone und Lokalisierung der B-Zellen im CXCL13⁺ Stroma bzw. T-Zellen im CCL21⁺ Stroma war erst mit der Differenzierung von FDC und zeitgleichen Entwicklung von Follikeln vervollständigt.

Die Entstehung von Follikeln und Differenzierung von FDC erfolgte erst im letzten Drittel der 14-tägigen Entwicklung von Neugeborenen. Hierbei regulierten die Stromazellen im sich entwickelnden Follikel den FDC-definierenden Komplementrezeptor CD21 hoch. Mit der FDC-Differenzierung kolokalisierten die Metallophilen Makrophagen mit dem Madcam-1⁺ Stroma und bildeten den Marginalsinus.

3.3.4 Signale von Lymphozyten in der Entwicklung der Weißen Pulpa

Obwohl Rag1^{-/-} keine B- und T-Zellen haben, besitzen diese Tiere differenzierte Milzstrukturen. Das Stroma der Weißen Pulpa besteht aus einer BP3^{schwach} T-Anlage, umrandet von einer dünnen BP3^{stark} B-Anlage. FDC sind aufgrund fehlender B-Zell-Signale nicht differenziert. Bei der Betrachtung neonataler wt wurden vergleichbare Strukturen am Tag 6 postnatal dokumentiert (Abb. 52).

Ob diese BP3⁺ Stromakompartimente in wt wie auch in Rag1^{-/-} Lymphozyten-unabhängig entstehen, sollte untersucht werden. Dazu wurden neonatale Rag1^{-/-} immunhistologisch analysiert und mit neonatalen wt gleichen Alters verglichen.

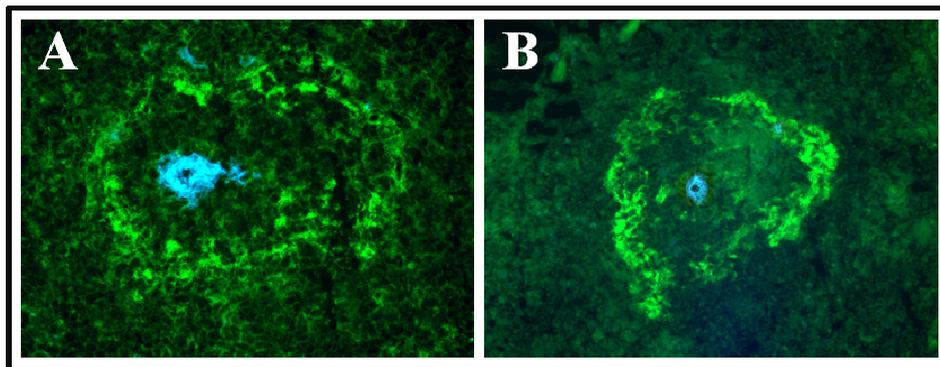


Abb. 52: Die Milz von (A) neonatalen wt (Tag 6 postnatal) und (B) adulten Rag1^{-/-}. Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten mit anti-BP3 (grün) und 9F1 (blau).

Analysen von Tag 1 postnatal zeigten keine Unterschiede in der stromalen Entwicklung im Vergleich zu wt des gleichen Alters. Die Vcam-1-Expression war in perivaskulären Arealen, wo LTi lokalisierten, etwas niedriger. Außerdem befanden sich einzelne

Madcam-1⁺ Zellen in unmittelbarer Nähe der LTi. B-Zellen und CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Zellen fehlten (Daten nicht gezeigt).

Erste Verzögerungen in der Milzentwicklung von Rag1^{-/-} -Neugeborenen erfolgten an den folgenden Tagen. So konnte eine kontinuierliche Madcam⁺ Zellschicht erst am Tag 10 detektiert werden. Dies entspricht einer Verzögerung von etwa einer Woche verglichen zu wt. Weiterhin war am Tag 10 das perivaskuläre Areal der RAG1^{-/-} nicht mehr nur von LTi, sondern auch von einer bezeichnenden Anzahl Dendritischer Zellen besiedelt. Eine ausgeprägte Differenzierung zwischen Roter und Weißer Pulpa in Hinblick auf Expression von Vcam-1 trat noch später auf. Erst am Tag 14 und somit etwa 10 Tage verspätet war Vcam-1 signifikant höher in der Roten Pulpa exprimiert. Die Hochregulierung von BP3 war sogar um 14 Tage verzögert und trat erst ab Tag 21 postnatal auf (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Rag1^{-/-} Neugeborenen zeigt, dass die stromale Entwicklung des Immunkompartments der Milz bis zur Geburt Lymphozyten-unabhängig ist, da Lymphozyten-defiziente Rag1^{-/-} und wt eine vergleichbare stromale Entwicklung am Tag 1 postnatal zeigten. Erst danach kam es aufgrund fehlender B- und T-Zellen zu einer verzögerten Differenzierung des Stromas. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Entwicklung einer BP3^{schwach} T-Zell-Region, umgeben von BP3^{stark} B-Zell-Region in wt Lymphozyten-abhängig ist. Zwar konnten in Rag1^{-/-} die fehlenden Lymphozyten-vermittelten Signale kompensiert werden, die Entwicklungsphase dauerte jedoch aufgrund fehlender B- und T-Zell-vermittelter Signale fast vier Mal so lange wie in wt.

3.3.5 Die Entwicklung der neonatalen Milz ist unabhängig von *Lymphoid Tissue Inducer Cells*

LTi spielen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von peripherem Lymphgewebe. Sie sind u.a. in Lymphknoten, Peyer'schen Plaques und der Milz (Abschnitt 3.3.3.1) nachweisbar^{43,44}. Deletion des Transkriptionsfaktors Rorγ führt zum Verlust von LTi⁵⁹. Folge ist das Fehlen LTi-vermittelter LT/TNF-Signale, was u.a. die Entwicklung von Lymphknoten und Payerschen Plaques, jedoch nicht der Milz verhindert⁴³. Eine

ausdifferenzierte Milz erscheint weitgehend normal^{45,46,124}. Auch eine histologische Analyse des stromalen Kompartiments deutet auf eine ungestörte Entwicklung (Daten nicht gezeigt).

Trotz der normalen Milzstruktur in adulten *Rory*^{-/-} ist es denkbar, dass es aufgrund fehlender LTi-vermittelter LT/TNF-Signale zu Verzögerungen in der Entwicklung der Milz kommt. Um dies zu untersuchen, wurden Milzen neonataler *Rory*^{-/-} immunhistologisch analysiert und mit wt verglichen.

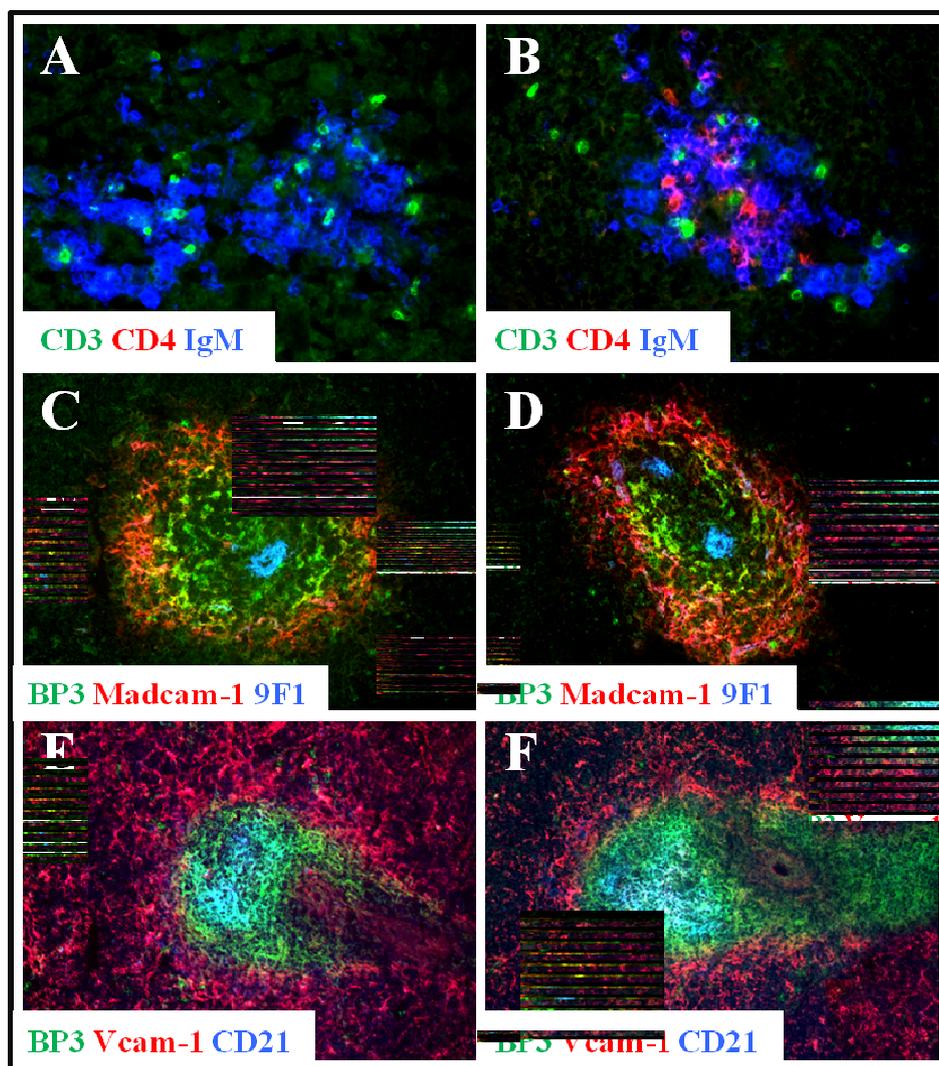


Abb. 53: *Rory*^{-/-} Mäusen zeigen eine normale postnatale Entwicklung der Milz. Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der Milz von *Rory*^{-/-} (A, C, E) und wt (B, D, F) Neugeborenen am Tag 1 postnatal (A+B), Tag 6 postnatal (C+D) und Tag 12 postnatal (E+F). (A-D) 400-fache und (E+F) 200-fache Vergrößerung.

Abgesehen vom Fehlen der LT α zeigten die Milzen der Rory $^{-/-}$ Neugeborenen keine Unterschiede in Einwanderung von Lymphozyten und Entwicklung des Immunkompartiments bis hin zur Differenzierung von FDC (Abb. 53). Wie schon für wt gezeigt, lokalisieren am Tag 1 postnatal B-Zellen und CD3 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ Zellen perivaskulär. Am Tag 3 hatte das Madcam-1 $^{+}$ Stroma eine kontinuierliche Zellschicht um die weiße Pulpa gebildet und die weiße Pulpa ließ sich aufgrund einer schwachen Vcam-1-Expression von der Roten Pulpa unterscheiden. Ein drastischer Anstieg von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen wurde an Tag 4 verzeichnet. Das Stroma der Weißen Pulpa regulierte die Expression von BP3 am Tag 6 hoch und war durch eine BP3 $^{\text{stark}}$ und BP3 $^{\text{schwach}}$ -Zone definiert. Die finale Stufe der Differenzierung begann am Tag 9 mit der Entwicklung von Follikel mit reifen FDC und war am Tag 14 beendet.

3.3.6 Zytokine und ihre Rezeptoren in der Milzentwicklung

Der Rezeptor für das FDC-exprimierte Chemokine CXCL13 ist CXCR5 und befindet sich auf B-Zellen. CXCR5 vermittelt die Einwanderung von B-Zellen ins Follikel. Durch Bindung von CXCL13 an seinem Rezeptor wird in B-Zellen die Expression von Lymphotoxin induziert. B-Zell-produziertes Lymphotoxin wiederum bindet an seine Rezeptoren auf stromalen Zellen und induziert die Differenzierung von FDC und deren CXCL13-Expression. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus bedingt eine gegenseitige Regulierung von Stroma und B-Zellen¹²⁵.

3.3.6.1 Naive CXCR5-defiziente Milzen besitzen keine FDC

CXCR5-defiziente Milzen sind nicht in der Lage Primärfollikel zu bilden. B-Zellen umgeben ringförmig die T-Zone (Abb. 54A). Immunhistologische Untersuchungen mit dem FDC-spezifischen Antikörper FDC-M2 zeigen einen breiten Ring aus schwach positiven Zellen, die jedoch keine typische Netzwerkstruktur ausbilden^{35,58}. Ähnlich beschrieben wie für TNF- und TNFR-1-defiziente Mäuse, befinden sich diese FDC-M2 $^{+}$ Zellen außerhalb des Marginalsinus und kolokalisieren mit B-Zellen³⁴. Ungewiss ist

jedoch, ob diese extrafollikulären FDC-M2⁺ Zellen auch andere FDC-Marker, wie CD21, BP3, CXCL13 und die für FDC neu definierten Gene Biglycan, Enpp2, Serpina1, Coch, Lrat, RIKEN cDNA 9130213B05 und Cilp exprimieren. Zur Untersuchung der stromalen Kompartimente der CXCR5^{-/-} erfolgten *in situ* Analysen.

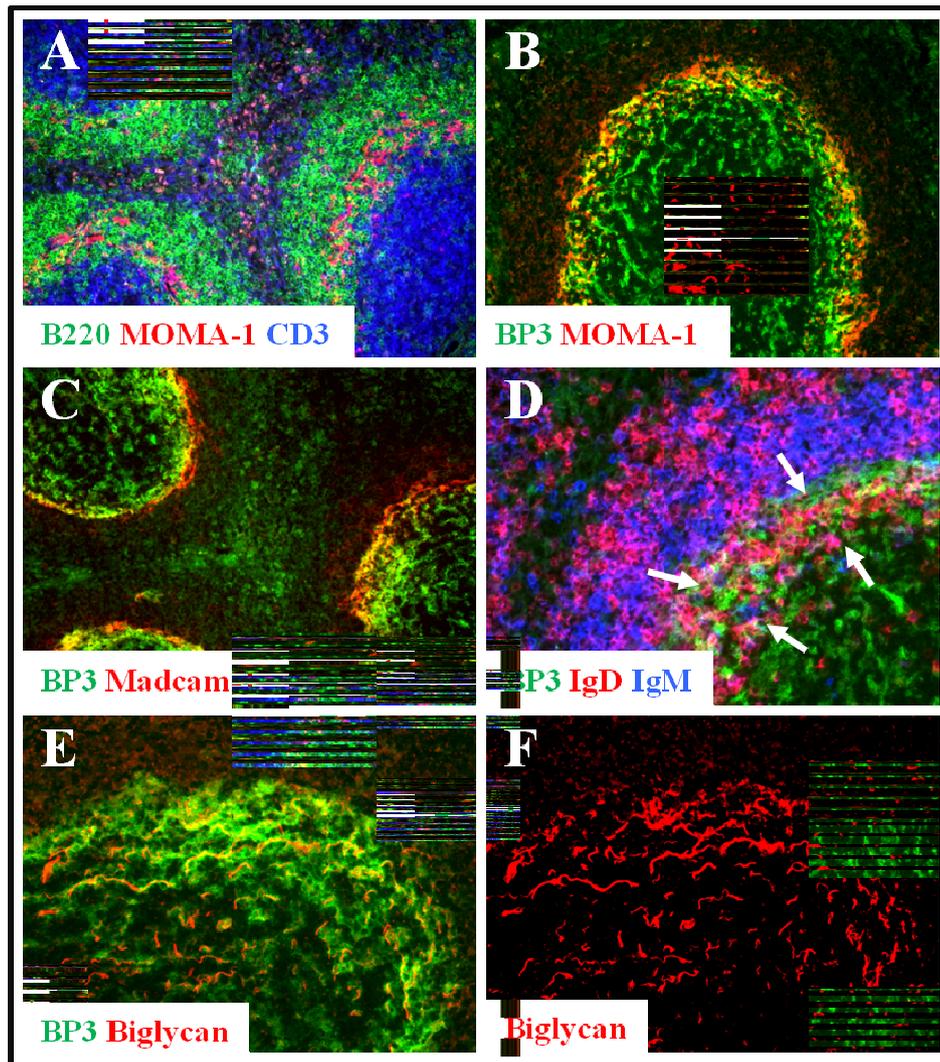


Abb. 54: Differenzierung der Milz CXCR5-defizienter Mäuse. Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten. (D) Pfeile markieren ins BP3-Stroma eingewanderte B-Zellen. (C+D) Selbe Aufnahme, (C) mit und (D) ohne BP3-Färbung. (A-C, E, F) 200-fache und (D) 400-fache Vergrößerung.

Immunhistologische Analysen zeigten für die Weiße Pulpa eine deutliche Kompartimentierung des Stromas in eine BP3^{schwach} T-Zone, umgeben von einem Ring aus BP3^{stark} Stromazellen, von denen ein Teil auch Madcam-1 exprimiert. Wie bereits bei der neonatalen Entwicklung der wt Milz am Tag 6 beobachtet, befanden sich Madcam-1⁺ BP3⁻ Stromazellen auf der Seite der Weißen Pulpa, die der Roten Pulpa zugewandt lag (Abb. 54B+C).

Obwohl einige IgD⁺ B-Zellen in diese BP3^{stark} Stromazellen einwanderten, wurden keine ausdifferenzierten Follikel beobachtet (Abb. 54D). Außerhalb des MOMA-1⁺ Marginalsinus, wo FDC-M2⁺ Zellen und der überwiegende Anteil der B-Zellen lokalisieren, wurden keine BP3-Signale detektiert (Abb. 54B).

Die als FDC-Vorläuferzellen beschriebenen FDC-M2 schwach positiven Zellen konnten auch nicht mit FDC-typischen CD21 stark positiven Signalen eindeutig assoziiert werden. Da die Signale der CD21-Färbung so schwach waren, konnte nicht beobachtet werden, ob die CD21^{schwach} Signale mit den FDC-M2^{schwach} Signalen kolokalisieren oder CD21^{schwach} Signale von benachbarten B-Zellen einstrahlen (Daten nicht gezeigt).

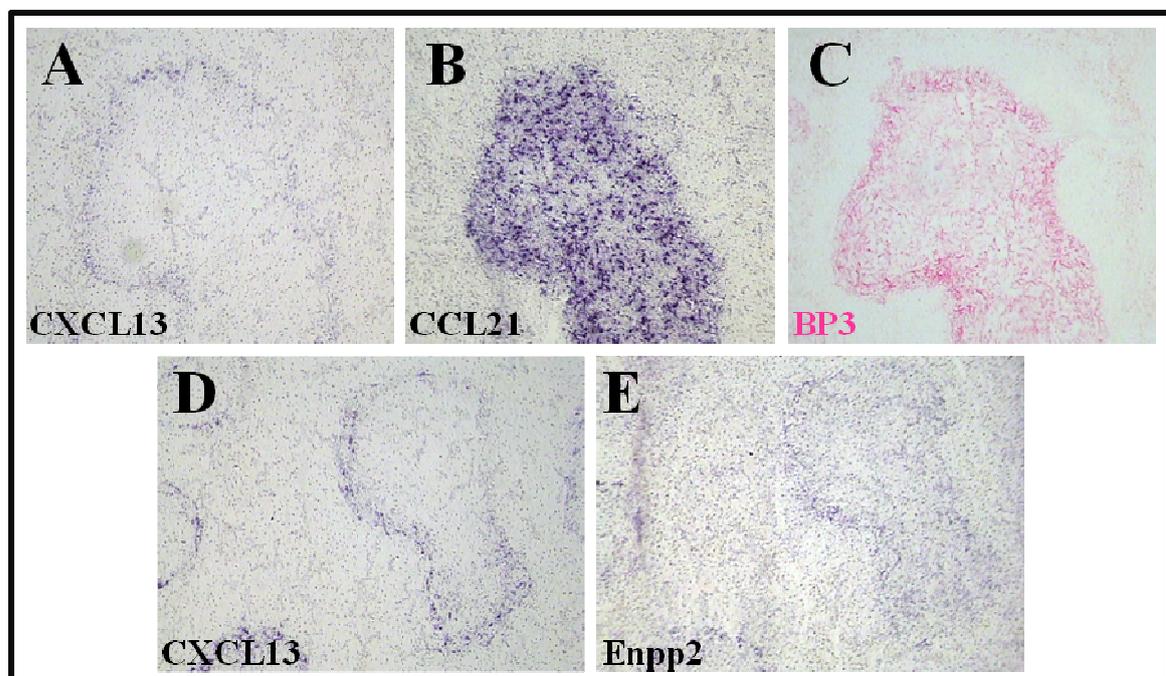


Abb. 55: Expression von CXCL13, CCL21 und Enpp2 in der CXCR5^{-/-} Milz. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A+D), CCL21 (B) und Enpp2 (E). (C) Immunfärbung mit anti-BP3. 100-fache Vergrößerung.

Die Expression FDC-spezifischer Gene erfolgte nur in der Zone der BP3^{stark} Stromazellen. Diese exprimierten Biglycan (Abb. 55C+D), CXCL13 und schwach Enpp2 (Abb. 55E). FDC-Marker wie Serpina1, Coch, Lrat, RIKEN cDNA 9130213B05 und Cilp wurden jedoch nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dass es sich bei den Stromazellen der B-Zell-Region um einen unvollständig differenzierten Phänotyp handelte, deutete auch die schwache Expression von CCL21 in Teilen des CXCL13⁺ Stromas an (Abb. 53B).

3.3.6.2 Lymphotoxin α -unabhängig Differenzierung der Stromazellen von B- und T-Zone

Wie auch andere sekundäre Lymphorgane entwickelt sich die Milz aufgrund komplexer Interaktionen zwischen hämatopoietischen und mesenchymalen Zellen. Einer der Schlüsselfaktoren sind Lymphotoxin-Signale. Die essentielle Rolle von Lymphotoxin wurde in LT α ^{-/-} Mäusen durch das Fehlen von Peyer'schen Plaques und Lymphknoten, sowie einer gestörten Milzstruktur ohne FDC, Marginalzone und segregierter B- und T-Zone illustriert¹²⁶⁻¹²⁸. Die Segregation von Roter und Weißer Pulpa ist jedoch LT α -unabhängig¹²⁹.

Ob und inwiefern die Differenzierung des Stromas der Weiße Pulpa und Entwicklung von FDC von Lymphotoxin abhängt, sollte in LT α ^{-/-} mittels Immunhistologie und *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Die Analysen erfolgten mit dem von Liepinsh *et al.* generierten LT α -defizienten Mausstamm. Diese Mäuse zeigen im Gegensatz zu früher erzeugten LT α ^{-/-} keine Reduktion der TNF-Expression⁵⁷. Die Reduktion von TNF in früher generierten LT α ^{-/-} beruht also nicht auf eine gegenseitige Regulation von LT α und TNF, sondern ist auf die Art der genetischen Manipulation des LT α -Lokus zurückzuführen.

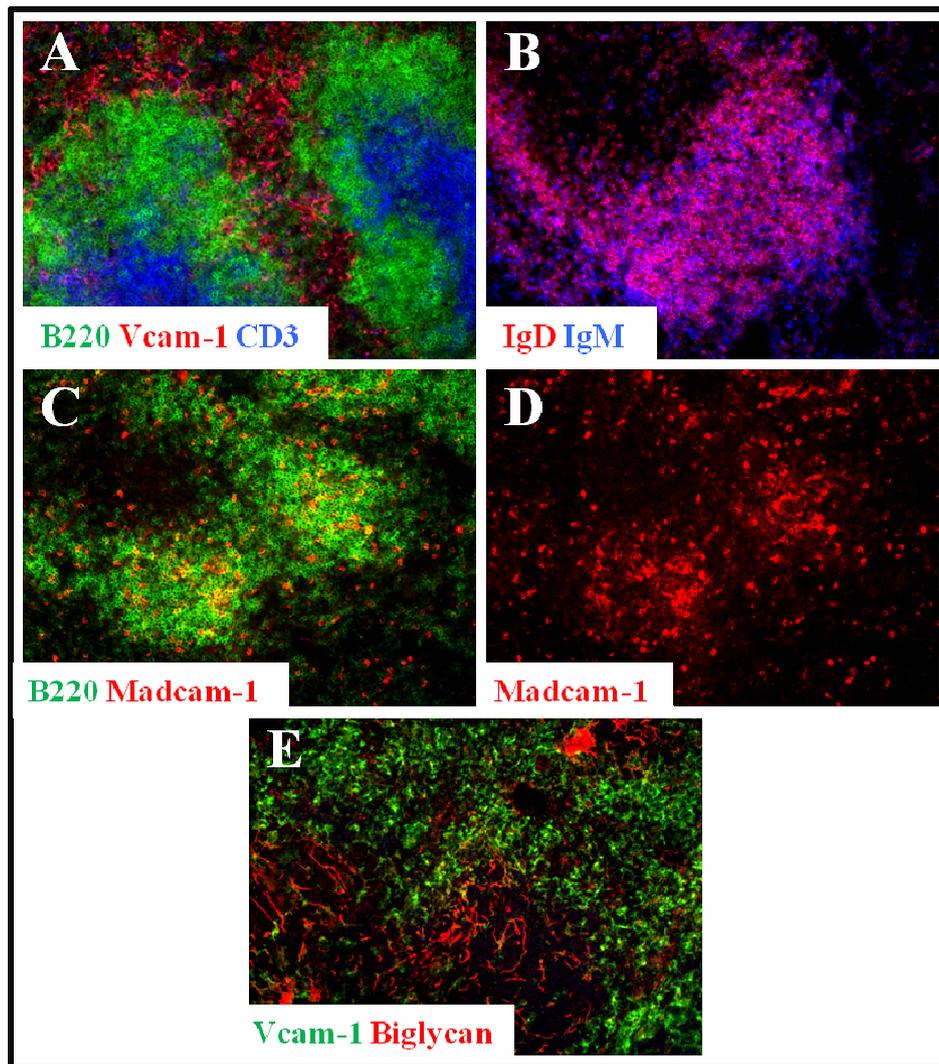


Abb. 56: Differenzierung der Milz $LT\alpha$ -defizienter Mäuse. Fluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten. 200-fache Vergrößerung.

Genaue histologische Analysen der Milz der neu generierten $LT\alpha$ -defizienten Maus zeigten trotz einer gestörten Entwicklung eine grundlegend organisierte Mikroarchitektur. Die $LT\alpha$ -unabhängig Trennung des Stromas der Roten und Weißen Pulpa¹²⁹ konnte durch den Nachweis von VCAM-1 und dem neubeschriebenen Gen Coch in der Roten Pulpa bestätigt werden (Abb. 56A und 57D). Innerhalb der Weißen Pulpa segregierten T- und B-Zellen, wobei die T-Zone von B-Zellen umgeben war. Jedoch verblieb die Berührungsfläche von T- und B-Zone etwas diffus im Vergleich zu wt (Abb. 56A). Die B-Zellen zeichneten sich durch einen IgM^+ bzw. $IgD^+ IgM^+$ Phänotyp aus (Abb. 56B). Ein typischer Marginalsinus, charakterisiert durch Metallophile Makrophagen und $Madcam-1^+$

Stromazellen konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch befanden sich dendritische Madcam-1⁺ Zellen in der B-Zone und vereinzelt eher runde Madcam-1⁺ Zellen in der Roten Pulpa und T-Zell-Region (Abb. 56D).

Da B- und T-Zellen in verschiedenen Arealen lokalisierten, wurde angenommen, dass das Stroma der Weißen Pulpa differenziert sein musste. Der konventionelle Stromamarker der Weißen Pulpa BP3 gab aufgrund fehlender Signale jedoch keine Auskunft über Ausbildung einer stromalen B- und T-Zone (Daten nicht gezeigt). Auch Biglycan, ein stromaler Marker der B-Zone, gab keinen Aufschluss über eine unterschiedliche Differenzierung des Stromas der T- und B-Region, da es in beiden Zonen gleichmäßig exprimiert wurde (Abb. 56E). FDC wurden mit den FDC-spezifischen Markern CD21 und FDC-M2 nicht nachgewiesen. Darüberhinaus konnte auch die Expression der neu definierten FDC-Gene Enpp2, Serpina1, Cilp, Coch, RIKEN cDNA 9130213B05 und Lrat nicht in der Weißen Pulpa beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

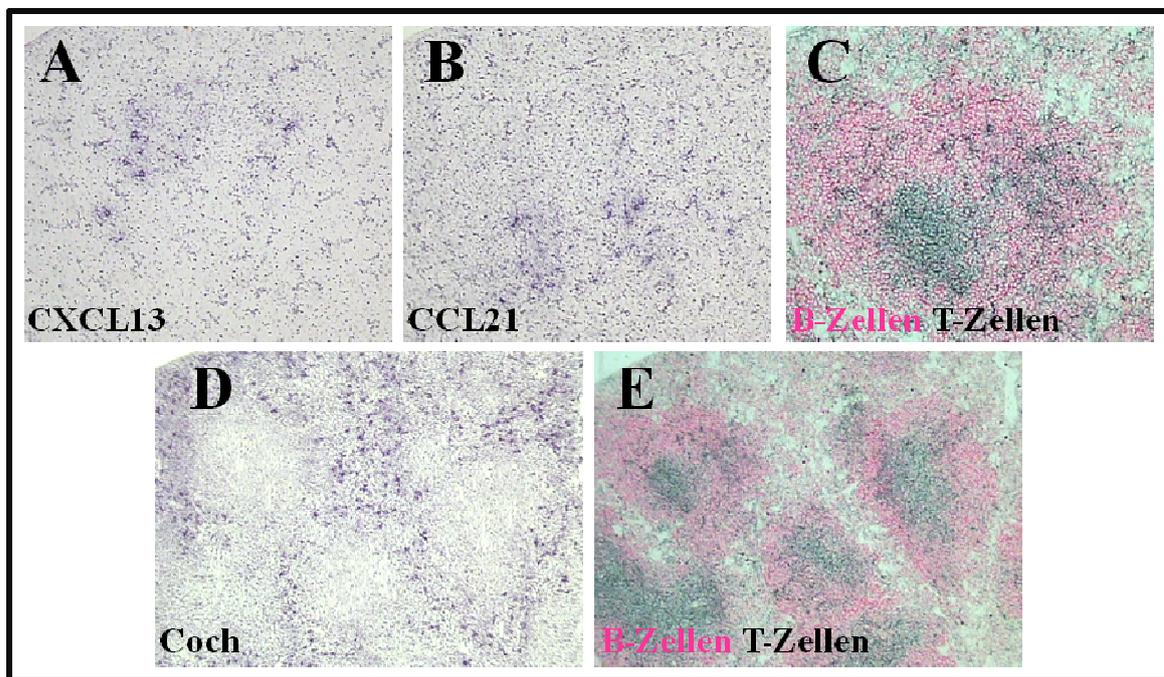


Abb. 57: Expression von CXCL13, CCL21 und Enpp2 in der CXCR5^{-/-} Milz. *In situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden für CXCL13 (A), CCL21 (B) und Coch (D). (C+E) Immunfärbung mit anti-B220 (rot) und anti-CD3 (schwarz). (A-C) 200-fache, (D+E) 100-fache Vergrößerung.

Zur Aufklärung der Kompartimentierung von B- und T-Zellen, wurde die Expression von CXCL13 und CCL21 in der Milz von $LT\alpha^{-/-}$ untersucht. Obwohl die Expression beider Chemokine sehr niedrig war, wurden $CXCL13^+$ Stromazellen der B-Zone und $CCL21^+$ Stromazellen der T-Zone detektiert (Abb. 57).

Die Daten zeigten, dass trotz fehlender Lymphotoxin-Signale eine grundlegende Organisation und Kompartimentierung der Milz erfolgte. In $LT\alpha^{-/-}$ segregierten nicht nur Rote und Weiße Pulpa, sondern auch das Stroma innerhalb der Weißen Pulpa. Durch die lokal getrennte Expression von Chemokinen wurden unterschiedliche Nischen für B- und T-Zellen beobachtet. So lokalisierten im $CXCL13^+$ Stroma B-Zellen und im $CCL21^+$ Stroma T-Zellen. Außer Biglycan konnte kein weiteres FDC-spezifisches Gen in der Weißen Pulpa von $LT\alpha^{-/-}$ nachgewiesen werden.

