

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen für Gedächtnis-B-Zell-Lokalisationsstudien in humanen lymphatischen Geweben

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Lettau
aus Stendal

Datum der Promotion: 25.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 Die Immunität und ihre Effektormechanismen	3
1.1.1 Die T-Lymphozyten (T-Zellen)	4
1.1.2 Die B-Lymphozyten (B-Zellen)	4
1.2 Die histologische Organisation der Lymphozyten in den SLOs	5
1.2.1 Die hoch-endothelialen Venolen (HEVs) als histologisches Korrelat für die Rezirkulation der Lymphozyten	6
1.2.2 Das GC als histologisches Korrelat für die T-Zellabhängige B-Zellantwort	7
1.3 Das immunologische B-Zellgedächtnis und mBCs	8
1.4 Die Histologie der Milz	9
1.4.1 Die rote Milzpulpa	10
1.4.2 Die weiße Milzpulpa in der Maus und der Ratte	10
1.4.3 Die weiße Milzpulpa im Menschen	11
1.5 Die Histologie der humanen Tonsilla palatina als Teil des MALT	13
1.6 Fragestellung	14
2 MATERIAL UND METHODE	16
2.1 Gewebeproben: Humane Tonsillen- und Milzpräparate	16
2.2 Verarbeitung der Gewebeproben: Gefrierung und Gefrierschnitte	17
2.3 Puffer-, Block- und Antikörperlösungen	17
2.4 Protokoll immunhistochemische Färbung	19
2.5 Multifluoreszenzfärbungen für das konfokale LSM unter Benutzung von Hap- tensystemen	20
2.6 Die Generierung des Bildes mittels konfokalem LSM und die Auswertung mittels ‚ZEN 2012 lite blue edition‘ Software	21
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Definition der mBC als langlebige ruhende, antigenerfahrene B-Zelle	23
- ETABLIERUNG UND VALIDIERUNG -	
3.2 Immunhistochemische Multifluoreszenzfärbungen für das LSM unter Benutzung von Haptensystemen	25
3.2.1 Optimierung des Versuchsablaufes	25

3.2.2	Kontrolle des Bindungsverhaltens der Primärantikörper, der Sekundärantikörperspezifität und der manuellen LSM Einstellungen	27
	- ANWENDUNG 1 -	
3.3	Anwendung der Methode auf Gefrierschnitten humaner Milzen	29
3.3.1	Die allgemeine Morphologie der humanen weißen Milzpulpa	29
3.3.2	Lokalisation von mBCs im MZ-Kompartiment der weißen Milzpulpa .	31
3.3.3	Die Gliederung der humanen weißen Milzpulpa über die Anordnung der IgM und IgD exprimierenden B-Zellen	34
3.3.4	Die Verteilung der Ig-Isotypen IgA, IgG, IgM und IgD in der humanen weißen Milzpulpa	37
3.3.5	Fazit aus der Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Milzen	39
	- ANWENDUNG 2 -	
3.4	Anwendung auf Gefrierschnitten humaner Tonsillae palatinae	40
3.4.1	Allgemeine Morphologie der humanen Tonsilla palatina	40
3.4.2	CD27 exprimierende Lymphozyten in der humanen Tonsilla palatina	43
3.4.3	Lokalisation von mBCs in der humanen Tonsilla palatina	46
3.4.4	Verteilung der Ig-Isotypen IgM, IgD, IgG und IgA in der humanen Tonsilla palatina	47
3.4.5	Fazit aus der Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Tonsillae palatinae	50
3.5	Expression von MAdCAM-1 in der humanen Milz und der humanen Tonsilla palatina	50
3.6	Übersicht der Lymphozytenverteilung im Menschen: weiße Milzpulpa versus Tonsilla palatina	51
4	DISKUSSION	53
4.1	Die Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen als innovative Ergänzung histologischer mBC-Lokalisationsstudien	53
4.2	Die histologische mBC-Lokalisation in den humanen SLOs: organspezifische mBC-Kompartimente versus follikelassoziierte mBC-Areale	55
4.2.1	Die mBC-Lokalisation in den untersuchten humanen Milzen und Tonsillae palatinae	55
4.2.2	Die humane MZ als Variante eines superfiziell follikulären SLO-Areals	56
4.2.3	Die Differenzen in den Sekundärfollikelstadien der humanen Milz und Tonsilla palatina als Korrelat ihres Antigenangebots	58
4.2.4	Die Differenzen der ‚pre-switch‘ zu ‚post-switch‘ mBC-Verteilung in der humanen Milz und Tonsilla palatina und die Bedeutung der humanen MZ	61

4.3 Schlusswort und Ausblick	64
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66
LITERATURVERZEICHNIS	68
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	76
CURRICULUM VITAE	77
DANKSAGUNG	78

ZUSAMMENFASSUNG

Gedächtnis-B-Zellen zählen zu den Hauptmediatoren unseres Immungedächtnisses. Das Verständnis ihrer Physiologie bildet die Grundlage zahlreicher medizinischer Interventionen, sowohl prophylaktisch, in Form iatrogener Immunität durch Impfungen, als auch therapeutisch, in Form von Immunmodulationen. Über die organspezifischen Nischen sowie das Wissen um deren potentiellen Eigenschaften für das Überleben und die Reifung dieser Zellen ist jedoch weder für die gesunden Verhältnisse noch für die Autoimmunität hinreichend aufgeklärt.

Die Mehrzahl histologischer Studien in humanen lymphatischen Geweben basiert auf konventionell lichtmikroskopisch untersuchten Paraffinpräparaten. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit widmete sich daher, zur methodischen Erweiterung und Verbesserung der bisherigen Untersuchungen, der Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten humaner Milzen und Tonsillae palatinae für die Analyse mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop. Dies gelang unter der parallelen Verwendung mehrerer durchflusszytometrisch genutzter Mausantikörper unter Benutzung von Haptensystemen, wodurch die Spezieslimitation in der Detektion umgangen wird und zusätzlich eine direkte Visualisierungsoption durchflusszytometrisch erhobener Daten besteht. Unter Anwendung dieser etablierten Methode war es durch die separate digitale Information von fünf Fluoreszenzsignalen eines einzelnen Gewebeschnittes erstmals möglich, die histologische Verteilung tonsillärer $CD27^+CD20^+Ki67^-$ Gedächtnis-B-Zellen im Kontext ihres Mikroenviroment zu beschreiben.

In den anschließenden vergleichenden histologischen Analysen zwischen Milzen und Tonsillae palatinae konnte als Gemeinsamkeit die dominierende Gedächtnis-B-Zellakkumulation, als unklar begrenztes follikelassoziertes Areal mit heterogener Zusammensetzung ihrer Immunglobulin-Isotypen, herausgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen dabei den kürzlich durch Steiniger¹ publizierten Vorschlag der Bezeichnung der humanen marginalen Zone der Milz als ‚superfizielle Zone‘, um von der Marginalzone der Nagetiere abzugrenzen und sprechen darüber hinaus für die Verwendung dieses Terms ebenso für weitere humane sekundäre lymphatische Organe. Für künftige Versuchstierstudien bedeutet dies, neben den vielen Vorteilen, kritischer mit terminologischen Gleichsetzungen umzugehen. Bezüglich der nachgewiesenen Unterschiede in der Immunglobulin-Subklassendominanz und der Ausprägung der Gedächtnis-B-Zellareale bleibt allgemein zu klären, welche Bedeutung dabei dem Anteil unterschiedlicher Adhärenzmoleküle zukommt und vor allem wie der immunologische mit dem follikulären Status in Organismen langfristig zusammen hängen.

ABSTRACT

Memory B cells are major mediators of our immunological memory. The understanding of their physiology is the basis for numerous medical interventions like prophylaxes by iatrogenic immunity through vaccine as well as therapy by immune modulation. However, the organ-specific niches and the knowledge about their potential features for the survival and maturation of these cells have not been sufficiently clarified yet, neither for healthiness nor for autoimmunity.

The majority of histological studies within human lymphatic tissues are based on paraffin sections which are examined by conventional light microscopy. To methodological extend and improve these existing investigations, in the first part of this study immunohistochemical multicolor stainings with frozen sections from human spleens and palatine tonsils were established and analyzed with confocal microscopy. This succeeded through the simultaneous usage of several mouse antibodies, also used in flow cytometry, in combination with hapten systems, whereby the species limitation in detection is circumvented and in addition a direct option to visualize flow cytometric analyses is gained. The application of this established method allowed the separate, digital information of five fluorescence signals within a single tissue section and therefore the initial histological localization of tonsillar CD27⁺CD20⁺Ki67⁻ memory B cells in the context of their microenvironment.

In the subsequent comparative studies it was found, that the commonality between the histological memory B cell localization in human spleens and palatine tonsils is the general accumulation of these cells directly around the follicular mantle in form of an unclear limited follicle associated area with a heterogeneous composition of their immunoglobulin isotypes. The present results support the recently published proposal by Steiniger¹ to rename the human splenic marginal zone to ‚superficial zone‘ to distinguish it from the differing rodent spleen and, moreover, to use this term equally for other secondary lymphoid organs. Besides many benefits, this emphasizes for future animal studies, to be more careful with terminological equations. Regarding the observed differences in the form of the memory B cell areas including the proportion of their immunoglobulin isotype distribution, the significance of various adherence molecules remains to be explored and efforts should be undertaken to inform about the long term interrelationships between the immunological and the follicular status in organisms.

1 EINLEITUNG

Der menschliche Organismus ist durch die Interaktion mit seiner Umwelt kontinuierlich potentiell pathogenen Erregern und Toxinen ausgesetzt. Die Immunologie beschreibt seine molekularen sowie zellulären antipathogenen Verteidigungsmechanismen, die in ihrer Summe die Immunität bilden.

Eine besondere Eigenschaft höherer Vertebraten ist das Immungedächtnis, durch welches bestimmte Verteidigungsmechanismen bei wiederholtem Kontakt strukturell gleicher oder ähnlicher Antigene mit höherer Effizienz und hier insbesondere frühzeitiger erfolgen. Das Erforschen dieser Mechanismen ist die Grundlage aller medizinischen Interventionen, die sowohl prophylaktisch, in Form iatrogen induzierbarer Immunität durch Impfungen, als auch therapeutisch, in Form von Immunmodulationen bei Autoimmunität, Allergien oder Immundefizienzen, von großer Bedeutung sind.

Die folgenden Kapitel geben einen kurzen Überblick über die grundlegenden immunologischen Zusammenhänge mit besonderem Hinblick auf das B-Zellgedächtnis. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um die Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen humaner Präparate aus Milzen und Tonsillae palatinae handelt, wurde dabei der Fokus auf die mikroskopische Anatomie sowie die histologischen Korrelate von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen (SLOs) gelegt.

1.1 Die Immunität und ihre Effektormechanismen

In Vertebraten umfasst die Immunität voneinander abhängige Subsysteme, wobei fundamental zwischen angeboren und erworben unterschieden wird.²

Die angeborene Immunität bildet sich durch ein phylogenetisches altes und bereits pränatal aktives Abwehrsystem, welches sich generell gegen ein breites Spektrum pathogener Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen sowie Wurmparasiten richtet. Neben Membranbarrieren und gelösten antimikrobiellen Proteinen, ist dieses Abwehrsystem durch die, bereits bei Erstinfektion, unmittelbaren sowie unspezifischen Reaktionen der natürlichen Killerzellen und der Gruppe der Leukozyten charakterisiert.

Die Leukozyten entstammen einer gemeinsamen myeloiden Progenitorzelle des Knochenmarks und verfügen über genetisch determinierte sogenannte ‚pattern recognition‘ Rezeptoren, die pathogenassoziierte Virulenzfaktoren binden. Auf diese Weise werden ihre antigenunabhängige Aktivierung sowie die Phagozytose des gebundenen Pathogens ermöglicht. Als phagozytierende Makrophagen oder dendritische Zellen (engl. dendritic cell; DC) bilden sie über den Prozess der anschließenden Antigenpräsentation mit verschiedenen Ko-Stimulatoren, wie Zytokinen und Liganden, eine wichtige Schnittstelle zu den dabei aktivierten Hauptmediatoren der erworbenen Immunität, den Lymphozyten.

Die Lymphozyten entstammen wiederum einer gemeinsamen lymphoiden Progenitorzelle

des Knochenmarks und unterscheiden sich von den Leukozyten insbesondere durch die extramedullären Reifungsprozesse ihrer genetisch nicht präformierten antigenspezifischen Rezeptoren. Sie erkennen die pathogenen Erreger, im Gegensatz zu den Mediatoren der angeborenen Immunität, spezifisch, können ein Immungedächtnis entwickeln und sind so auch in der Lage virusbefallene Körperzellen oder maligne Tumorzellen zu identifizieren und eliminieren.

1.1.1 Die T-Lymphozyten (T-Zellen)

Die Reifung funktioneller T-Zellen erfolgt namensgebend im Thymus aus den lymphoiden Progenitorzellen des Knochenmarks.³

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen T-Zellen wurden mittels Anti-CD3-Antikörper detektiert, da das CD3-Molekül an die Oberflächen-T-Zellrezeptoren aller peripheren T-Zellen gebunden ist, zur Signalweiterleitung in deren Zellinneres. Die ‚CD‘ (engl. cluster of differentiation) Nomenklatur bezieht sich dabei auf immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung.

So kann bei zytotoxischen T-Zellen darüber hinaus die Expression von CD8 als Ko-Rezeptor auf ihrer Oberfläche nachgewiesen werden. Sie erkennen über ihre Antigenrezeptoren Peptide im Kontext von Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex; MHC)-Klasse-I-Molekülen kernhaltiger Körperzellen, wobei die Hauptfunktion in der aktiven Eliminierung, der als Pathogen infiziert identifizierten Körperzelle, liegt.⁴

T-Helfer (T_H)-Zellen exprimieren dagegen zusätzlich CD4 auf ihrer Oberfläche und registrieren über ihre Antigenrezeptoren Peptide im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung von B-Zellen, zytotoxischen T-Zellen sowie Leukozyten. Sie differenzieren nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen in die Subklassen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} oder auch regulatorische T-Zellen.⁵

Neben der Charakterisierung von T-Zellsubklassen über deren intrazelluläres Zytokinmuster nach Aktivierung, werden diese ebenfalls als zentrale Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen unterschieden, welche sich aus naiven T_H -Zellen differenzieren. Unabhängig davon scheint eine hohe Plastizität zwischen einzelnen Gedächtnis-T-Zellen zu bestehen.

1.1.2 Die B-Lymphozyten (B-Zellen)

Die frühe Entwicklung der B-Zellen, ein vom Bildungsort in der Bursa fabricii des Vogels abgeleiteter Term, beginnt ebenfalls aus lymphoiden Progenitorzellen im Knochenmark.⁶ Durch eine geordnete Abfolge somatischer Rekombinationen entstehen über die pro- und prä-B-Zellen unreife B-Zellen, einschließlich der B-Zellen mit Expression der Surrogat-Leichtkette, die ihren B-Zellrezeptor in Form von Immunglobulin (Ig)M an der Oberfläche ausbilden.⁶

Diese verlassen als transitionale B-Zellen das Knochenmark und exprimieren als reife naive B-Zellen IgM sowie IgD.

Die terminale B-Zellreifung findet in der Keimzentrums (engl. germinal center; GC)-Reaktion in den SLOs statt, wobei sich der B-Zellrezeptor durch erneute somatische Mutation in seiner Spezifität und Affinität verbessert (Vergleich Abschnitt 1.2.1). Die sich hierbei differenzierenden reaktiven Gedächtnis-B-Zellen (engl. memory B cell; mBC) und Antikörper sezernierenden Plasmazellen (engl. plasma cell; PC) bilden die beiden Hauptmediatoren des immunologischen B-Zellgedächtnisses⁷ (Vergleich Abschnitt 1.3).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen B-Lymphozyten wurden mittels Anti-CD20-Antikörper gefärbt; ein Molekül, das vermutlich an Regulationsprozessen der B-Zellaktivierung sowie Proliferation beteiligt ist und dessen Expression auf der Oberfläche aller B-Zellen ab dem späten prä-B-Zellstadium initiiert wird. Es wird zudem vermutet, dass CD20 ein Kalzium-Kanal ist, wobei sein Ligand bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Die CD20-Expression geht erst während der Differenzierung in PCs verloren,^{8,9} wobei in der humanen Tonsilla palatina eine geringe CD20-Expression auf PCs nachgewiesen wurde¹⁰.

1.2 Die histologische Organisation der Lymphozyten in den SLOs

Die Aufrechterhaltung der Immunität wird durch die rezirkulierenden Lymphozyten, als funktionelle Verbindung der Organe und Gewebe des menschlichen Organismus, gewährleistet. Deren geordnete Aktivierung und Differenzierung findet dabei in den SLOs statt. Zu diesen werden im Menschen die Milz, die Lymphknoten sowie das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. mucosa-associated lymphatic tissue; MALT) gezählt.

Das MALT umfasst die Gesamtheit der lymphatischen Aggregate und solitären lymphatischen Follikel, wie sie in allen Schleimhäuten vorkommen können. Seine weniger anatomisch definierten zellulären Akkumulationen werden in der Literatur nach ihrer Lokalisation mit eigenen Namen versehen, wobei die jeweiligen Bezeichnungen meist Tierstudien entstammen und nur limitiert auf den Menschen zu übertragen sind.¹¹

Der Bezeichnung NALT (engl. nasal-associated) wird der humane Waldeyer-Rachenring einschließlich seiner organartigen Formationen, den Tonsillen des Naso- und Oropharynx (Vergleich Abschnitt 1.5), zugeordnet. Ursprünglich bezieht sich das NALT auf die paarige Ansammlung lymphatischen Gewebes in der dorsalen Nasenhöhle von Nagetieren, die hingegen keine Tonsillen aufweisen.¹² Dieses klassische NALT lässt sich beim Menschen nur im frühen Kindesalter nachweisen.¹³ Neben der Spezies sind für die Ausprägung des MALT damit ebenfalls das Alter sowie der Immunstatus von Bedeutung, sodass sich auch der BALT (engl. bronchus-associated)-Anteil des MALT in den Lungen gesunder Erwachsener nicht nachweisen lässt.¹⁴

Das GALT (engl. gut-associated) und die damit eingeschlossenen Peyer-Plaques des Ileum beziehen sich auf den größten Teil des menschlichen MALT.

Als Gemeinsamkeit der SLOs gilt ihr komplexer Aufbau aus retikulärem Bindegewebe, welches durch Stromazellen aufrechterhalten wird.¹⁵ Die dabei inbegriffenen spezialisierten fibroblastischen Retikulumzellen und die interdigitierenden DCs sowie die folliculären DCs (FDCs) sind für die charakteristische Zonengliederung mitbestimmend, da sie die rezirkulierenden Lymphozyten durch Chemokine in bestimmte Regionen dirigieren, sodass sich konsekutiv Areale ausbilden, die überwiegend von B- oder T-Zellen durchwandert werden.

Die B-Zellzonen sind in allen SLOs durch die kugelförmigen Akkumulationen von B-Zellen gekennzeichnet, den Lymphfollikeln. Der Primärfollikel bezeichnet dabei die Umgebung, in der die naiven rezirkulierenden B-Zellen am Leben erhalten werden, welche wiederum im GC des Sekundärfollikelstadiums proliferieren und dabei in ihrer Affinität reifen sowie einen Isotypenwechsel (engl. switch) vollziehen können (Vergleich Abschnitt 1.2.2).

Die Bezeichnung der T-Zellzonen erfolgt dagegen organabhängig. Aufgrund der Lokalisation der T-Zellakkumulationen werden diese in der Milz als periarterielle lymphatische Begleitscheide (PALS), in den Lymphknoten Paracortex und in den Tonsillen als interfollikuläre Region (IF) benannt.

1.2.1 Die hoch-endothelialen Venolen (HEVs) als histologisches Korrelat für die Rezirkulation der Lymphozyten

Die HEVs entsprechen der postkapillären Gefäßstrecke des systemischen Blutkreislaufs und lassen sich in den T-Zellzonen aller SLOs, mit Ausnahme der humanen Milz, nachweisen.¹⁶ In nicht-lymphatischen Geweben können sie sich während chronisch entzündlichen Prozessen sowie Neoplasien entwickeln.

Die Lymphozyten, T-Zellen dabei in höherem Maße als B-Zellen, wechseln während ihres Lebenszyklus mehrmalig zwischen Intra- und Extravasalraum. Dabei können sie, durch die Chemokin induzierte Aktivierung ihrer Integrine, über die HEVs selektiv vom Blut in die lymphatischen Gewebe emigrieren.

Die Integrine werden, neben Selektinen und Muzinen, zu den sogenannten ‚Homing‘-Rezeptoren gezählt. Abhängig vom Funktionszustand exprimieren die Lymphozyten unterschiedliche Subklassen, woraus deren Ortsselektivität resultiert. Das ‚Homing‘ beruht dabei auf der Adhäsion zwischen dem Lymphozyt und seinem komplementären Liganden des Gefäßendothels, dem vaskulären Addressin. Eine bekannte Interaktion bilden das auf GALT-, ‚Homing‘-Lymphozyten exprimierte Integrin- $\alpha_4\beta_4$ mit dem mukosalen Adressin-Zelladhäsionsmolekül-1 (engl. mucosal addressin cell adhesion molecule 1; MAdCAM-1) der HEVs mesenterialer Lymphknoten und Peyer-Plaques.¹⁷ Die Ergebnisse zum immunhistochemischen Nachweis von MAdCAM-1 in der humanen Milz und Tonsilla palatina sind in Abschnitt 3.5. dargelegt.

Alle SLOs verfügen über mehr oder weniger ausgeprägte efferente Lymphgefäße, über die die Lymphe einschließlich der Lymphozyten als afferentes Lymphgefäß in den jeweils nachgeschalteten Lymphknoten mündet und schließlich über den Ductus thoracicus erneut in den

systemischen Blutkreislauf gelangt.

1.2.2 Das GC als histologisches Korrelat für die T-Zellabhängige B-Zellantwort

B-Zellantworten werden als T-Zellabhängig oder T-Zellunabhängig klassifiziert, wobei der determinierende Faktor zwischen den beiden Differenzierungen offenbar in der Antigenbeschaffenheit liegt. B-Zellen können dabei durch mitogene oder komplex strukturierte Antigene aktiviert werden, ohne die zusätzliche Kostimulation durch T-Zellen. Die beteiligten B-Zellen sind in der Regel jedoch weder langlebig noch mutiert.^{18,19} Der folgende Abschnitt bezieht sich auf die histologischen Korrelate der T-Zellabhängigen Form der B-Zellaktivierung, die in der Generierung der in der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmikroskopisch untersuchten mBCs resultiert.

Bei Kontakt der rezirkulierenden reifen naiven B-Zellen mit kognitivem Antigen werden diese aktiviert und in den T-Zellzonen der SLOs zurückgehalten. Nach zusätzlicher Stimulierung durch T_{H2} -Zellen, die zuvor von DCs über deren MHC-II gebundenes Fragment des gleichen Antigens aktiviert wurden, bildet sich der sogenannte primäre Fokus. Die B-Zellen beginnen hier zu proliferieren, wobei ein Teil des Klons zu PCs differenziert und niedrig affine Antikörper, prädominierend IgM, sezerniert.

Ein anderer Teil der B-Zellen migriert gemeinsam mit komplementären T_H -Zellen in die angrenzenden B-Zellfollikel und initiieren dort die GC-Reaktion. Im Verlauf dieser GC-Reaktion findet eine starke Proliferation der B-Zellen statt, wobei die Interaktion mit T_H -Zellen und FDCs zur Ausbildung der charakteristischen Struktur des Sekundärfollikels führt.^{20,21}

Die histologische Bezeichnung als dunkle (engl. dark) Zone und helle (engl. light) Zone lässt sich über die Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der B-Zellen im Hämatoxylin Eosin Präparat ableiten. Die ‚dark‘ Zone bezieht sich auf den Bereich der dichter liegenden, stark proliferierenden B-Zellen. Diese werden als Zentroblasten bezeichnet und weisen ein stark basophiles dunkles Zytoplasma auf. Die ‚light‘ Zone wird von dem Geflecht aus FDC-Fortsätzen zusammen mit Makrophagen, T_{H2} -Zellen und den, als Zentrozyten bezeichneten, B-Zellen mit hellem Zytoplasma gebildet. Die dabei verdrängten naiven B-Zellen stellen sich als follikulärer Mantel (FM) um das GC dar.²²

Die GC-B-Zellen zirkulieren innerhalb und zwischen der ‚light‘ und ‚dark‘ Zone, wobei sie in einem Wechsel aus Mutation und Selektion ihre Affinität zum kognitiven Antigen steigern.^{20,21} Für den Prozess der Selektion ist auf den Fortsätzen der FDCs das native Antigen gebunden, welches die B-Zellreaktion ausgelöst hat. Dies ermöglicht darüber hinaus eine spätere, erneute B-Zellaktivierung. In immunhistochemischen Färbungen verursacht dies die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen auf den FDC-Fortsätzen.

Der Wechsel zwischen Mutation und Selektion während der GC-Reaktion führt zum Expandieren hoch affiner GC-B-Zellklone, die gemeinsame sowie individuelle somatische Mutationen tragen und das GC verlassen können und zu mBCs oder PCs differenzieren.^{22,23,24} In den

Zentrozyten des GC kann darüber hinaus der ‚switch‘ des B-Zellrezeptors zum Isotyp IgA oder IgG stattfinden, der zu einer veränderten Effektorfunktion des Antikörpers führt.²⁵ Klassisch definiert gelten langlebige ruhende, sekretorisch inaktive IgD⁻ post-GC-B-Zellen mit ‚geswitchtem‘ B-Zellrezeptor sowie somatisch mutierten V-Genen, letzteres als Anzeichen der Affinitätsreifung in GC-Reaktionen, als mBCs.^{26,21}

1.3 Das immunologische B-Zellgedächtnis und mBCs

Das immunologische B-Zellgedächtnis führt bei wiederholtem Kontakt strukturell gleicher oder ähnlicher Antigene zur effizienten Verteidigung durch einen präformierten Serumtiter spezifischer Antikörper, der einerseits aus der Primärantwort resultiert und durch Aktivierung spezifischer mBCs via Differenzierung in PCs zu Antikörpern hoher Affinität führt. Andererseits kann dieser Titer langfristig durch kontinuierlich sezernierende langlebige PCs, als sogenannte humorale Gedächtnisfunktion, aufrechterhalten werden.^{27,28} Eine Besonderheit der Sekundärantwort ist die im Vergleich zum Primärkontakt schnellere, höheraffine Produktion von Antikörpern durch Stimulation von mBCs, welchen die reaktive zelluläre Gedächtnisfunktion zugeschrieben wird.²⁹

Nach heutigem Stand sind im menschlichen Organismus 40-50% aller im Blut zirkulierenden B-Zellen somatisch mutierte mBCs.³⁰ Zirka 60% dieser somatischen Mutationen wurden auf IgM Transkripten von IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen (zirka 40%) und von IgM⁺IgD⁻CD27⁺ „IgM-only“ B-Zellen (zirka 20%) nachgewiesen,^{31,30} wobei deren Mutationsgehalt vermutlich nur etwa der Hälfte dem der ‚geswitchten‘ mBCs entspricht.³² Im peripheren Blut konnte darüber hinaus eine kleine Population IgM⁻IgD⁺CD27⁺ „IgD-only“ B-Zellen (zirka 1%), mit überdurchschnittlich hoher Mutationsfrequenz, nachgewiesen werden.^{33,30}

Als Gemeinsamkeit der beschriebenen Populationen somatisch mutierter reaktivierbarer B-Zellen gilt die Expression von CD27 als Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie auf ihrer Oberfläche,^{31,34} welcher vermutlich eine Rolle in der T-Zellinteraktion sowie der Stimulierung durch diese spielt.³⁵ Naive B-Zellen sind hingegen IgM⁺IgD⁺CD27⁻, sodass CD27 als klassischer Surrogat-Marker humaner mBC verwendet werden kann und daher ebenfalls in der vorliegenden Arbeit zur histologischen Abgrenzung naiver B-Zellen diene. Da CD27 darüber hinaus durch humane T-Zellen, natürliche Killerzellen und PCs exprimiert wird,³⁶ sind für die sichere mBC-Identifizierung jedoch mehrere Marker notwendig (Vergleich Abschnitt 3.1).

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die Färbung mit Rhodamine 123 als weitere Möglichkeit zur Identifizierung humaner mBCs dient, da dies von naiven B-Zellen durch deren ‚multidrug resistance‘ Protein ABCB1 (engl. ATP binding cassette subfamily B member 1) aus der Zelle gepumpt wird.³⁷ Es konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Population IgG⁺ und möglicherweise IgM⁺ mBCs im peripheren Blut existiert, die CD27⁻ ist^{38,39} und dass mBCs in vivo häufiger spontan proliferieren als naive B-Zellen.³⁷ Diese funktionellen Studien sind

jedoch nicht auf immunhistochemische Untersuchungen übertragbar; daher konzentriert sich diese Arbeit auf CD27 als Marker von mBCs.

Die genauen Mechanismen der Induktion, des Überlebens sowie der Reaktivierung der mBCs sind bisher nur unvollständig verstanden. Neuere Untersuchungen zur prozentualen Verteilung in den unterschiedlichen humanen lymphatischen Geweben ergaben, dass der rezirkulierende mBC-Pool nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge auszumachen scheint und sich die meisten CD27⁺ mBCs in der Milz, gefolgt von den Tonsillae palatinae und dem Knochenmark befinden und phänotypisch nur wenige Unterschiede aufweisen.⁴⁰ Beschreibungen über die histologische Verteilung und lokale Organisation dieser CD27⁺ mBCs sind bisher nur für die Milz zu finden. Diese wurden vornehmlich über Subtraktionsfärbungen auf Paraffinschnitten gewonnen und sind in Abschnitt 1.4.2. sowie 4.2. genauer erläutert.

1.4 Die Histologie der Milz

Die Milz ist in allen Vertebraten ausgebildet und liegt beim Menschen intraperitoneal im linken Epigastrium. Sie zählt zu den SLOs und gilt in der Maus darüber hinaus als Organ der späten B-Zellentwicklung von der Transitional- zur reifen B-Zelle.⁴¹ Sie hebt sich von allen anderen SLOs als größtes umkapseltes immunologisches Organ mit einzigartiger Gefäßarchitektur und hohem systemischen Blutdurchfluss über die Arteria splenica ab⁴² (Vergleich Abschnitt 1.4.1).

Neben dem großen Spektrum unterschiedlicher Funktionen ist ihr Verlust insbesondere durch vermehrte Infektionen kapseltragender Bakterien mit dem Risiko des OPSI-Syndroms (engl. overwhelming post splenectomy infection) geprägt.⁴³

Der strukturelle sowie funktionelle Aufbau der Milz ist in Ratten und Mäusen am weitesten und im Menschen erst in den letzten Jahren fortschreitend untersucht und charakterisiert sich durch ihr, als Pulpa bezeichnetes, weiches Parenchymgewebe. Auf der Schnittfläche frischen humanen Milzgewebes lassen sich zirka 1 mm große hellgraue Areale identifizieren, die in ihrer Gesamtheit das histologische Organkompartiment der weißen Pulpa bilden und gleichmäßig in das dunkelrote Gewebe der roten Pulpa eingebettet sind.

Viele aus der Tierforschung stammende Untersuchungen der einzelnen Pulpakompartimente werden nach wie vor auf die Verhältnisse im Menschen übertragen und Bezeichnungen sowie Befunde unkritisch mit Erkenntnissen aus der Forschung an humanen Milzen vermengt, wengleich wesentliche strukturelle Unterschiede der roten und weißen Pulpa bestehen; insbesondere in ihrer sich am Übergang bildenden marginalen Zone (MZ) sowie der im Menschen darüber hinaus nachweisbaren perifollikulären Zone¹ (Vergleich Abschnitt 1.4.3). Der folgende Abschnitt weist daher neben einem Überblick über die mikroskopische Anatomie der Milz auf mikroanatomische Unterschiede von Nagetieren und Menschen hin.

1.4.1 Die rote Milzpulpa

Rote und weiße Pulpa sind von einer dünnen Organkapsel umgeben, deren Ausläufer, die sogenannten Trabekel, zusammen mit den trabekulären Ästen der Arteria splenica in das Organinnere ziehen. Die Seitenäste der Trabekelarterien wiederum verlassen die Bindegewebsstraßen als Zentralarterien, um die sich die weiße Pulpa bildet (Vergleich Abschnitt 1.4.2 und Abbildung 1/A). Nach dem Verlassen der PALS werden diese Zentralarterien durch kurze Arterien der roten Pulpa fortgesetzt, die sich gelegentlich in zahlreiche kleine Äste, die Pinselarterien, aufspalten und schließlich in Kapillaren enden, die in den Pulpasträngen verlaufen; ein durch Fibroblasten produziertes Netzwerk retikulärer Fasern.

Die rote Pulpa zeichnet sich durch die milzspezifischen weiten, dünnwandigen Blutgefäße aus, den sogenannten venösen Sinus, in welche das Blut nach Verlassen der wahrscheinlich offen endenden Kapillaren drainiert.

Im Gegensatz zu Mäusen und Ratten, bildet die rote Pulpa im Menschen den deutlich größeren Gewebeanteil. Sie stellt einen Ort residenter Plasmablasten und PCs dar, deren produzierte Antikörper unmittelbar in den Blutkreislauf gelangen.⁴⁴ Zahlreiche residente Makrophagen lassen die rote Pulpa zudem als größtes aktives phagozytierendes Kompartiment fungieren. Neben der Filterung von Antigenen, Mikroorganismen und alten Erythrozyten bildet sie ein wichtiges Reservoir an Thrombozyten⁴⁵ und vermutlich Monozyten⁴⁶.

1.4.2 Die weiße Milzpulpa in der Maus und der Ratte

Die weiße Pulpa, bestehend aus den histologisch abgrenzbaren T- und B-Zellregionen, bildet sich rings um die daher als solche bezeichneten Zentralarterien. In Nagetieren (Vergleich Abbildung 1/B1) sind diese kontinuierlich von der PALS umgeben, deren Hauptpopulation durch T-Zellen gebildet wird. An die PALS-Oberfläche sind B-Zellfollikel mit GC und FM gegliedert. Das gesamte PALS-Follikel-Arrangement wird durch einen marginalen Sinus und die MZ, als zweites B-Zellkompartiment, in Richtung rote Pulpa begrenzt.⁴⁷ Beim marginalen Sinus handelt es sich um eine blutgefüllte Spalte, die in Mäusen,⁴⁷ jedoch nicht in Ratten,⁴⁸ durch MAdCAM-1⁺ Zellen begrenzt wird.

In beiden Nagetierspezies werden zwei spezielle Makrophagenpopulationen mit der MZ assoziiert; marginale metallophile Makrophagen, die zwischen marginalem Sinus und PALS oder Follikel erscheinen und MZ-Makrophagen, die sich über die gesamte MZ verteilt nachweisen lassen.^{49,44}

In der MZ befinden sich einige Erythrozyten, sodass dieses Areal funktionell ebenso dem offenen Kreislaufsystem der roten Pulpa zuzuordnen ist. Die Hauptpopulation charakterisiert diese jedoch als Kompartiment der weißen Pulpa mit IgM⁺IgD⁻ B-Zellen,⁵⁰ die in Ratten als nicht-mutierte polyreaktive B-Zellen beschrieben werden⁵¹ und demnach keine mBCs darzustellen scheinen. Daneben können einige rezirkulierende IgD⁺IgM⁺ B-Zellen nachgewiesen

werden.⁵²

Ob die MZ-B-Zellen aus Mäusen und Ratten mit den B-Zellen auf der Oberfläche humaner Follikel verglichen werden können, bleibt weiterhin ungeklärt. Die MZ-B-Zellen der Ratte wurden lange Zeit als vornehmlich sessil angesehen,⁵⁰ wohingegen neuere Untersuchungen in der Maus auf Motilität hinweisen.^{53,54}

1.4.3 Die weiße Milzpulpa im Menschen

Auch im Menschen (Vergleich Abbildung 1/B2) bilden die Zentralarterien das Zentrum der weißen Pulpa, wobei die PALS hier variabel in ihrer Ausdehnung ist und Unterbrechungen aufweist.⁵⁵ Die humane MZ lässt sich, im Gegensatz zur Nagetierspezies, nur Follikelassoziiert nachweisen, wobei sich hier keine Trennung zum FM durch einen marginalen Sinus zeigt und keine metallophilen Makrophagen nachweisbar sind.⁵⁶

Es wird angenommen, dass die humanen $\text{IgM}^+\text{IgD}^{+/-}\text{CD27}^+$ MZ-B-Zellen das Äquivalent zu den MZ-B-Zellen der Nagetierspezies darstellen,^{57,58} wobei, neben der Expression von CD27 und dem hohen Mutationsgehalt dieser Zellen, ein weiterer wesentlicher Unterschied darin besteht, dass sich die humanen MZ-B-Zellen ebenfalls im peripheren Blut und weiteren SLOs nachweisen lassen und somit weder organspezifisch noch an die MZ gebunden zu sein scheinen.

Eine weitere Besonderheit der humanen MZ stellen Fibroblasten eines speziellen Phänotyps sowie CD4^+ T_H -Zellen dar, die vornehmlich in den zentralen Bereichen der MZ nachweisbar sind.¹ In den FM-fernen MZ-Arealen finden sich darüber hinaus $\text{IgM}^-\text{CD27}^+$ vermutlich ‚geswitchte‘ mBCs und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ rezirkulierende B-Zellen, wobei vor allem letztere ebenfalls an der Oberfläche der PALS nachweisbar sind.¹

In Richtung rote Pulpa lässt sich als Besonderheit im Menschen die zusätzliche perifollikuläre Zone mit speziellen Hülsenkapillaren abgrenzen, die von einer Makrophagen-Manschette umgeben sind.^{59,60} Ihre Funktion ist bisher nicht ausreichend geklärt. Diese perifollikuläre Zone wird bereits der roten Pulpa zugeordnet, ist jedoch funktionell eng mit der weißen Pulpa verbunden, da sich in ihr migrierende Lymphozyten nachweisen lassen.

In der humanen Milz lassen sich weder HEVs noch afferente lymphatische Gefäße nachweisen. Die genauen Pfade rezirkulierender Lymphozyten bleiben aufgrund nicht möglicher in vivo Versuche bisher ungeklärt. In Ratten gelangen markierte intravenös injizierte Lymphozyten zum Teil zunächst über den marginalen Sinus in die MZ. Die B-Zellen erreichen daraufhin die Follikel, indem sie durch die PALS migrieren, während sich T-Zellen direkt in die PALS siedeln.^{52,61,62} Ein anderer Teil scheint über bestimmte Gefäßabschnitte von Arteriolen der roten Pulpa einzuwandern.⁶³ Bezüglich der Antigenaufnahme wird in Mäusen diskutiert, dass über das Blut in den Übergang von weißer zu roter Pulpa gelangende Antigene von schlecht definierten myeloiden Antigentransport-Zellen oder, gebunden an IgG und Komplement, von den MZ-B-Zellen in die Follikel transportiert werden.^{64,65} Darüber hinaus scheinen

rezirkulierende B-Lymphozyten Antigene, die an IgE gebunden sind, aus dem Blutkreislauf in die Follikel zu transportieren.⁶⁶

Somit liegen hier erhebliche Unterschiede zwischen der anatomischen und funktionellen Organisation der humanen Milz zu den Nagetieren vor, die zunehmende Berücksichtigung einfordern.

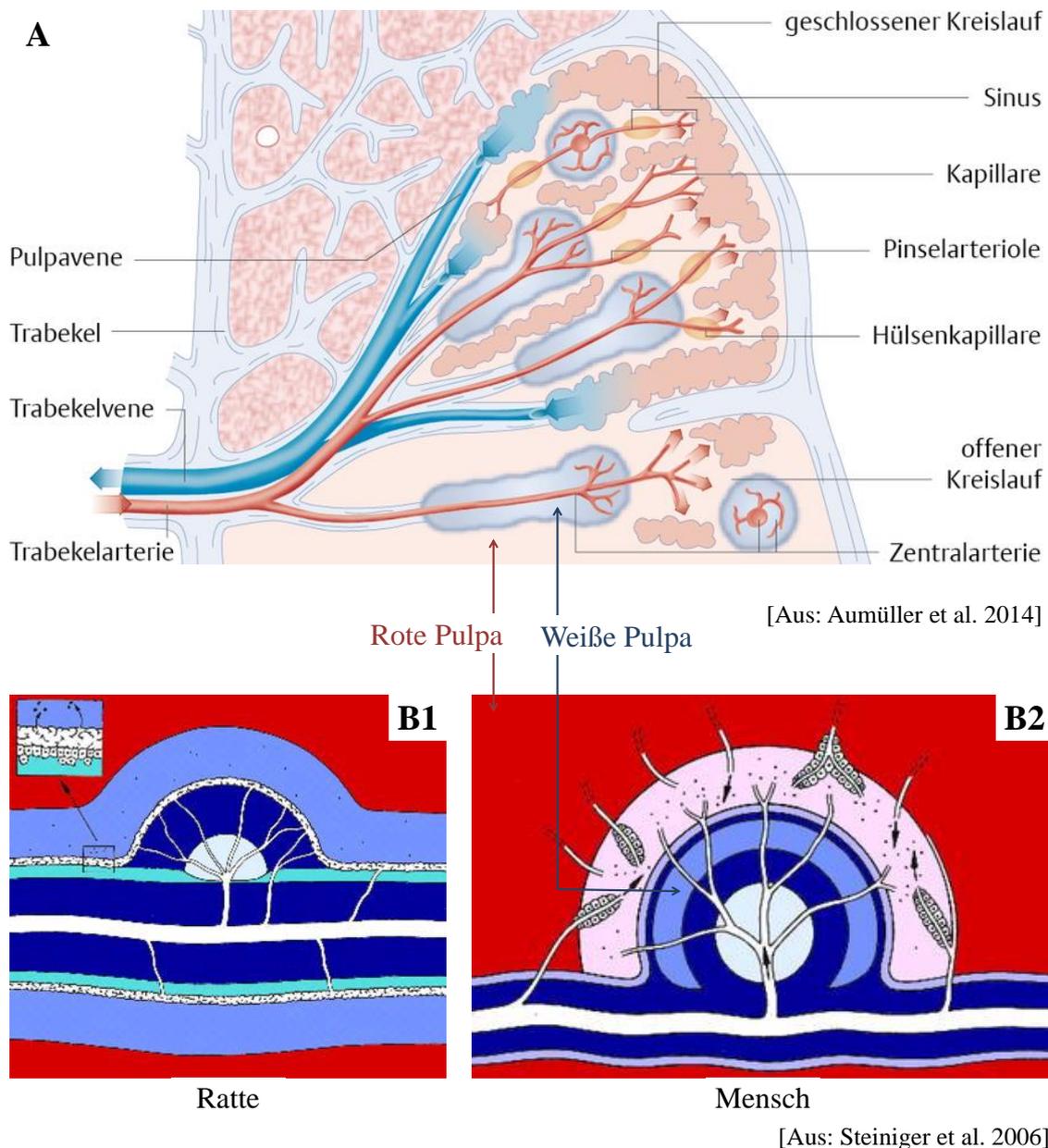


Abbildung 1 Schematische Übersicht: Histologische Organisation der Milz und Vergleich der Zusammensetzung der weißen Pulpa von Mensch und Nager (A aus Aumüller et al. 2014⁶⁷ ; B1 und B2 aus Steiniger et al. 2006⁶⁸)

A: Schematische Übersicht über die histologische Organisation der humanen Milz. Die Seitenäste der Trabekelarterien verlassen die Bindegewebsstraßen als Zentralarterien, um die sich die weiße Pulpa bildet. Nach Verlassen der PALS werden die Zentralarterien durch kurze Arterien der roten Pulpa fortgesetzt, die sich gelegentlich in zahlreiche kleine Äste (Pinselarterien) aufspalten und schließlich in Kapillaren münden. Die rote Pulpa zeichnet sich durch weite, dünnwandige Blutgefäße aus (venöser Sinus), in welche das Blut nach Verlassen der vermutlich offen endenden Kapillaren drainiert. In der humanspezifischen perifollikulären Zone, am Übergang von weißer zu roter Pulpa, lassen sich spezielle Hülsenkapillaren abgrenzen, die von einer Makrophagen-Manschette umgeben sind.

(Fortsetzung Abbildung 1) **B1:** Längsschnitt durch die weiße Pulpa der Ratte. In Nagetieren sind die Zentralarterien (weiß) kontinuierlich von der PALS (dunkelblau) umgeben. Die äußere PALS (türkis) stellt die Migrationszone für rezirkulierende B-Zellen dar. An die PALS-Oberfläche ist ein B-Zellfollikel mit GC (weiß) und FM (dunkelblau) gegliedert. Das gesamte PALS-Follikel-Arrangement wird durch die MZ (hellblau) in Richtung rote Pulpa (rot) begrenzt. Das kleine Fenster zeigt einen Ausschnitt der zum FM gerichteten Grenze dieser MZ, die aus dem marginalen Sinus und marginalen metallophilen Makrophagen (weiß) gebildet wird. **B2:** Längsschnitt durch die humane weiße Pulpa. Die PALS (dunkelblau) ist variabel in ihrer Ausdehnung und weist Unterbrechungen auf (nicht dargestellt). Im abgebildeten Beispiel ist der B-Zellfollikel mit GC (sehr helles blau) und FM (dunkelblau) seitlich an die PALS gegliedert, wobei die Zentralarterie (weiß) ebenfalls mittig durch den Follikel verlaufen kann. Die humane MZ (hellblau) lässt sich nur Follikelassoziiert nachweisen. Sie wird unterteilt durch einen halbkreisförmigen Bereich aus spezialisierten Fibroblasten und T-Zellen (dunkelblau), wobei der zur roten Pulpa (rot) gerichtete MZ-Anteil rezirkulierende B-Zellen enthält und ebenfalls an der PALS-Oberfläche nachgewiesen werden kann. Am Übergang zur roten Pulpa lässt sich die perifollikuläre Zone (rosa) mit speziellen Hülsenkapillaren abgrenzen, die von einer Makrophagen-Manschette umgeben sind.

1.5 Die Histologie der humanen Tonsilla palatina als Teil des MALT

Als wesentliche MALT-Aktivität ist bekannt, dass sämtliche in Kontakt zur Umwelt liegende Schleimhautepithelien und exokrine Drüsen von einer Schicht antimikrobieller IgA-Antikörper überzogen sind.¹¹ Diese werden von den subepithelialen PCs gebildet und per Transzytose von den Epithelien auf deren Oberfläche geschleust. Ein weiteres Charakteristikum ist die Fähigkeit der lokalen Antigenaufnahme und Induktion systemischer Immunität.^{69,70}

Pharynxassoziiertes lymphatisches Gewebe kann bei allen Vertebraten nachgewiesen werden; seine Anordnung und Ausdehnung unterliegt jedoch, neben dem Alter und dem immunologischen Status, großen speziesabhängigen Varianzen. Das humane MALT ist hier vergleichsweise stark ausgebildet und die Eingänge des Epi- sowie Mesopharynx vom sogenannten Waldeyer-Ring umgeben.

Die prominenten Anteile des Waldeyer-Rings werden durch organartige Formationen lymphatischen Gewebes gebildet. Hierzu zählen die jeweils paarig angelegten Tonsillae palatinae zwischen den Gaumenbögen sowie die Tonsillae tubariae an der Mündung der Tube, die sich nach kaudal in die „Seitenstränge“ fortsetzen und die jeweils unpaarig angelegte Tonsilla lingualis am Zungengrund sowie die Tonsilla pharyngealis am Rachendach.

Unter den Säugetieren und Vögeln bilden die meisten Spezies, wenn auch nicht im selben Umfang wie beim Menschen, eine oder mehrere Tonsillen aus. Die Nagetiere bilden hier die Ausnahme, bei denen diese gänzlich fehlen.¹¹

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen Tonsillae palatinae sind im Tierreich am regelmäßigsten ausgebildet, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Anatomie, wie beispielsweise durch das Fehlen der charakteristischen, als Krypten bezeichneten, tiefen tubulären Einstülpungen bei Hunden und Hasen⁷¹.

Im Menschen sind diese Krypten, wie auch die Oberfläche, von mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel bedeckt. Die Architektur dieses Plattenepithels ist im Bereich direkt oberhalb der dicht mit dem Kryptenepithel assoziierten B-Zellfollikel zu einem weitmaschigen Netz mit

unterbrochener Basallamina umgewandelt und von Leukozyten und Lymphozyten durchsetzt. Die transepitheliale Antigenaufnahme in diesem follikelassoziierten Epithelbereich ist nicht ausreichend geklärt. Es werden Ähnlichkeiten zum Mechanismus der Peyer-Plaques über die M-Zellen in deren Domepithel diskutiert.⁷¹ Denkbar wäre auch, dass Antigene über die Fortsätze intraepithelialer DCs eingefangen werden oder die nachgewiesenen ‚Tight junctions‘ der oberen Epithellagen⁷² Lücken aufweisen.

Die Lamina propria mucosae bezeichnet das spezielle Bindegewebe direkt unterhalb des Epithels von Schleimhäuten. In der Tonsille wird diese Lamina propria zwischen Epithel und B-Zellfollikel auch als subepitheliale Region (SE) bezeichnet. Neben wenigen T-Zellen und Makrophagen wird die Hauptpopulation dieser SE durch ruhende IgD⁻ B-Zellen gebildet,⁷³ die per definitionem als klassische mBCs gelten. In weiterführenden Studien wurden Subpopulationen dieser B-Zellen beschrieben⁷⁴ und die SE als MZ-Äquivalent der Milz diskutiert.^{75,74} Bisher lassen sich in der Literatur jedoch keine histologischen Aufnahmen direkt nachgewiesener CD27⁺ mBCs im SE finden.

Die T-Zellenreiche IF liegt zwischen und am epithelfernen unteren Pol der B-Zellfollikel, wobei der CD4⁺ T_H-Zellanteil dominiert. Charakteristisch sind die hier gelegenen HEVs (Vergleich Abschnitt 1.2.1.), über die die Lymphozyten sowie die interdigitierenden DCs in das Gewebe migrieren.

1.6 Fragestellung

Die einleitend vorgestellten Kenntnisse zur mikroskopischen Anatomie und Zellverteilung der SLOs begründen sich in humanen Präparaten bisher vornehmlich auf Auswertungen mittels konventioneller Lichtmikroskopie. Über die histologische Verteilung von CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen (mBCs) liegen dabei nur für die humane marginale Zone (MZ) der Milz Beschreibungen vor, die vornehmlich über Subtraktionsfärbungen auf Paraffinschnitten gewonnen wurden. Über die Verteilung von CD27⁺ mBCs in der Tonsilla palatina existieren dagegen keine Beschreibungen. Diese werden bisher in der subepithelialen Region (SE) vermutet.

Da aus durchflusszytometrischen Untersuchungen fluoreszenzmarkierter Zellen bereits Erkenntnisse über die prozentuale Verteilung und Eigenschaften von mBCs auf die verschiedenen lymphatischen Gewebe vorliegen, ergab sich als primäres Ziel zunächst:

1. Die Etablierung immunhistochemischer Färbungen durchflusszytometrisch verwendeter fluoreszenzmarkierter Antikörper für den direkten Nachweis von mBCs im Kontext des Mikroenviroments, um erstmals auf Gefrierschnitten detailliert deren gewebebedingte Organisation aufzuklären.

2. In diesem Zusammenhang widmet sich die vorliegende Arbeit anschließend den folgenden Fragen:

Wie vergleichen sich die Ergebnisse aus Paraffinschnitten über die humane weiße Milzpulpa zu den erhobenen Daten mittels Fluoreszenzmikroskopie?

- a) Lässt sich die humane MZ in einen inneren und äußeren Bereich differenzieren?
- b) Befinden sich mBCs außerhalb dieser MZ?
- c) Handelt es sich bei den B-Zellen an der Oberfläche der periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS) um eine vornehmlich naive B-Zellpopulation?
- d) Können unterschiedliche Bereiche für pre- und post-switch mBCs charakterisiert werden?

Wie stellt sich die Verteilung und Organisation von CD27⁺ mBCs in der humanen Tonsilla palatina dar und insbesondere, lässt sich die SE als Äquivalent der Milz-MZ definieren?

Die Etablierung von Multifluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten war eine essentielle Voraussetzung zur Beantwortung, da für die sichere Abgrenzung von mBCs innerhalb eines Schnittes mindestens drei Parameter benötigt werden (Vergleich Abschnitt 3.1.).

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 Gewebeproben: Humane Tonsillen- und Milzpräparate

Bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Gewebeproben handelte es sich um frisch entnommene humane Präparate aus 15 Tonsillae palatinae und 9 Milzen. Die demografischen Daten der Operierten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

	Geschlecht	Alter [Jahre]	Indikation der Entnahme
<i>Präparate der Tonsilla palatina</i>			
T1	♀	3	Tonsillitis o.n.A.
T2	♀	26	Tonsillitis o.n.A.
T3	♂	5	Tonsillitis o.n.A.
T4	♀	22	Tonsillitis o.n.A.
T5	♂	46	Tonsillitis o.n.A.
T6	♂	33	Tonsillitis o.n.A.
T7	♂	40	Tonsillitis o.n.A.
T8	♀	34	Tonsillitis o.n.A.
T9	♀	20	Tonsillitis o.n.A.
T10	unbekannt	unbekannt	unbekannt
T11	unbekannt	unbekannt	unbekannt
T12	unbekannt	unbekannt	unbekannt
T13	unbekannt	unbekannt	unbekannt
T14	unbekannt	unbekannt	unbekannt
T15	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<i>Präparate der Milz</i>			
M1	unbekannt	67	Tumor o.n.A.
M2	♀	45	Panzytopenie/Splenomegalie
M3	♀	43	ITP
M4	unbekannt	70	ITP
M5	unbekannt	51	ITP
M6	unbekannt	unbekannt	ITP
M7	unbekannt	20	ITP
M8	♀	16	Zysten o.n.A.
M9	♀	79	metastasierender Darmtumor

Tabelle 1 Gewebeproben Humane Tonsillen- und Milzpräparate: ♂ = männlich; ♀ = weiblich; ohne nähere Angabe (o.n.A.); ITP = Immunthrombozytopenie

Die Präparate M1-M7 für die Etablierungsstudien, jedoch nicht für die mBC-Lokalisationsstudien verwendet, da diese keine ausgeprägten Sekundärfollikel mit zonaler Untergliederung und deutlichem GC aufwiesen. Die Gewebestruktur aus Präparat M1 war sogar aufgehoben; deren spindelförmige Zellkerne lagen weit auseinander. Das Präparat M2 wies lediglich wenige kleine B-Zellakkumulationen um die Gefäße auf. In den fünf Präparaten von Patienten mit

Immunthrombozytopenie (auch idiopathische thrombozytopenische Purpura; ITP) (M3-M7) ließen sich kleine Follikel nachweisen, wobei die GCs meist so stark zurückgebildet waren, dass diese wie Primärfollikel erschienen. In einigen der kleinen Follikel fielen Konglomerate gefärbten Materials auf. In einem der Präparate befand sich bandförmiger Plaque in der roten Pulpa. Amyloidartiger Plaque in den zentralfollikulären Bereichen war bereits in einer Arbeit von Steiniger aufgefallen⁷⁶. (Daten nicht gezeigt.)

In den Präparaten M8 und M9, aus präventiven Splenektomien von Spendern ohne bekannte autoimmunologische Vorerkrankung, ließen sich in jedem der Schnitte mehrere große, meist symmetrische Sekundärfollikel in regelrechter Gewebestruktur aufweisen. Die mBC-Lokalisationsstudien der Milz beziehen sich auf die follikulären und extrafollikulären Bereiche dieser sicher identifizierbaren Sekundärfollikel.

2.2 Verarbeitung der Gewebeproben: Gefrierung und Gefrierschnitte

Die histologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf der Visualisierung fluoreszenzmarkierter Zellen in Gefrierschnitten humaner lymphatischer Gewebe. Die entnommenen frischen Präparate aus Milz und Tonsille wurden während ihres Transports bei 4°C in PBS/0,5% BSA (Herstellung in Abschnitt 2.3) gelagert und anschließend mit einem Skalpell auf etwa 1 cm x 1 cm x 1 cm Gewebeproben zugeschnitten. Nach 5 min Ruhezeit in mit wasserlöslichem Einbettmedium [Tissue-Tek O.C.T. Compound von Sakura Finetek] gefüllten Kassetten [Intermediate Cryomold Kassetten von Sakura Finetek] wurden die luftblasenfrei eingebetteten Präparate in flüssigem Stickstoff für 30 sek gefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Gefrierschnitte wurden für alle immunhistochemischen Färbungen in 8 µm Dicke am Mikrotom [HM560 von Thermo Scientific] zwischen -13°C bis -19°C angefertigt und auf Adhäsions-Objektträger [SuperFrost Plus Slides von Thermo Scientific] gebracht. Die anschließende Lagerung erfolgte nach einer Stunde Trocknungszeit bei Raumtemperatur (RT) unfixiert bei -80°C.

2.3 Puffer-, Block- und Antikörperlösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline; PBS)

PBS wurde vom DRFZ in 10-fach konzentrierter Stammlösung zur Verfügung gestellt und unmittelbar vor der direkten Verwendung als Puffer für die Antikörperinkubationslösungen und den Waschprozess 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Bovines Serum Albumin (BSA)

Zur Herstellung der benötigten Verdünnungslösungen wurde PBS mit BSA-Pulver [SIGMA]

bis zu dessen vollständiger Auflösung mithilfe eines magnetischen Mixers [RH basic von IKA] homogenisiert. Die BSA-Blocklösung enthielt dabei PBS mit 3% BSA. Die Antikörperinkubationslösungen und Transportlösung für frisch entnommene Gewebeproben enthielten PBS mit 0,5% BSA.

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Antikörper aufgelistet. Diese wurden zuvor auf ihre Reaktivität auf Gefrierschnitten der humanen Milzen und Tonsillen aus Tabelle 1 getestet und titriert. Die Fixierung mit Azeton erfolgte für einen Großteil der Primärantikörper nach deren Inkubation, da sich während den Versuchen zur Titrierung ein deutlicheres Fluoreszenzsignal durch diesen Prozess ergeben hatte.

	Konjugat	Isotyp	Clone	Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>					
Anti-IgA	FITC	Mouse IgG1	M24A	1:60 prefix	Chemicon
Anti-IgD	BIO	Mouse IgG2a	IA6-2	1:15 prefix	BD Pharmingen
	PE	Mouse IgG2a	IA6-2	1:40 prefix	BD Pharmingen
	FITC	Mouse IgG2a	IA6-2	1:15 prefix	BD Pharmingen
Anti-IgG	BIO	Mouse IgG1a	G18-145	1:60 prefix	BD Pharmingen
Anti-IgM	Pure	Rabbit	Polyclonal	1:300 postfix	DAKO
Anti- κ	BIO	Mouse IgG1a	G20-193	1:150 prefix	BD Pharmingen
Anti- λ	BIO	Mouse IgG1a	JDC-12	1:150 prefix	BD Pharmingen
Anti-CD3	DIG	Mouse IgG1	UCHT1	1:20 prefix	DRFZ
	PE	Mouse IgG1	UCHT1	1:50 prefix	DRFZ
Anti-CD27	FITC	Mouse IgG1	M-T271	1:15 prefix	BD Pharmingen
	PE	Mouse IgG1	M-T271	1:15 prefix	BD Pharmingen
Anti-CD20	pure	Rabbit	Polyclonal	1:150 postfix	Thermo Scientific
Anti-Ki67	PE-Cy	Mouse IgG1	B65	1:20 prefix	BD Pharmingen
	FITC	Mouse IgG1	MIB-1	1:20 prefix	DAKO
Anti-MAdCAM-1	DIG	Mouse IgG1	314G8	1:50 prefix	Abcam
<i>Sekundärantikörper</i>					
SA	Alexa594			1:200	Vector
	Alexa633			1:200	Invitrogen
Anti-DIG	Alexa647			1:200	DRFZ
Anti-Rabbit	Alexa594	Donkey		1:200	Jackson Immunoresearch
	Alexa647	Donkey		1:200	Jackson Immunoresearch
	FITC	Donkey		1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-FITC	A488			1:250	Life Technologies
Anti-PE	TRITC			1:250	Acris

Tabelle 2 Primär- und Sekundärantikörper: prefix = Einsatz des Primärantikörpers vor der Gewebefixierung mit Azeton; postfix = Einsatz des Primärantikörpers nach der Gewebefixierung mit Azeton; Fluoresceinisothiocyanat (FITC); Biotin (BIO); Digoxigenin (DIG); Phycoerythrin (PE); Phycoerythrin-Cyanin7 (PE-Cy7); Tetramethylrhodamine (TRITC); Streptavidin (SA)

2.4 Protokoll immunhistochemische Färbung

Voraussetzung für die Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen (Vergleich Abschnitt 2.5) für das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) [LSM710 von Carl Zeiss] war die Etablierung eines Protokolls zur standardisierten Durchführung von Oberflächenfärbungen auf Gefrierschnitten. Abschnitt 3.2.1 befasst sich mit Optimierungsversuchen der zeitlich variablen Teilprozesse BSA-Block, Inkubation sowie Waschschrift dieses Färbeprotokolls. Das im Folgenden beschriebene Protokoll enthält die dabei etablierten Zeiten der Arbeitsschritte und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern und freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde der innerhalb weniger Minuten aufgetaute Gefrierschnitt vor der ersten Antikörperinkubation für 5 min mit PBS/BSA3% geblockt. Anschließend erfolgte auf dem weiterhin unfixierten Gewebeschnitt die Inkubation des prefix-Primärantikörper-Puffergemischs für 20 min bei 300rpm auf einem Schwenkschüttler [Titramax 1000 von Heidolph], abgedunkelt bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 20 sek erfolgte die Fixierung des Gewebes für 5 min in -20°C gekühltem Azeton. Die Inkubation und das anschließende Waschen des postfix-Primärantikörper-Puffergemischs sowie des darauf folgenden Sekundärantikörper-Puffergemischs erfolgten analog.

Zur Einbettung wurde ein Tropfen des Einbettmediums mit enthaltenem 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) [Mounting Medium with DAPI von Dako] verwendet und der eingedeckelte Objektträger vor seiner konfokalmikroskopischen Auswertung über Nacht abgedunkelt bei -4°C gelagert.

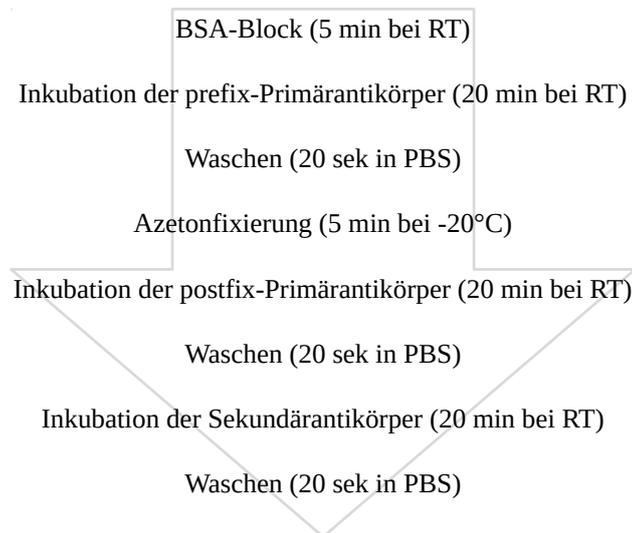


Abbildung 2 Protokoll immunhistochemische Färbung Schematische Übersicht über die Teilprozesse des angewandten Färbeprotokolls

2.5 Multifluoreszenzfärbungen für das konfokale LSM unter Benutzung von Haptensystemen

Die erforderliche Information für die mBC-Lokalisierung sollte innerhalb des einzelnen Gewebeschnittes mithilfe differenzierbarer Fluoreszenzkanäle am LSM ermöglicht werden. Anhand der Definition der mBC als $Ki67^-CD20^+CD27^+$ Zelle (Vergleich Abschnitt 3.1) wurden vier Kanäle im LSM zur Identifikation der mBC benötigt. Mit einem fünften Kanal sollten die identifizierten mBCs beziehungsweise deren Umgebungszellen weiter charakterisiert werden. Die Etablierung der hierzu benötigten immunhistochemischen Färbungen basiert auf Antikörperkombinationen aus verschiedenen, jedoch auch derselben Tierspezies unter Benutzung von Haptensystemen und ist in Abbildung 3 mit den entsprechenden Anregungs- und Emissionsbereichen der verwendeten Sekundärantikörper am LSM dargestellt.

Als Hapten wird ein kleines Molekül bezeichnet, welches ohne Kopplung an ein Trägerprotein aufgrund seiner Größe nicht immunogen ist. Es kann jedoch als antigene Determinante durch den entsprechenden anti-Hapten-Antikörper erkannt werden. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Haptene waren Biotin (BIO), Digoxigenin (DIG) und das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Die Spezifität der Antikörper bleibt nach der Konjugation mit einem Hapten erhalten und kann anschließend durch das Signal des Fluorochromgekoppelten Haptenspezifischen Antikörpers detektiert werden. Das Risiko des Auftretens von Kreuzreaktionen, das mit der Verwendung mehrerer speziesspezifischer Antikörper in Verbindung steht, wurde auf diese Weise limitiert. Parallel dazu wurden PE-gekoppelte Antikörper verwendet. Gegen den schnellen Photobleachingeffekt wurde das PE-Signal durch das stabilere Tetramethylrhodamin (TRITC) verstärkt, welches an einen PE-spezifischen Sekundärantikörper gekoppelt war.

Der hier vorgestellte und gewählte methodische Zugang erlaubt eine innovative Charakterisierung des humanen B-Zellgedächtnisses ‚in situ‘ durch die Überwindung der bisherigen Limitierungen in konventionellen Untersuchungen mittels Paraffintechnik oder der Verwendung speziesspezifischer Antikörper auf Gefrierschnitten (Vergleich Abschnitt 4.1).

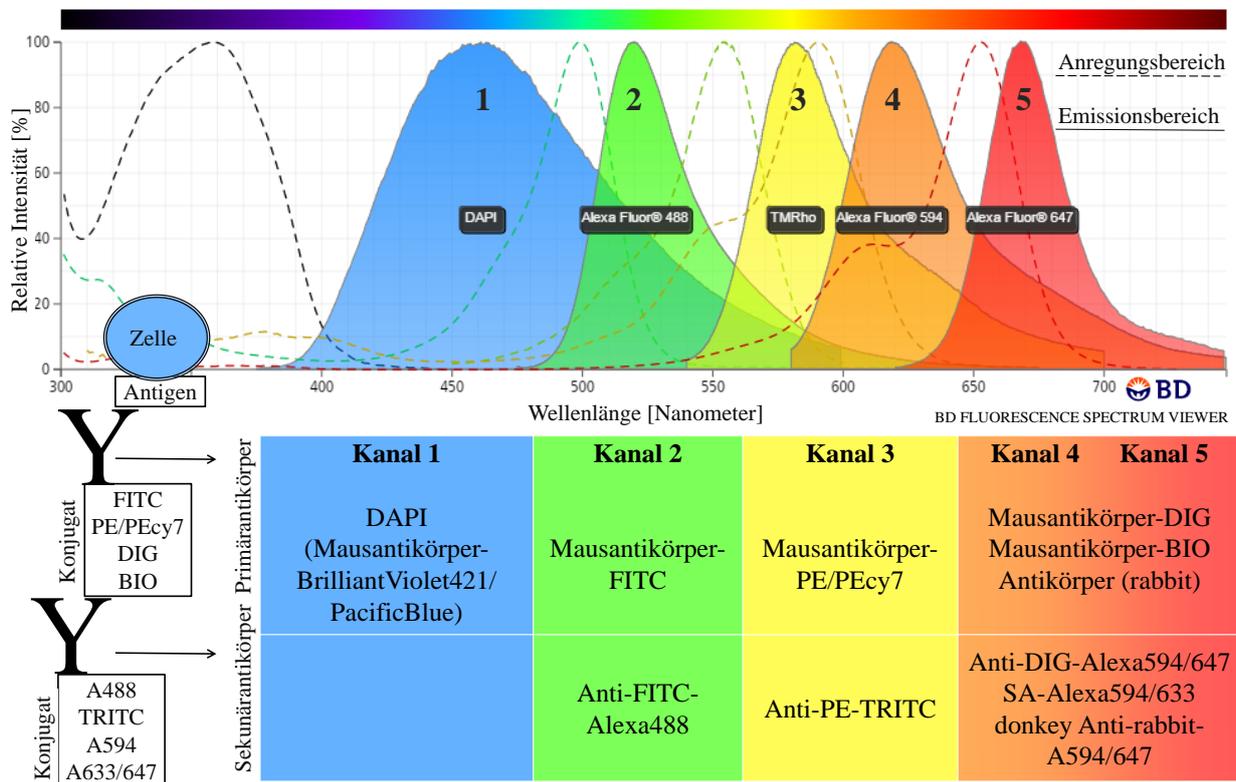


Abbildung 3 Belegung der verwendeten fünf LSM-Kanäle (Schema)

Die Anregungs- und Emissionsbereiche der gewählten fünf LSM-Kanäle für die verwendeten Sekundärantikörper und DAPI (erstellt mithilfe des ‚fluorescence spectrum viewer‘ von BD Pharmingen⁷⁷) sind zur Veranschaulichung der voneinander getrennt detektierbaren Fluoreszenzinformationen dargestellt. Neben der Verwendung von DAPI zur Markierung von Desoxyribonukleinsäure und somit der Zellkerne, kann in Kanal 1 der Einsatz eines weiteren Mausantikörpers erfolgen, sodass die Möglichkeit der Färbung mit fünf Antikörpern aus der gleichen Tierspezies besteht.

2.6 Die Generierung des Bildes mittels konfokalem LSM und die Auswertung mittels ‚ZEN 2012 lite blue edition‘ Software

Die Anregung und Detektion der auf dem Gewebeschnitt gebundenen Sekundärantikörperkonjugate und DAPI erfolgte mittels konfokalem LSM über die entsprechende Software ‚ZEN system 2010‘ [Carl Zeiss]. Die Funktionsweise des LSM710 ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Seine Bezeichnung als „Laser-Scanning“ erhält dieses Mikroskop durch die zeilenweise Fokussierung des Laserstrahls des hierfür manuell definierten Feldes auf der Gewebeprobe und die anschließende pixelweise Detektion der von diesem angeregten Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung über den Photomultiplier (PTM). Die dadurch als elektrisches Signal vorliegende Objektinformation wird als digitalisierte Bilddatei für den Bildschirm generiert. Neben dieser unterschiedlichen Transformation vom Objekt zum Bild stellt die Anordnung der konfokalen Blende (Pinhole) in der Zwischenbildebene einen weiteren entscheidenden Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie dar. Licht aus Ebenen über oder unter der

Fokusebene wird auf diese Weise weitestgehend ausgeblendet und trägt dadurch nicht zur Bildentstehung bei, sodass Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander, das heißt konfokal, abgebildet werden und daher in der Bezeichnung als konfokales LSM als Besonderheit widerspiegelt wird.

Mithilfe der ‚ZEN system 2010‘ Software konnten die Messungen manuell variiert werden. Das Multi-Channel-Bildaufnahmemodul ermöglichte Bilder mit der separaten Information mehrerer Kanäle zu erstellen. Jedem Kanal wurde dabei der Bereich der Fluoreszenzanregungswellenlänge sowie der Detektionswellenlänge individuell zugewiesen. Eine entscheidende Limitation liegt hier in den sich überschneidenden Anregungs- und Emissionsbereichen der fluoreszierenden Konjugate (Vergleich Abbildung 3). Abschnitt 3.2.2 zeigt daher eine Kontrolle der manuell gewählten Detektionsbereiche für die verwendeten fünf Kanäle.

Neben diesen Einstellungen wurden für die Untersuchungen ebenfalls die ‚Laserpower‘ sowie ‚Offset‘ und ‚Gain‘ angepasst. Mit Erhöhung der Laserpower, erhöht sich die Emission, jedoch auch das sogenannte Photobleaching. ‚Offset‘ dient der Einstellung im Kontrast und ‚Gain‘ der Helligkeit, wobei die Reduzierung das Rauschen im Hintergrund minimiert.

Die Analyse, Bearbeitung und Interpretation der aufgenommenen Bilder erfolgte mithilfe der Tools der ‚ZEN 2012 lite blue edition‘ Software [Carl Zeiss]. Diese ermöglicht eine nachträgliche Optimierung von Helligkeit und Kontrast in den einzelnen Kanälen sowie die individuelle Überlagerung dieser. Letztere Option ermöglichte die gezielte Untersuchung der Eigenschaften der einzelnen Zellen unterschiedlicher Areale auf dem Gefrierschnitt.

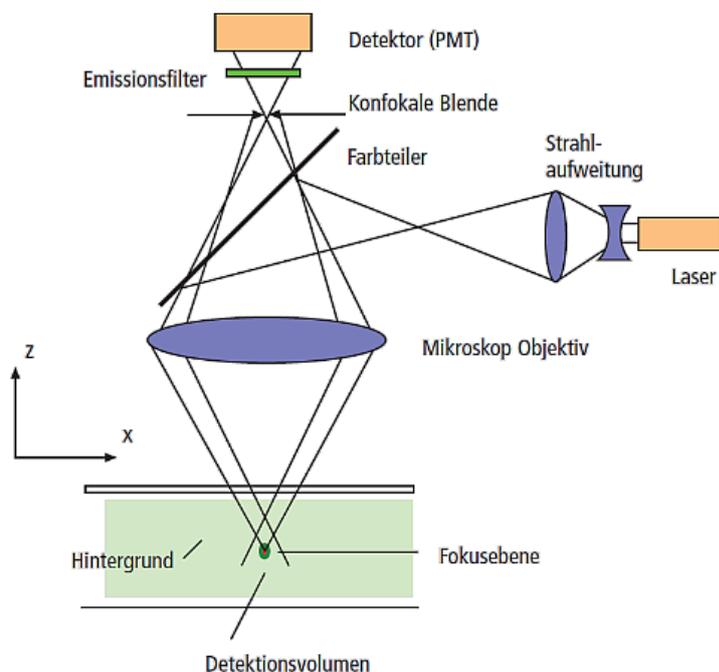


Abbildung 4 Strahlengang im konfokalen LSM710 (Schemazeichnung aus Mikroskopie von Carl Zeiss⁷⁸) Der Laserstrahl wird über das Objektiv auf die Probe fokussiert, wodurch die hierauf gebundenen Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt werden. Wiederum über das Objektiv wird anschließend diese Fluoreszenzstrahlung gebündelt und über den Farsteiler effizient zum detektierenden Photomultiplier (PMT) weitergeleitet, wobei durch die manuelle Wahl der Filter und Farsteiler das Signal-Rausch-Verhältnis des Bildes beeinflusst wird. Im Emissionsfilter wird der manuell gewählte Wellenlängenbereich selektiert und die zur Anregung verwendete Laserlinie abgeblockt. Vor dem Detektor befindet sich die konfokale Blende (Pinhole). Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene trifft defokussiert auf die Blende und trägt nicht zur Bildentstehung bei.

3 ERGEBNISSE

Die organspezifischen Nischen der mBCs in den humanen lymphatischen Geweben sowie das Wissen um deren potentielle Eigenschaften für das Überleben und die Reifung dieser Zellen sind weder für die gesunden Verhältnisse noch für die Autoimmunität hinreichend aufgeklärt. Mit dem Ziel des direkten Nachweises von mBCs im Kontext des Mikroenviroment, um deren gewebebedingte Organisation zu charakterisieren, gliedert sich die vorliegende Arbeit in die Etablierung der hierzu benötigten immunhistochemischen Multifluoreszenzfärbungen für das konfokale LSM (Abschnitt 3.2 -ETABLIERUNG UND VALIDIERUNG-) und in die darauf folgende Anwendung auf Gefrierschnitten humaner Milzen (Abschnitt 3.3 -ANWENDUNG 1-) und humaner Tonsillae palatinae (Abschnitt 3.4 -ANWENDUNG 2-).

3.1 Definition der mBC als langlebige ruhende, antigenerfahrene B-Zelle

Die mBC ist eine in der Regel nach Erstkontakt mit einem Pathogen gebildete Untergruppe der B-Zellen. Diese mBCs können bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und effizientere Sekundärantwort vermitteln. Außerhalb einer spezifischen Immunaktivierung sind es größtenteils ruhende Zellen. Für die Lokalisationsstudien in der vorliegenden Arbeit wurden mBCs als Ki67⁻ ruhende CD20⁺ B-Zellen definiert, die zudem das CD27 Antigen als bekannten mBC-Marker exprimieren (Vergleich Abschnitt 1.3). Die erforderlichen Informationen für eine zuverlässige mBC-Lokalisierung sollten dabei innerhalb des einzelnen Gewebeschnittes mithilfe differenzierbarer Fluoreszenzkanäle am LSM ermöglicht werden. Anhand dieser Definition wurden vier Kanäle im LSM zur Identifikation der mBC benötigt: 1) DAPI zur Identifikation als Zelle, 2) CD20 als B-Zellspezifisches Oberflächenantigen, 3) das nukleare Ki67 als Ausschlussmarker proliferierender Zellen und 4) CD27. Mit einem fünften Kanal 5) sollten sich die identifizierten mBCs beziehungsweise deren Umgebungszellen weiter charakterisieren lassen.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Detektion der Signale zur Lokalisierung einer definitionsgemäß gefärbten mBC. Im Charakterisierungskanal ist in diesem Beispiel tonsillärer mBCs das B-Zellspezifische Ig durch die Färbung der leichten Ketten mittels Anti- κ/λ -Antikörpern zur morphologischen Abgrenzung der hier beschriebenen CD27⁺Ki67⁻ und schwach CD20 exprimierenden PCs¹⁰ dargestellt. Letztere zeigen sich durch eine intrazelluläre Präsenz von Igs.

Diese insgesamt fünf Kanäle und das dafür angewandte Haptensystem wurden in Abbildung 3 (Abschnitt 2.5) erläutert. Der folgende Abschnitt 3.2 befasst sich mit der hierzu benötigten Etablierung und Validierung immunhistochemischer Färbungen auf Gefrierschnitten für das LSM.

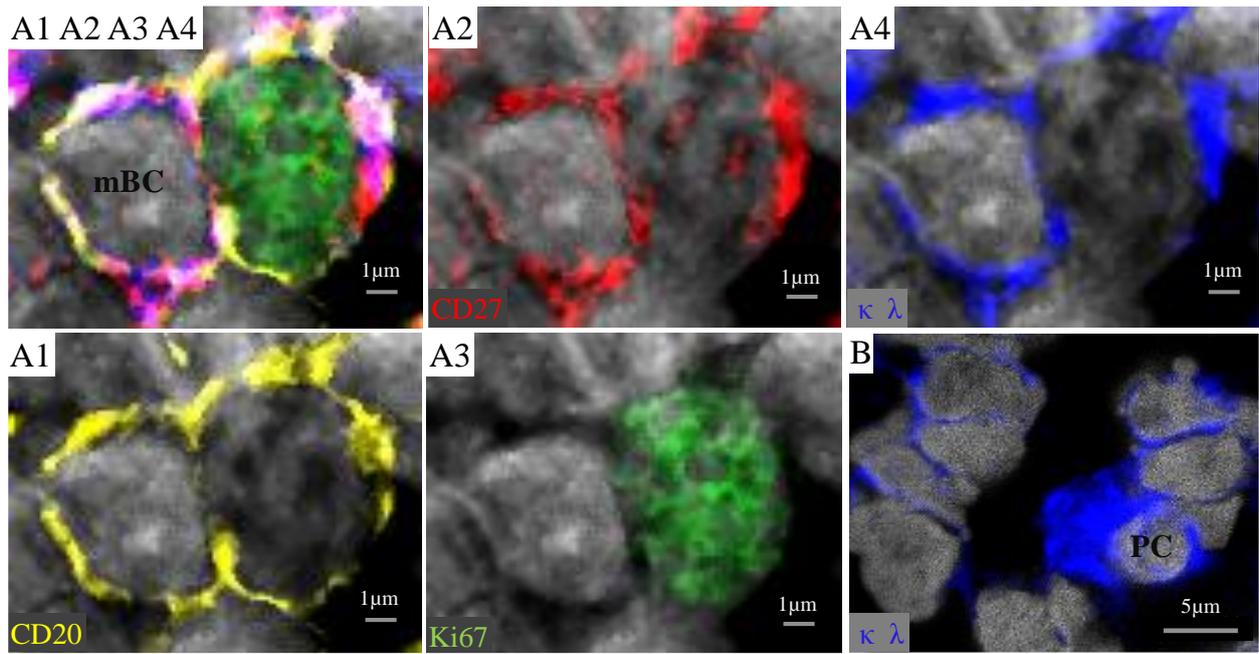


Abbildung 5 Definition der mBC als $Ki67^-$ ruhende, $CD27^+$ antigenerfahrene, $CD20^+$ B-Zelle
A: LSM-Aufnahme mit 63x Objektiv; Tonsilla palatina human. Anschnitt von zwei $CD20^+$ B-Zellen (A1 gelb), die beide das mBC-Markerantigen $CD27$ (A2 rot) exprimieren, wobei die proliferierende $Ki67^+$ Zelle (A3 grün) ausgeschlossen wird. In der DAPI Färbung (grau) ist die teilungsaktive Zelle ebenfalls am größeren Zellkern zu erkennen. Im Charakterisierungskanal ist die Oberflächenexpression von κ/λ (A4 blau) auf beiden Zellen sichtbar.
B: LSM-Aufnahme mit 63x Objektiv; Tonsilla palatina human. Die Morphologie der PC hebt sich durch die deutlich abgrenzbare intrazelluläre Anreicherung von Igs (κ/λ^+ blau) von den nebenliegenden Zellen mit κ/λ -Oberflächenexpression ab.

3.2 Immunhistochemische Multifluoreszenzfärbungen für das LSM unter Benutzung von Haptensystemen

Eine Voraussetzung für die systematische Untersuchung der mBC-Lokalisationen und ihrer Umgebungszellen mittels immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen für das LSM war ein Protokoll zur standardisierten Durchführung von Oberflächenfärbungen an Gefrierschnitten. Die Qualität der damit erzeugten Bilder wird fundamental durch die Gewebebeschaffenheit, Spezifität der Antikörperbindung sowie die Wahl der Fluorochrome und die LSM-Einstellungen beziehungsweise der maximal möglichen Auflösung bestimmt. Daher war eine sorgfältige Etablierung des Färbeprotokolls für alle fortführenden Experimente eine essentielle Voraussetzung.

3.2.1 Optimierung des Versuchsablaufes

Für das Protokoll zur standardisierten Durchführung von Oberflächenfärbungen an Gefrierschnitten wurden die zeitlich variablen Prozesse Inkubation, Waschen und BSA-Block untersucht. Dies diente, neben der Verkürzung der Analysezeit, der Vermeidung unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen nach Einstellung des Gleichgewichts durch zu lange Inkubation, sowie Gewebeverlusten durch zu langes Waschen des unfixierten Gefrierschnitts. Die Fixierung mit Azeton erfolgte für einen Großteil der Primärantikörper nach deren Inkubation, da sich während der Versuche zur Titrierung ein deutlicheres Signal gezeigt hatte. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 (Abschnitt 2.3) zusammengefasst.

In mehreren Versuchsreihen wurde je eine der gewählten Variablen des Protokolls verändert und die Qualität der mittels LSM aufgenommenen Bilder bewertet. Im Fokus dieses Qualitätsvergleichs standen die Fluoreszenzintensität, das Signalrauschen und die mögliche Beeinflussung im Bindungsmuster durch eine Interaktion im Primärantikörpergemisch. Für die Aufnahmen wurden konstante Einstellungen am LSM für ‚Laserpower‘, ‚Pinhole‘, ‚Gain‘ und ‚Offset‘ sowie die analoge Bildbearbeitung mit der ‚ZEN 2012 lite blue edition‘ Software verwendet.

Die Abbildung 6 stellt schematisch den Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbung des etablierten Protokolls und daneben vergleichend die maximal getesteten Zeiten der gewählten Teilprozesse mit einem Qualitätsvergleich im LSM dar. Es konnten keine Signallimitierungen und von der Schmitzebene unabhängigen Veränderungen im Bindungsmuster für die etablierten Prozesszeiten des Protokolls festgestellt werden.

A

Protokoll immunhistologische Färbung	Protokoll mit etablierten Prozesszeiten <u>1</u>	Protokolle der maximal getesteten Zeit der Prozesse		
		Inkubation	BSA-Block	Waschen
		<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
BSA-Block	5 min	5 min	25 min	5 min
Inkubation PrimärAK	20 min	40 min	20 min	20 min
Waschen	20 sek	20 sek	20 sek	5 min
Azetonfixierung				
Inkubation PrimärAK	20 min	40 min	20 min	20 min
Waschen	20 sek	20 sek	20 sek	5 min
Inkubation SekundärAK	20 min	40 min	20 min	20 min
Waschen	20 sek	20 sek	20 sek	5 min

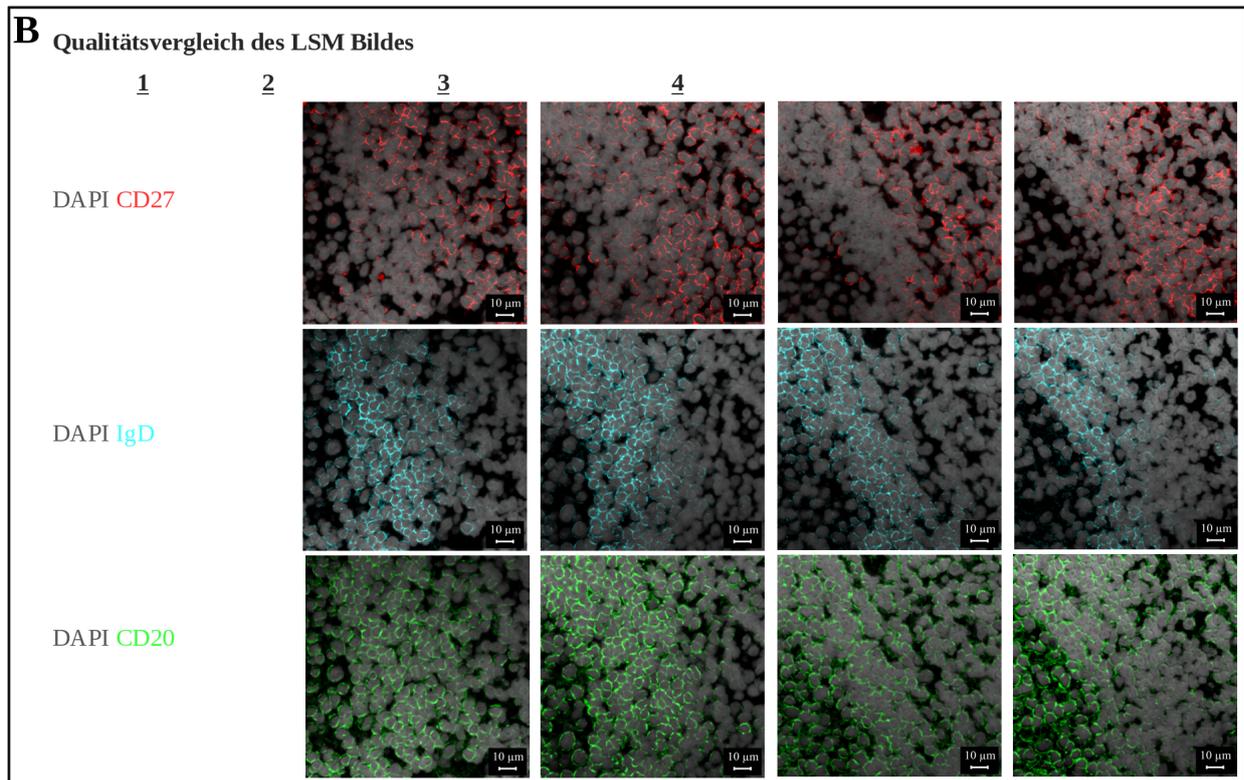


Abbildung 6 Optimierung der Versuchsbedingungen

A: Dargestellt ist ein schematischer Überblick des Protokolls der immunhistochemischen Färbung (Pfeil; AK = Antikörper) mit den untersuchten und anschließend etablierten Prozesszeiten (1) sowie als exemplarischer Vergleich die hierfür jeweils maximal getestete Zeit für Inkubation (2), BSA-Block (3) und Waschprozess (4).

B: LSM-Aufnahmen mit 63x Objektiv; Tonsilla palatina human; konstante LSM-Einstellungen für ‚Laserpower‘, ‚Pinhole‘, ‚Gain‘, ‚Offset‘; analoge Bildbearbeitung mit ‚ZEN 2012 lite blue edition‘.

Im Qualitätsvergleich der Protokolle aus A anhand der mittels LSM erzeugten Bilder ließen sich keine sichtbare Minderung der Fluoreszenzintensität durch kürzere Inkubationszeiten, kein verstärktes Signalaussehen durch zu kurzes Waschen sowie zu kurzen BSA-Block feststellen. Die Varianzen im Bindungsmuster erklären sich durch die Verwendung nicht serieller Schnitte und einer daraus resultierenden größeren Variabilität der Zellzusammensetzung auf dem Schnitt.

3.2.2 Kontrolle des Bindungsverhaltens der Primärantikörper, der Sekundärantikörperspezifität und der manuellen LSM Einstellungen

Die erforderliche Information für die zuverlässige mBC-Lokalisierung sollte innerhalb des einzelnen Gewebeschnittes mithilfe differenzierbarer Fluoreszenzkanäle am LSM gewonnen werden. Die hierzu benötigten immunhistochemischen Färbungen basieren auf einem hierfür eigens etabliertem Färbeprotokoll unter Benutzung von Antikörperkombinationen einer Tierspezies unter Benutzung des Haptensystems (Vergleich Abschnitt 2.5). Das Risiko des Auftretens von Kreuzreaktionen, das sonst mit der Verwendung mehrerer speziesspezifischer Antikörper in Verbindung steht, wird auf diese Weise umgangen.

Für zuverlässige mBC-Lokalisationsstudien ist sicherzustellen, dass die im LSM detektierte Fluoreszenz der Sekundärantikörper durch eine spezifische Bindung an ihren Primärantikörper zustande kommt. Des Weiteren sind Einstrahlungseffekte aus anderen Kanälen sowie Wechselwirkungen im Gemisch der Primärantikörper oder der Einfluss einer möglichen Autofluoreszenz des Gewebeschnittes auszuschließen. Hierfür wurden serielle Schnitte angefertigt und das optimierte Färbeprotokoll in vollständiger und unvollständiger Primärantikörperkombination getestet (Abbildung 7 ‚Inkubierte Primärantikörper‘). Es wurden für alle Aufnahmen auf konstante LSM Einstellungen für ‚Laserpower‘, ‚Pinhole‘, ‚Gain‘ und ‚Offset‘ sowie die analoge Bildbearbeitung mit der ‚ZEN 2012 lite blue edition‘ Software geachtet.

Die Abbildung 7 belegt an sechs aufeinanderfolgenden Schnitten, dass der jeweilige Sekundärantikörper nicht unspezifisch in Abwesenheit eines Primärantikörpers bindet. An dieser Stelle wurde folglich kein Signal nachgewiesen. Somit war von einem spezifischen Bindungsverhalten der Sekundärantikörper im gewählten Setting auszugehen. Die fehlende Markierung durch den Sekundärantikörper diente gleichzeitig der Kontrolle der korrekten Einstellung von Laserstärke und Detektionswellenlängenbereich, da keine Signale durch die benachbarten Emissionsbereiche erzeugt wurden.

Das Bindungsmuster der Antikörper blieb, bis auf Veränderungen der Zellkomposition aufgrund der unterschiedlichen Schnittebenen, über die Schnitte hinweg erhalten. Dies schloss eine gegenseitige Beeinflussung im Bindungsverhalten der Primärantikörper weitgehend aus. Im Ergebnis konnten Färbekombinationen für die geplante Gewebeuntersuchung als zuverlässig und spezifisch etabliert werden.

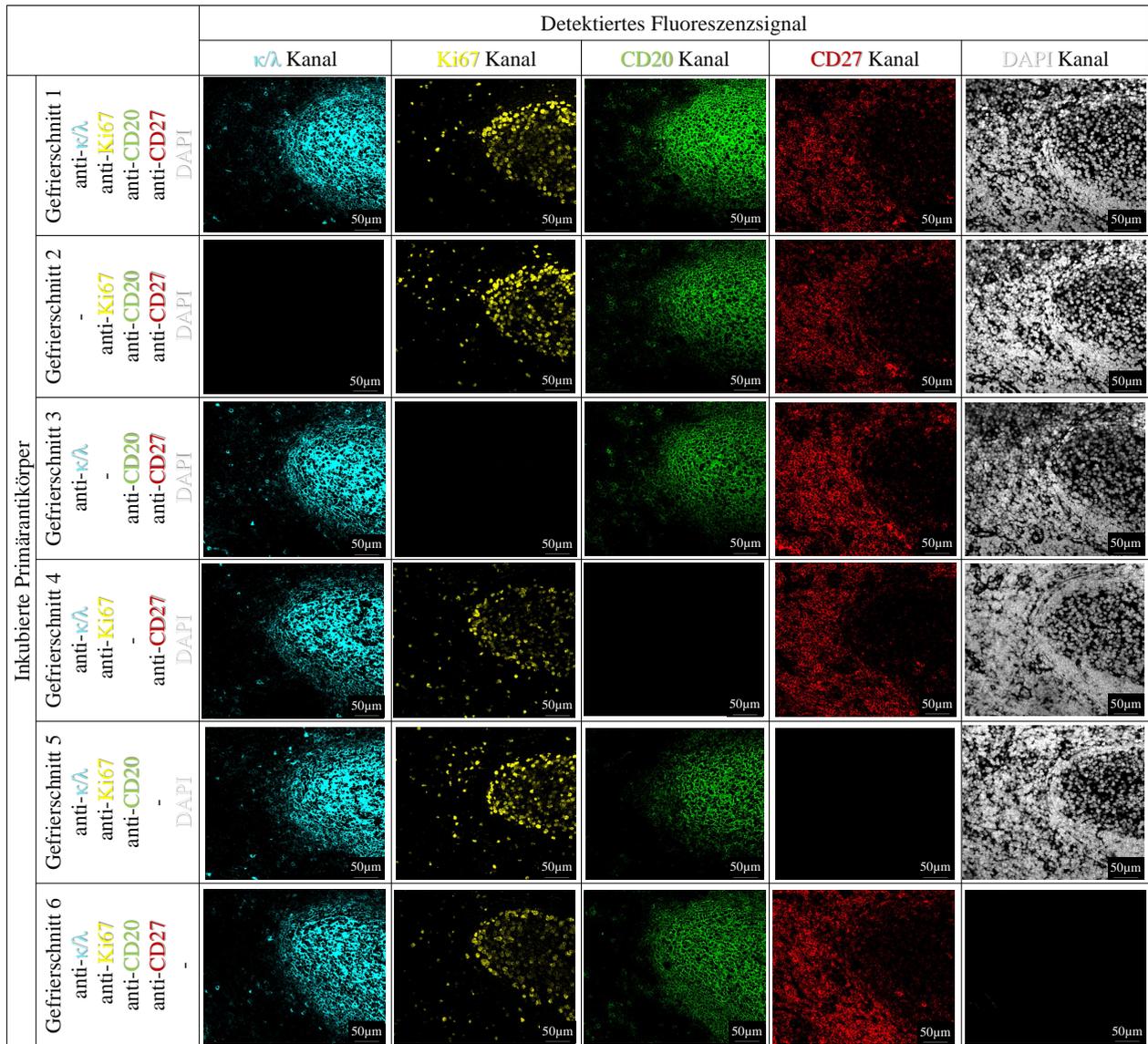


Abbildung 7 Validation der Antikörperbindung

LSM-Aufnahmen mit 20x Objektiv; sechs serielle Gefrierschnitte Tonsilla palatina human; konstante LSM Einstellungen für ‚Laserpower‘, ‚Pinhole‘, ‚Gain‘, ‚Offset‘; analoge Bildbearbeitung mit ‚ZEN 2012 lite blue edition‘.

Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale im LSM nach Inkubation der Gefrierschnitte mit vollständiger (Gefrierschnitt 1) und unvollständiger (Gefrierschnitt 2, 3, 4, 5) Primärantikörperkombination und ohne DAPI (Gefrierschnitt 6). Nach anschließender Inkubation aller Sekundärantikörper auf allen Gefrierschnitten 1 bis 6 ist in den aufeinanderfolgenden Schnitten im Kanal des fehlenden Primärantikörpers kein Signal des entsprechenden Sekundärantikörpers detektierbar (Feld bleibt schwarz). Der Sekundärantikörper bindet demzufolge nicht unspezifisch in Abwesenheit des Primärantikörpers. Das Bindungsmuster bleibt in Unabhängigkeit der inkubierten Primärantikörper von Gefrierschnitt 1 bis 6 erhalten. Es ergeben sich somit keine Hinweise für eine Interaktion der Primärantikörper.

3.3 Anwendung der Methode auf Gefrierschnitten humaner Milzen

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung immunhistochemischer Färbungen für Lokalisationsstudien der mBC-Verteilung in humanen lymphatischen Geweben. Hierfür wurden Gewebeprobe von humanen Milzen und Tonsillae palatinae untersucht und miteinander verglichen. Diese SLOs boten sich als vergleichbare Strukturen besonders an, da in beiden Geweben Follikel als Strukturen der mBC-Induktion zu erwarten waren, wobei bereits Beschreibungen über die humane MZ als milzspezifisches mBC-Kompartiment existieren (Vergleich Abschnitt 1.4.3). Der Nachweis dieser MZ diente der Methodenverifizierung zur korrekten mBC-Lokalisation. Die Bindungsmuster der in den folgenden Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen dabei eine Übereinstimmung zu den in der Einleitung vorgestellten Studien, sodass die Anwendung der hier beschriebenen Methode weiterführend in der Milz sowie nachfolgend in der Tonsille zuverlässig benutzt wurde.

3.3.1 Die allgemeine Morphologie der humanen weißen Milzpulpa

Die humane Milz ist, bezogen auf ihre Follikelstruktur, für die starke individuelle Variabilität bekannt, wobei in der Mehrzahl der Präparate keine voll ausgeprägten Sekundärfollikel mit der sogenannten ‚dark‘ und ‚light‘ Zone zu erwarten sind.¹ Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von neun Milzgewebeprobe Gefrierschnitte angefertigt und untersucht (Tabelle 1, Abschnitt 2.1), wobei sich die folgenden Auswertungen auf die aufgefundenen Sekundärfollikel beschränken. Primärfollikel wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da sich die Interpretation der verschiedenen Schnittebenen als schwierig erwies (Abbildung 8/B. Durch einen einzelnen Gewebeschnitt wird die räumliche Struktur des Präparats nicht erfasst, sodass sich der Schnitt durch den FM eines Sekundärfollikels folglich wie ein primärer Follikel präsentieren kann. Involutierte kleine Follikel, sowie Follikel mit Ablagerungen wurden bei der histologischen Auswertung im Folgenden ebenfalls nicht mit einbezogen.

Die Abbildung 8 zeigt die typische strukturelle Abgrenzung von weißer Pulpa mit B- und T-Zellzone zur roten Pulpa. Bereits über die Zellkernanordnung ließ sich der strukturelle Aufbau eines Sekundärfollikels erkennen (Abbildung 8/A1). Das GC zeigt sich mit ungleichmäßig verteilten, unterschiedlich großen Zellkernen und wenigen Kernfragmenten. Der das GC umgebende FM präsentiert sich als ringförmige Struktur kleinerer dicht gepackter Zellkerne. Die zwischen FM und roter Pulpa liegende MZ hebt sich als geordneter Zellverband ab.

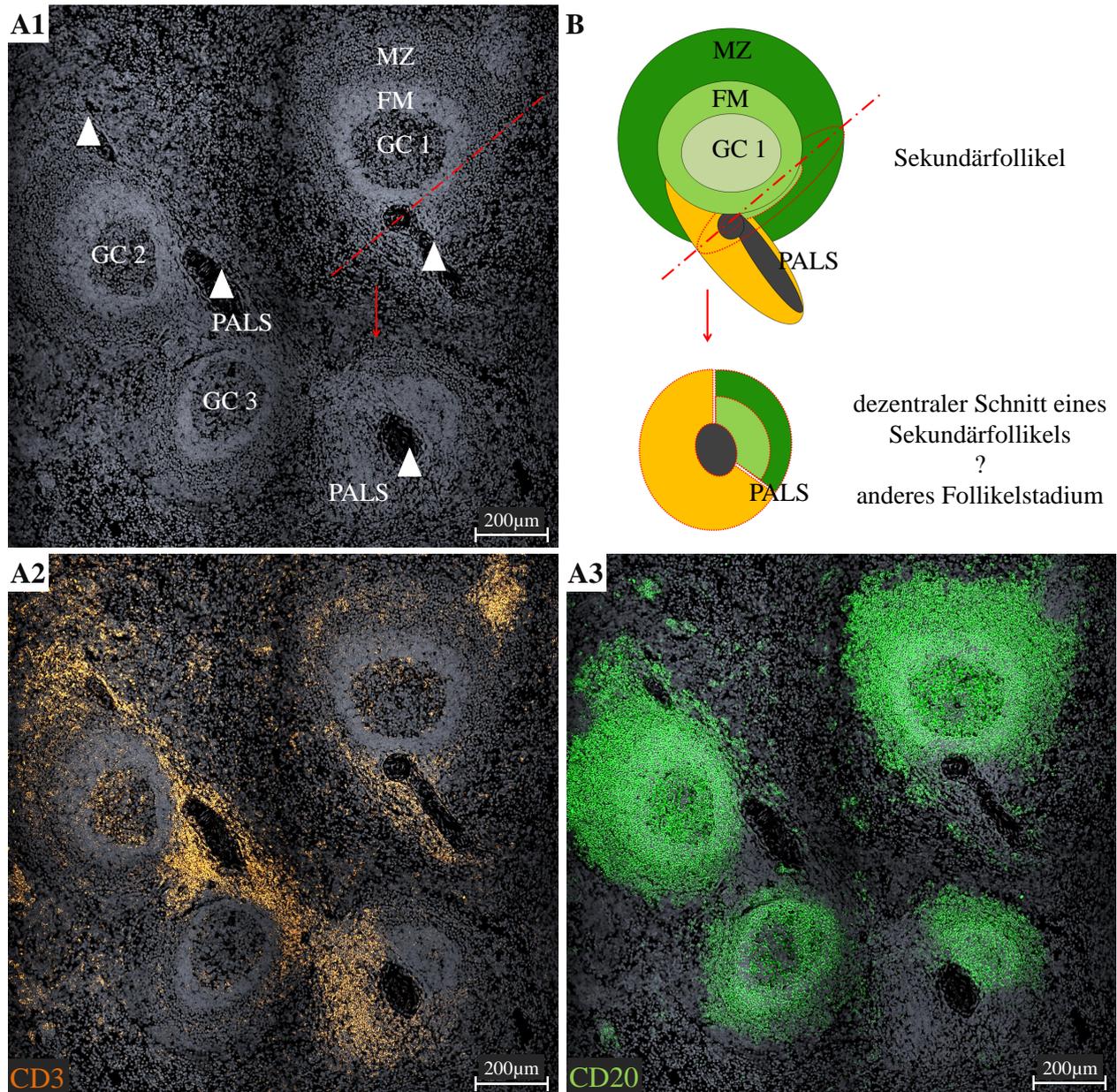


Abbildung 8 Allgemeine Morphologie der humanen weißen Milzpulpa

LSM-Aufnahme mit 10x Objektiv; Milz human.

A1: Die weißen Pfeilspitzen weisen auf Quer- und Längsanschnitte von Zentralarterien, um die sich die weiße Pulpa bildet. Eine strukturelle Unterteilung der Sekundärfollikel kann anhand der Zellkernfärbung mit DAPI (grau) erfolgen: GC mit ungleichmäßig verteilten, unterschiedlich großen Zellkernen und Kernfragmenten; FM als GC umgebender Ring kleinerer dicht gepackter Zellkerne; MZ als geordneter Zellverband zwischen FM und roter Pulpa.

A2: Überlagerung der Signale für DAPI und CD3⁺ T-Zellen (orange), welche sich um die zentralarteriellen Gefäße in Form der PALS lagern, sowie als einzelne Zellen innerhalb des GC mit Zunahme in Richtung FM und in den zentralen Bereichen der MZ zu beobachten sind.

A3: Überlagerung der Signale für DAPI und CD20⁺ B-Zellen (grün), welche als dominierende Zellpopulation der Sekundärfollikel zu beobachten sind.

B: Schematische Darstellung zur Interpretationsschwierigkeit der einzelnen Schnittebenen: bei der B-Zellanhäufung ohne sichtbares GC kann es sich sowohl um die dezentrale Schnittebene eines Sekundärfollikels (rot eingefügte Strichpunktlinie als Schnittvariante) als auch um ein anderes Follikelstadium handeln.

Diese großen Sekundärfollikel standen stets in Verbindung mit einem oder mehreren zentralarteriellen Gefäßen mit variablem Muster in der Anordnung. Gefäßanschnitte konnten in allen Zonen der Sekundärfollikel gefunden werden und schienen diese teilweise zu durchlaufen (Vergleich Abbildung 8, 9 und 15). CD20 als B-Zellspezifisches Oberflächenantigen wurde erwartungsgemäß auf fast allen Zellen der Sekundärfollikel exprimiert (Abbildung 8/A3). CD3 als T-Zellspezifisches Oberflächenantigen fand sich ebenfalls erwartungsgemäß als PALS um zentralarterielle Gefäße (Abbildung 8/A2). Diese PALS erschien dabei in beiden Präparaten in unregelmäßiger Ausprägung. Abschnittsweise stellte sie sich als größeres T-Zell Cluster dar oder fehlte im Verlauf als zentralarterielle Ummantelung. Innerhalb des Follikels fanden sich T-Zellen ebenfalls im GC und der MZ, die in Abschnitt 3.3.2 genauer beschrieben werden. Diese bereits an seriellen Paraffinschnitten beschriebenen strukturellen Eigenschaften konnten mithilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode bestätigt werden und stellen einen entscheidenden Unterschied zu den Untersuchungen präklinischer Milzpräparate, vor allem aus Nagetierspezies, dar (Vergleich Abschnitt 1.4 und 4.3).

3.3.2 Lokalisation von mBCs im MZ-Kompartiment der weißen Milzpulpa

Für die Lokalisationsstudien in der vorliegenden Arbeit wurden mBCs definiert als Ki67⁻ CD20⁺ Zellen, die zudem das CD27 Antigen exprimieren (Vergleich Abschnitt 3.1). In der humanen Milz wurden mBCs als Ansammlung in Form der MZ beschrieben. Bisher wurde dies nicht im direkten Nachweis aller zur Identifikation notwendigen Eigenschaften innerhalb eines Schnittes gezeigt, weshalb die nachfolgenden Daten in dieser Form eine Erstbeschreibung sind. Die mit der etablierten Methode nachgewiesene Verteilung der Expression der einzelnen mBC-Marker auf dem Gefrierschnitt ist in Abbildung 9 dargestellt.

Ki67 Expression

(Abbildung 9/B1 und C1)

Der Anteil auszuschließender proliferierender Ki67⁺ Zellen beschränkte sich vornehmlich auf das GC. Die homogene Verteilung ließ meist keine Unterteilung in die sogenannte ‚dark‘ und ‚light‘ Zone vornehmen. Daneben stellten sich GCs mit wenigen proliferierenden Zellen dar. In diesen konnte eine erhöhte Immunkomplexbildung beobachtet werden, was nicht ausschließt, dass es sich hierbei um Schnitte durch die ‚light‘ Zone eines Sekundärfollikels handelte. (Daten nicht gezeigt.) Im FM und der MZ sowie in der PALS waren in allen identifizierbaren Sekundärfollikeln keine oder nur vereinzelte teilungsaktive Zellen auffindbar. Neben den GCs ließen sich keine weiteren Bereiche in der weißen Pulpa mit erhöhter Proliferationsrate darstellen.

CD20 Expression

(Abbildung 9/B4 und C4)

Das GC, der FM und die MZ der Sekundärfollikel wurden erwartungsgemäß dominiert durch CD20⁺ B-Zellen. In der Gesamtheit des Follikels nahm die Signalintensität für CD20 in Richtung roter Pulpa ab, sodass die MZ dunkler als das GC und der FM erschien. Ein

Zusammenhang der abnehmenden Zelldichte oder eine Reaktion des Anti-CD20-Antikörpers mit residenten FDCs, ist nicht vollkommen auszuschließen.

Innerhalb der, die PALS bildenden, CD3⁺ T-Zellcluster konnten keine oder nur vereinzelte CD20⁺ B-Zellen detektiert werden. Jedoch, wie in Abbildung 3e markiert, fielen die ein bis wenige Zellen breite CD20⁺ B-Zell Ausläufer der Follikel auf, die teilweise die gesamte PALS umgaben. Am Grenzbereich zwischen PALS und Zentralarterie fiel ebenfalls stellenweise ein dünner Saum aus CD20⁺ B-Zellen auf.

CD27 Expression

(Abbildung 9/B2 und C2)

Die Expression von CD27 stellte sich in den follikulären und nichtfollikulären Bereichen in unterschiedlicher Signalintensität dar. In Abbildung 9 ist ersichtlich, dass das stärkere Signal auf CD27⁺CD3⁺ T-Zellen und das schwächere Signal auf CD27⁺CD20⁺ B-Zellen detektiert werden konnte. Die PALS, als CD3⁺ T-Zellkompartiment, hob sich hierbei durch die Signalintensität von den follikulären CD27⁺ Bereichen ab.

Innerhalb der CD20⁺ B-Zellakkumulationen differenzierte sich die MZ als CD27⁺ äußerer Mantel um das signalärmere Gebiet von GC und FM. In der MZ erscheinen CD3⁺ T-Zellen in den zentralen Bereichen ebenfalls durch ein stärkeres CD27 Signal. Die T-Zellen bildeten hier teilweise ein durchgängiges Band (Vergleich Abbildung 9/B3), durch das die MZ in einen bereits von Steiniger¹ beschriebenen, zum GC gerichteten, inneren und einen, zur roten Pulpa gerichteten, äußeren Teil gegliedert werden kann. Dieser Saum aus CD3⁺ T-Zellen war jedoch nicht in allen Sekundärfollikeln gleichermaßen durchgängig nachweisbar. Seine Ausdehnung war variabel von einer bis zu mehreren Zellreihen und wies Unterbrechungen auf oder es fanden sich T-Zellen in der gesamten MZ verstreut.

Die Zellen im inneren Teil dieser CD27⁺ MZ exprimierten CD20 und konnten per definitionem als mBCs identifiziert werden. Im äußeren Bereich der MZ fanden sich ebenfalls zahlreiche CD27⁺CD20⁺ mBCs. Diese nahmen in ihrem Anteil in Richtung roter Pulpa ab. Der Übergang zur roten Pulpa wurde durch CD27⁻CD20⁺ naive B-Zellen dominiert. Diese naiven B-Zellen bildeten den Hauptteil, der um die PALS ziehenden B-Zellausläufer. Das Auftreten einzelner Ki67⁻CD20⁺CD27⁺ mBCs in diesen Ausläufern nahm mit steigender Entfernung zur MZ ab. Der Übergang des mBC reichen MZ-Areals zum FM war durch eine starke Abnahme von CD27⁺CD20⁺ mBCs und Zunahme von CD27⁻CD20⁺ naiven B-Zellen gekennzeichnet. Es konnten unter den dichter gepackten Zellen des FM vereinzelt CD27⁺CD20⁺ oder CD27⁺CD3⁺ Zellen gefunden werden. Der FM in seiner Gesamtheit fiel in der weißen Pulpa jedoch als einziges größtenteils CD27⁻ Areal und somit fehlender mBC Akkumulation auf.

Die meisten der CD27⁺Ki67⁻ Zellen im GC konnten als CD3⁺ T-Zellen identifiziert werden und bildeten teilweise die dominierende Zellpopulation. Die T-Zellen nahmen in Richtung FM zu und bilden stellenweise einen Grenzbereich zwischen GC und FM.

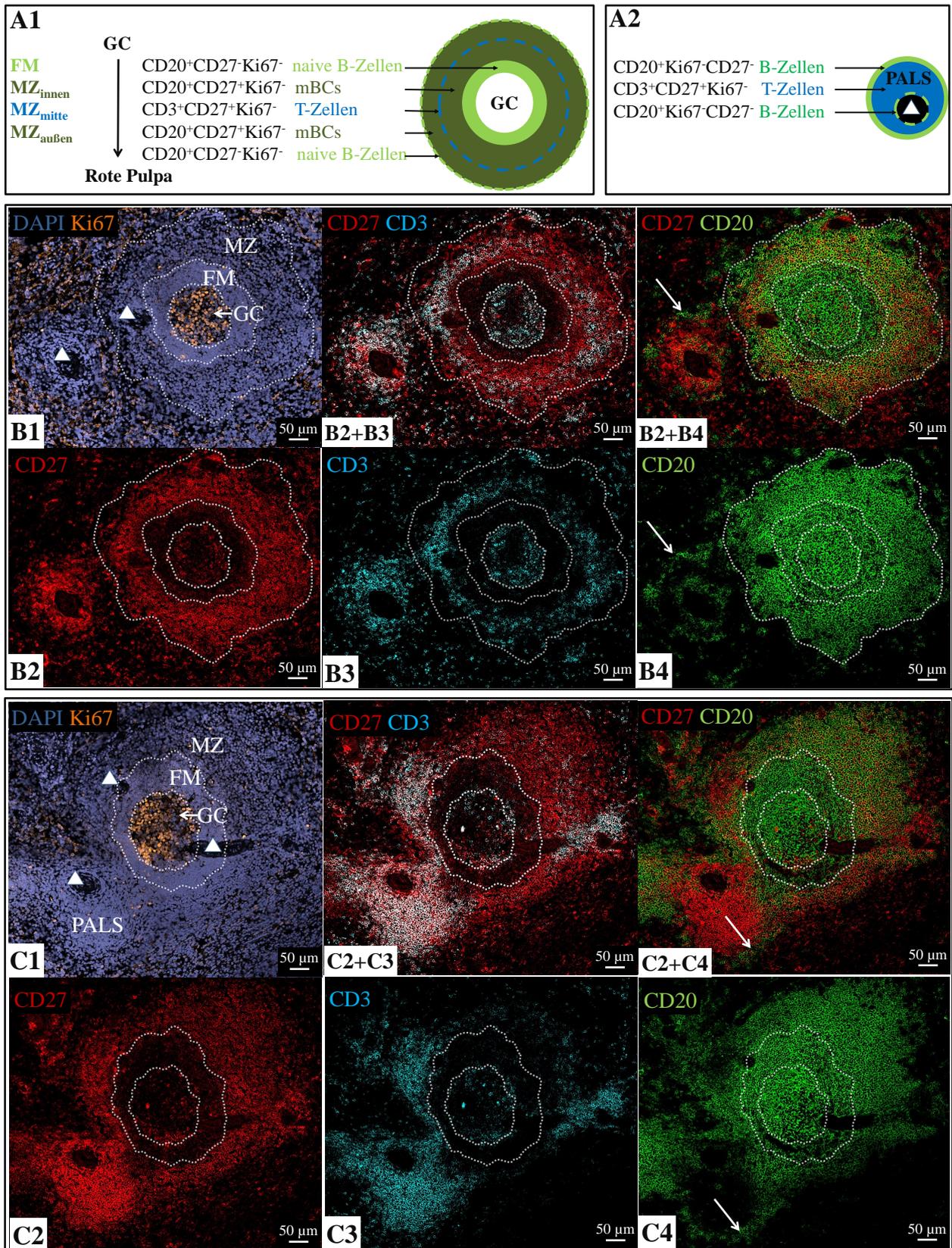


Abbildung 9 B- und T-Zellverteilung in der humanen weißen Milzpulpa

LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Milz human.

A1: Schematische Übersicht über die dominierende Zellpopulation der jeweils untersuchten Zone im Sekundärfollikel und der angrenzenden MZ.

(Fortsetzung Abbildung 9) **A2:** Schematische Übersicht über die dominierende Zellpopulation im Bereich der PALS. Das Auftreten einzelner $Ki67^-CD20^+CD27^+$ mBCs (nicht gezeigt) nimmt mit steigender Entfernung zur deutlich MZ ab.

B1/C1: Die Übergänge von GC, FM und MZ sind über die Dichte und Größe der Zellkerne mit DAPI (grau) vorgenommen und zur orientierenden Abgrenzung dargestellt (weiße Strichelungen). Die Pfeilspitzen markieren zentralarterielle Gefäße, welche in allen Zonen der weißen Pulpa beobachtet werden können. Die $Ki67^+$ proliferierenden Zellen (orange) beschränken sich bis auf vereinzelte Zellen auf das GC, ohne erkennbare ‚light‘ und ‚dark‘ Zone.

B2-B4/C2-C4: Das stärkste CD27 Signal (B2/C2 rot) geht von $CD3^+$ T-Zellen (B3/C3 blau) aus. Die PALS, als $CD3^+$ T-Zellen reiches Areal, hebt sich als signalstarkes Kompartiment von den übrigen $CD27^+$ Arealen ab (C2). Die MZ erscheint als Ring bildendes Areal $CD27^+$ Zellen. Die meisten dieser MZ Zellen sind $CD20^+$ B-Zellen (B4/C4 grün) und können als $Ki67^-CD27^+CD20^+$ mBCs identifiziert werden. In den zentralen Bereichen der MZ finden sich $CD3^+$ T-Zellen, die stellenweise ein durchgängiges Band bilden (B3) und die MZ in einen inneren und äußeren Bereich untergliedern. Am Übergang zwischen MZ und roter Pulpa lassen sich vermehrt $CD27^-CD20^+$ naive B-Zellen identifizieren, die wie eine Art Band um die PALS ziehen (weiße Pfeile B2+B4/C2+C4). Im FM finden sich vereinzelt $CD27^+$ Zellen, die als $CD3^+$ T-Zellen oder $CD20^+$ mBCs identifiziert werden können. Die größte Zellpopulation wird hier jedoch durch $CD27^-CD20^+$ naive B-Zellen gebildet. Die meisten der $CD27^+$ GC-Zellen entsprechen $CD3^+$ T-Zellen. Diese nehmen anteilig in Richtung FM zu und bilden stellenweise einen Grenzbereich zwischen GC und FM (B2+B3).

3.3.3 Die Gliederung der humanen weißen Milzpulpa über die Anordnung der IgM und IgD exprimierenden B-Zellen

Mithilfe der etablierten Methode konnten mBCs innerhalb eines Schnittes der Milz in der MZ lokalisiert und gleichzeitig ihre Lage bezüglich anderer Zellen, wie beispielsweise der $CD3^+$ T-Zellen, identifiziert werden. Durch Untersuchungen über den Phänotyp werden in den folgenden Abschnitten 3.3.3 und 3.3.4 Unterschiede in der Verteilung dieser, in der MZ gelegenen, mBCs herausgestellt, wodurch die MZ in einen inneren und äußeren Anteil untergliedert werden kann.

IgM sowie IgD werden auf der Oberfläche von ‚pre-switch‘ $IgM^+IgD^{+/-}$ mBCs sowie auf den IgM^+IgD^+ naiven B-Zellen exprimiert. Abbildung 10 zeigt die für humane Milzen gefundene Verteilung von IgM und IgD exprimierenden Zellen im intra- und extrafollikulären Bereich eines großen Sekundärfollikels.

Die Membranen der B- und T-Zellen liegen intrafollikulär sehr dicht, sodass sich einzelne $CD3^+$ Zellen am zuverlässigsten über die direkte Detektion des CD3 Antigens nachweisen lassen. Auf Grundlage der Aussagen über die vorherrschenden Zellpopulationen im FM und der MZ aus Abschnitt 3.3.2 wurden $CD27^-CD3^-$ Zellen als naive B-Zellen und $CD27^+CD3^-$ Zellen als mBCs definiert.

IgM und IgD im GC

(Abbildung 10/B3)

Der Anti IgM-Antikörper, sowie in wesentlich geringerem Ausmaß der Anti IgD⁻ Antikörper, wobei IgD auch im Blut nur in minimalen Mengen nachweisbar ist, bilden Immunkomplexe auf den residenten FDCs, wodurch interzellulär ein starkes Signal erzeugt wurde. Innerhalb des GC wurde das Signal für zellmembranständige Igs durch das Signal dieser Immunkomplexe überlagert.

IgM und IgD im FM

(Abbildung 10/B2 und B3)

Die dominierende Zellpopulation des FM bildeten die $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^-\text{CD3}^-$ naiven B-Zellen. Die vereinzelt präsenten $\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ mBCs innerhalb dieser Zone exprimierten ebenfalls IgM und IgD, wobei nicht auszuschließen ist, dass $\text{IgM}^-\text{IgD}^-\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ mBCs durch die dichte Lage der Zellmembranen im FM in diesem indirekten Verfahren nicht detektiert werden konnten.

IgM und IgD in der MZ

(Abbildung 10/B2 und B3)

Ein Unterschied in der Verteilung der mBC-Subklassen ließ sich in der MZ feststellen. IgM erschien in der gesamten MZ auf der Mehrheit der $\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ mBCs exprimiert. IgD wurde auf diesen Zellen im inneren Teil der MZ, das heißt dem FM nahen Bereich, dagegen nur schwach oder teilweise gar nicht exprimiert. Im äußeren Teil der MZ, dem FM fernen Bereich, fanden sich in Richtung rote Pulpa zunehmend $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ ‚pre-switch‘ mBCs sowie $\text{IgM}^-\text{IgD}^-\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ ‚post-switch‘ mBCs. Am Übergang zur roten Pulpa konnten vermehrt $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^-\text{CD3}^-$ naive B-Zellen mit im Vergleich zum FM erhöhtem Signal für die Expression von IgM und IgD identifiziert werden. Diese Zellen schienen die PALS als Band zu umziehen und entsprechen den in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen extrafollikulären $\text{CD27}^-\text{CD20}^+$ B-Zellen. In der gesamten MZ ließen sich einige $\text{IgM}^-\text{IgD}^-\text{CD27}^+\text{CD3}^-$ mBCs nachweisen. Es handelte sich hierbei am wahrscheinlichsten um ‚post-switch‘ mBCs, mit deren Lokalisierung sich der folgende Abschnitt 3.3.4 befasst.

Diese bereits im vorherigen Abschnitt 3.3.2 beschriebene und in der aktuellen Literatur¹ diskutierte Untergliederung der MZ stellt einen entscheidenden Unterschied zu den Untersuchungen von Nagetieren dar, deren MZ, durch einen marginalen Sinus vom GC und FM abgetrennt, von einer Zellpopulation dominiert werden (Vergleich Abschnitt 1.4).

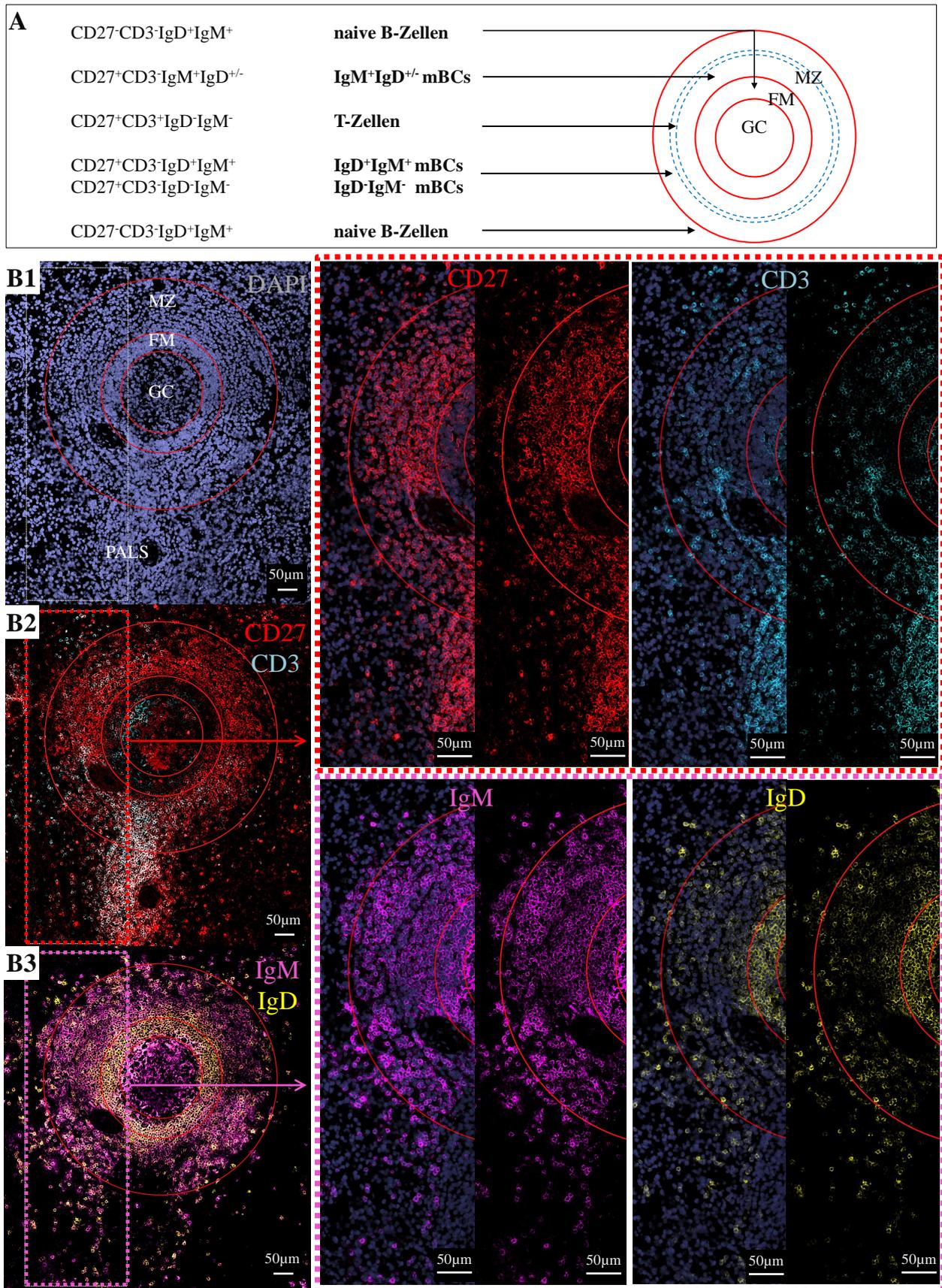


Abbildung 10 Verteilung IgM^{+/-}-IgD^{+/-} B-Zellen der humanen weißen Milzpulpa
 LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Milz human.

A: Schematische Übersicht über die dominierende Zellpopulation der jeweils untersuchten Zone im Sekundärfollikel und der angrenzenden MZ.

(Fortsetzung Abbildung 10) **B1:** Orientierende Untergliederung (rote Kreise) der Übergänge von GC, FM und MZ anhand der Zellkernfärbung mit DAPI (grau).

B2: Vergrößerung eines Ausschnittes (roter Kasten) mit CD27 (rot) und CD3 (blau) exprimierenden Zellen. Die MZ bildet sich aus CD27⁺CD3⁻ mBCs und einigen CD27⁺CD3⁺ T-Zellen im zentralen Bereich.

Im Grenzbereich zwischen MZ und roter Pulpa lassen sich vermehrt CD27⁻CD3⁻ naive B-Zellen identifizieren. Im FM sind vereinzelte CD27⁺CD3⁻ mBCs und CD27⁺CD3⁺ T-Zellen neben zahlreichen CD27⁻CD3⁻ naiven B-Zellen zu erkennen. Die PALS hebt sich als CD27⁺CD3⁺ T-Zellenreiches Areal ab. Die CD27⁺ Zellen am Grenzbereich zwischen PALS und roter Pulpa lassen sich größtenteils als CD3⁺ T-Zellen identifizieren.

B3: Vergrößerung eines Ausschnittes (violetter Kasten) mit IgD (gelb) und IgM (violett) exprimierenden Zellen. Der FM wird hauptsächlich durch IgM⁺IgD⁺ Zellen gebildet, der innere Teil der MZ durch IgM⁺IgD^{+/-} B-Zellen und der äußere Teil der MZ durch IgM⁻IgD⁻ B-Zellen.

3.3.4 Die Verteilung der Ig-Isotypen IgA, IgG, IgM und IgD in der humanen weißen Milzpulpa

In der MZ der Milz ließen sich in Richtung roter Pulpa zunehmend IgM⁻IgD⁻CD27⁺CD3⁻ Zellen identifizieren (Vergleich Abschnitt 3.3.3), wobei es sich vermutlich um ‚post-switch‘ mBCs handelt. Für eine detaillierte Analyse der Verteilung dieser IgM⁻IgD⁻ mBCs wurde die Expression von IgA und IgG sowie IgM und IgD innerhalb eines Schnittes untersucht. Die im Folgenden beschriebene heterogene Verteilung der exprimierten Ig-Isotypen IgA, IgG, IgD und IgM in den Sekundärfollikeln ist in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt.

IgA, IgG, IgD und IgM im GC

Bedingt durch die Immunkomplexe auf den residenten FDCs wurde ein starkes interzelluläres Ig-Signal detektiert. IgM sowie IgA und IgG erzeugten dabei in allen GCs so starke Signale, dass zellmembranständiges Ig, wie bereits im vorherigen Abschnitt 3.3.3 für GC-Areale beschrieben, nicht sicher identifiziert werden konnte.

IgA, IgG, IgD und IgM im FM

In allen Follikeln konnten zwischen den zahlreichen IgM⁺IgD⁺ naiven B-Zellen vereinzelte IgA⁺ und IgG⁺ Zellen im FM detektiert werden. Die Interpretation in der Nähe des GC war erschwert, da nicht auszuschließen ist, dass das starke Signal ausgehend von den Immunkomplexen in den Grenzbereich hineinstrahlt. Zudem befinden sich im FM die filigranen Fortsätze der FDCs auf denen wiederum, wie im GC, Immunkomplexe gebunden sein können. Da jedoch in allen Sekundärfollikeln vereinzeltes membranständiges IgA oder IgG auf unterschiedlichen Zellen des FM beobachtet werden konnte, ist zu vermuten, dass es sich hierbei um ‚post-switch‘ mBCs handelt.

IgA, IgG, IgD und IgM in der MZ

In allen Sekundärfollikeln konnten im Bereich der MZ heterogen verteilt liegende IgG⁺ und IgA⁺ ‚post-switch‘ mBCs identifiziert werden. Diese befanden sich einzeln oder in Akkumulationen von meist zwei bis fünf Zellen in unregelmäßigen Abständen über das gesamte Kompartiment verteilt. Ihr Anteil nahm in marginaler Richtung zu, wobei ein generelles Überwiegen IgA oder IgG exprimierender mBCs nicht festgestellt werden konnte.

Die Verteilung der hier nachgewiesenen Verteilung von $IgM^+IgD^{+/-}$ B-Zellen im FM nahen Bereich der MZ und der Zunahme IgM^+IgD^+ B-Zellen in Richtung roter Pulpa stimmt mit dem Ergebnis des Abschnittes 3.3.3 überein.

IgA, IgG, IgD und IgM extrafollikulär

IgG bildet den Hauptanteil der im Blut gelösten Antikörper.⁷⁹ In Abbildung 11 ist ersichtlich, dass der IgG-spezifische Detektionsantikörper auch die in Blutresten der roten Pulpa befindlichen IgG-Antikörper detektiert und hier ein sehr ausgeprägtes Signal erzeugt. Dies erschwert die Beurteilung IgG-Färbung am Übergang zur roten Pulpa sowie im Bereich der PALS.

Das Signal für IgA ist hier eindeutiger und die heterogene Verteilung einzelner oder akkumulierter IgA exprimierender B-Zellen, die innerhalb von Follikeln gefunden werden können, setzt sich bis in der MZ nahe gelegene Bereiche der PALS fort.

Den Hauptteil der sich zwischen PALS und roter Pulpa befindlichen Zellen bildeten, die bereits im vorherigen Abschnitt 3.3.3 beschriebenen, IgM^+IgD^+ naiven B-Zellen.

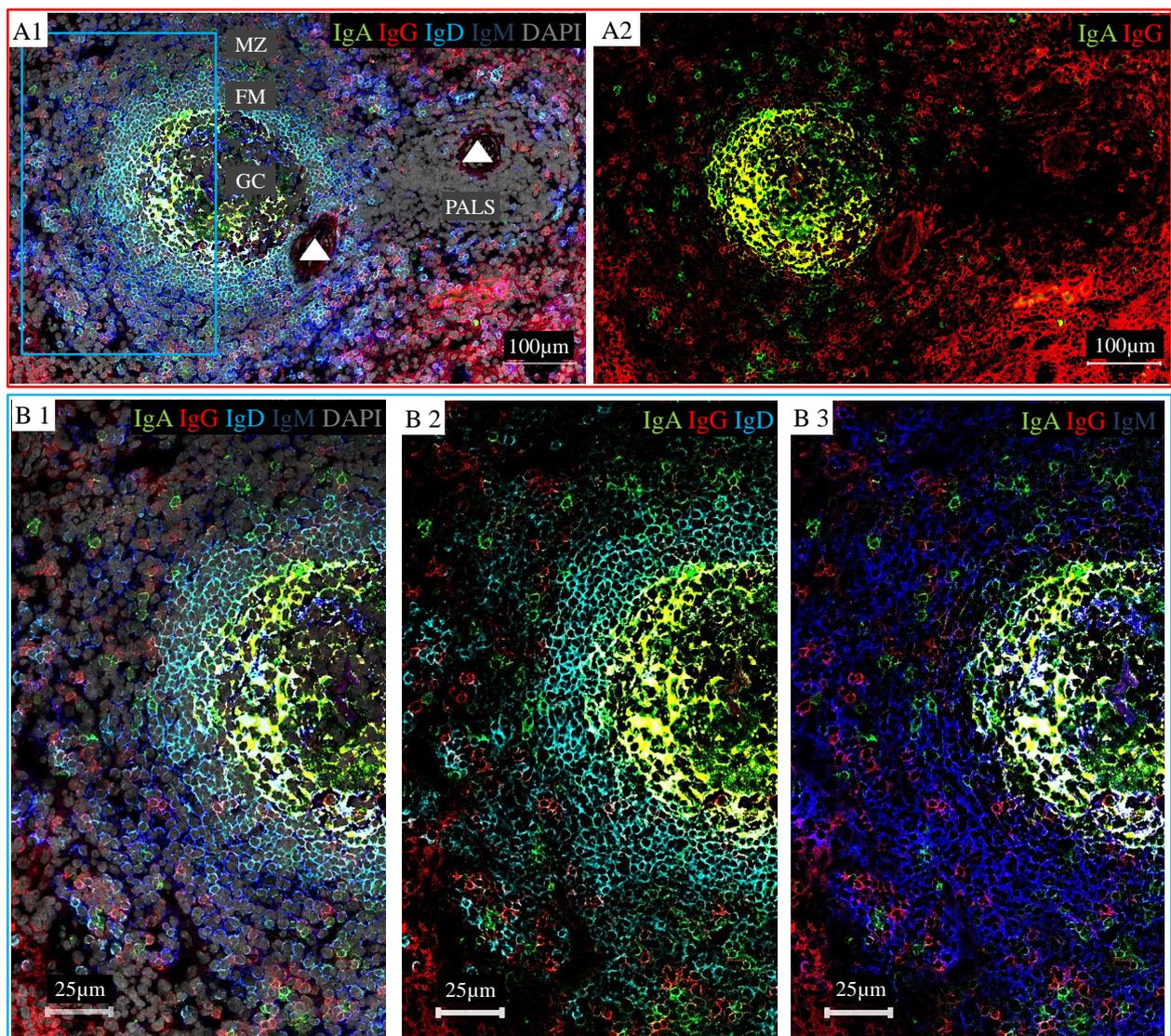


Abbildung 11 Verteilung IgA und IgG exprimierender B-Zellen der humanen weißen Milzpulpa LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Milz human.

(Fortsetzung Abbildung 11) **A1:** Schnitt durch einen Sekundärfollikel angrenzend an die PALS mit den überlagerten Signalen für DAPI (grau), IgA (grün), IgG (rot), IgM (dunkelblau) und IgD (hellblau). Die weißen Pfeilspitzen markieren zwei quer angeschnittene zentralarterielle Gefäße.

A2: Überlagerung der Signale für IgA und IgG aus A1. Der Anti IgG-Antikörper bindet an das im Blut und somit in der roten Pulpa gelöste IgG und erzeugt hier ein starkes Signal. Im Bereich des FM und der MZ lassen sich über die gesamten Kompartimente heterogen verteilte IgG^+ und IgA^+ Zellen identifizieren, die einzeln oder in Akkumulationen von meist zwei bis fünf Zellen mit zunehmender Dichte in Richtung roter Pulpa liegen. **B1/B2/B3:** Vergrößerter Ausschnitt (blauer Kasten) aus A1 mit Überlagerung ausgewählter Ig-Signale zur Darstellung der heterogenen Verteilung der Ig exprimierenden Zellen in der MZ.

3.3.5 Fazit aus der Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Milzen

Durch die Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Milzen konnten neben der bereits beschriebenen mBC reichen MZ weitere Merkmale dieses Areals detailliert untersucht werden, die anhand serieller Paraffinschnitte früherer Publikationen diskutiert wurden. Es fand sich die Unterteilung der MZ in einen inneren und äußeren Bereich, der durch ein variabel ausgeprägtes Areal aus T-Zellen getrennt ist. Im inneren MZ-Bereich befanden sich hauptsächlich IgM^+ mBCs mit schwacher oder fehlender Expression von IgD und einige IgA^+ und IgG^+ ‚post-switch‘ mBCs. Im äußeren Teil erhöhte sich die Dichte dieser ‚post-switch‘ mBCs. Außerdem befanden sich hier $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ ‚pre-switch‘ mBCs und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ naive B-Zellen. Letztere bildeten ebenso den Hauptanteil der B-Zellen um die PALS. Neben den mBCs dieses MZ-Areals konnten einige wenige mBCs im FM, sowie im MZ nahen äußeren PALS-Bereich gefunden werden.

Durch die Übereinstimmung der Studien an Paraffinschnitten, konnte die Anwendung der etablierten Methode in der Milz sowie nachfolgend in der Tonsilla palatina als zuverlässig validiert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit des innovativen Erkenntnisgewinns, da die Notwendigkeit serieller Schnitte hier keine Limitation darstellt. Ausführliche Beschreibungen der weißen Pulpa der humanen Milz mithilfe von Gefrierschnitten sind in der aktuellen Literatur bisher nicht zu finden, sodass auch die Bestätigung und Erweiterung des Wissens aus Paraffinschnitten einen wichtigen Beitrag liefert.

3.4 Anwendung auf Gefrierschnitten humaner Tonsillae palatinae

Über die Verteilung von mBCs in der Tonsilla palatina existieren kaum Beschreibungen. Diese werden bisher in der SE vermutet. Die Anwendung der etablierten und in den Milzfärbungen verifizierten Methode auf Gewebeproben humaner Tonsillae palatinae sollte Aufschluss über die genaue mBC-Lokalisation in diesem SLO geben. Hierzu wurden Gefrierschnitte von 15 Gewebeproben (Tabelle 1, Abschnitt 2.1) angefertigt und unter Anwendung der etablierten und verifizierten Methode untersucht. Für den anschließenden Vergleich der beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten SLOs ist zu beachten, dass die Entnahme der tonsillären Gewebe infolge chronisch rezidivierender Entzündungen in diesem Bereich erfolgte und dadurch ausgeprägtere B-Zellreaktionen als in der Milz zu erwarten waren. Die in die Auswertung einbezogenen Milzen waren hingegen nicht primär von immunologischen Krankheitsbildern beeinflusst. Tonsillen stehen darüber hinaus in ständigem Antigenkontakt aus der Umwelt, die Milz erfährt diesen ausschließlich über das Blut.

3.4.1 Allgemeine Morphologie der humanen Tonsilla palatina

In allen Geweben fielen zahlreiche flächendominierende asymmetrische und im Vergleich zur Milz, mit einer durchschnittlichen Ausdehnung von GC und FM über $200\ \mu\text{m}$, im Durchmesser doppelt bis vielfach größere Sekundärfollikel über $400\ \mu\text{m}$ auf. Die Abbildung 12 zeigt die typische Anordnung der Zellkerne und den Anteil Ki67^+ proliferierender und Ki67^- nichtproliferierender CD20^+ B- und CD3^+ T-Zellen.

Follikuläre Bereiche

Es konnten äquivalent zur Milz das GC und der FM als Zonen des Sekundärfollikels über die Anordnung der Zellkerne voneinander abgegrenzt werden. Wie in Abbildung 12 ersichtlich, hebt sich der FM innerhalb des Gewebeschnittes als dicht gepackte Ansammlung kleinerer Zellkerne ab. Diese ummanteln das GC asymmetrisch mit in Richtung Epithel in der Breite zunehmender Ausdehnung. Innerhalb des GC sind die Zellkerne größer und liegen weiter auseinander.

Neben dieser in allen Präparaten nachgewiesenen strukturellen Untergliederung, zeigten sich in zehn Präparaten vereinzelt GCs, die wie zerfallend wirkten; mit zahlreichen Kernfragmenten und in unterschiedlicher Ausprägung aufgehobener Gewebearchitektur (nicht dargestellt). Es ist nicht auszuschließen, dass diese bei der Untersuchung weiterer Schnittebenen in allen Präparaten auftreten und einem späten Follikelstadium entsprechen. In den weiteren Auswertungen wurde auf diese zerfallenden beziehungsweise involutierten GCs kein Bezug genommen.

Bei der Beurteilung der Sekundärfollikel war zu beachten, dass diese innerhalb eines Präparats je nach Schnittebene in ihrer Form differieren. Das beschriebene asymmetrische Muster des FM trat zusammen mit einem ellipsenförmigen GC auf bei einem Schnitt entlang der Längsachse des Follikels. Erschienen die Follikel hingegen kreisförmig, handelte es sich um einen Querschnitt mit weniger breitenvariablem FM. Bei der weiteren Untersuchung dieser Schnitte fehlte daher die eindeutige Differenzierung in ‚dark‘ und ‚light‘ Zone. Neben den unterschiedlichen möglichen Winkeln zwischen Längs- und Querschnitt zeigten sich in sechs Präparaten ebenfalls nieren- und sanduhrförmig eingeschnürte Follikelformationen sowie scheinbar durchbrochene FM-Bereiche, die keinem der beiden Schnitttypen zugeordnet werden konnten (nicht dargestellt).

Scheinbare oder echte Primärfollikel wurden, äquivalent zur Milz, auch bei der Auswertung der tonsillären Befunde nicht einbezogen, da sich in seriellen Schnitten in Richtung des GC zeigte, dass es sich meist um angeschnittene Bereiche des FM eines Sekundärfollikels handelte. Der typisch asymmetrische Sekundärfollikel präsentierte sich in allen Präparaten erwartungsgemäß als Ansammlung von CD20⁺ B-Zellen (Abbildung 12/C). Im Längsschnitt ließ sich im voll ausgeprägten Sekundärfollikel die epithelferne ‚dark‘ Zone mit überwiegend proliferierenden Ki67⁺CD20⁺ B-Zellen und die epithelgerichtete ‚light‘ Zone mit einem höheren Anteil von Ki67⁻CD20⁺ B-Zellen identifizieren (Abbildung 12/D). Die wenigen CD3⁺ follikulären T-Zellen fanden sich in den GCs vermehrt in Richtung Epithel und sehr vereinzelt auch im FM. Neben dieser häufigen Verteilung konnten Follikel mit erhöhter Anzahl von CD3⁺ T-Zellen im Zentrum des GC gefunden werden mit einem teilweise durchbrochen wirkendem dünnen FM, sodass es wie eine Verbindung intra- und extrafollikulärer T-Zellen erschien (nicht dargestellt).

Extrafollikuläre Bereiche

Neben der Akkumulation von CD20⁺ B-Zellen in den Sekundärfollikel ließen sich in allen Präparaten in direkter Nachbarschaft, das heißt perifollikulär und subepithelial sowie epithelial ebenfalls CD20⁺ B-Zellen nachweisen (Abbildung 12/C). In den inneren epithelfernen tonsillären Gewebeanteilen stellten sich schmale Aussparungen, die von runden Zellkernen umgeben waren, dar, die als HEVs interpretiert wurden und in deren Umgebung sich ebenfalls CD20⁺ B-Zellen detektieren ließen.

Die Tonsilla palatina ist durch Plattenepithel nach außen abgegrenzt. Dieses konnte über eine geordnete Reihe basaler, proliferierender Ki67⁺ Zellen und sich an der Oberfläche befindender abgeflachter Zellkerne vermutet werden (Abbildung 12/D). Im Bereich dieses Plattenepithels ließen sich weniger CD20⁺ B-Zellen identifizieren, als innerhalb und unterhalb des aufgelockert wirkenden Kryptenepithels. Die im Lumen dieser Krypten histologisch nachweisbaren strukturlosen Massen werden als Detritus bezeichnet und bilden sich durch Reste toter Zellen. Die CD20⁺ B-Zellen nahmen in allen Präparaten von perifollikulär nach subepithelial wie ein breiter werdender Saum zu (Abbildung 12/C), sodass davon auszugehen ist, dass sich die größte Anhäufung extrafollikulärer B-Zellen direkt unterhalb des Kryptenepithels befindet.

Zwischen den Follikeln und den inneren epithelfernen Gewebebereichen waren $CD3^+$ T-Zellen die dominierende Zellpopulation (Abbildung 12/C). Diese bilden hier, die nach ihrer interfollikulären Lokalisation benannte, IF. Die Anzahl extrafollikulärer $Ki67^+$ proliferierender Zellen schien in allen Präparaten in den zentralen Bereichen dieser IF geringer als in $CD20^+$ B- und $CD3^+$ T-Zellgrenzbereichen und kann daher als repräsentativ angesehen werden, wobei diese Beobachtung das histologische Korrelat interagierender Lymphozyten darstellen könnte.

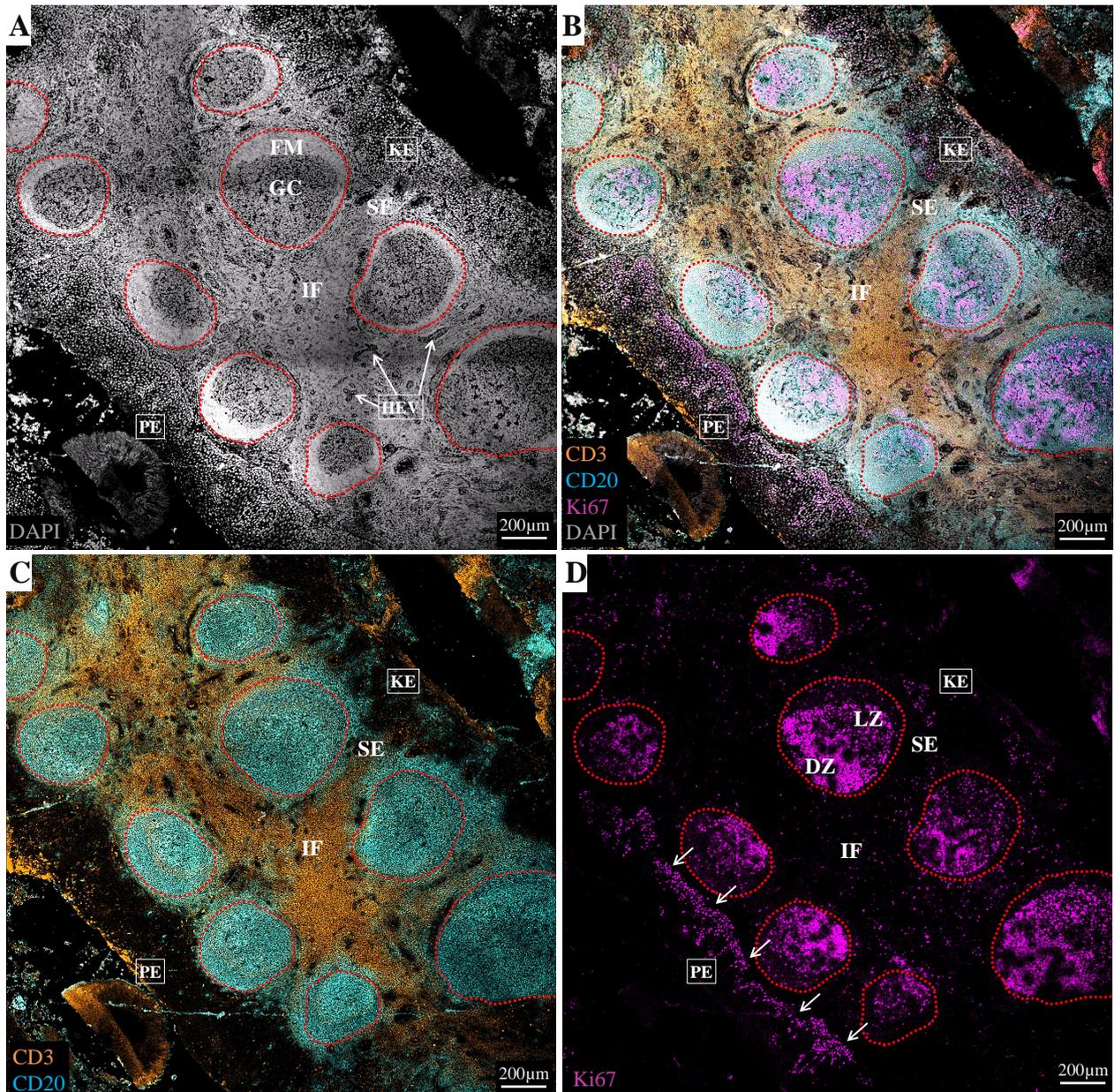


Abbildung 12 Allgemeine Morphologie der humanen Tonsilla palatina

LSM-Aufnahme mit 10x Objektiv; Tonsilla palatina human (PE = Plattenepithel; KE = Kryptenepithel; DZ = ‚dark‘ Zone; LZ = ‚light‘ Zone).

A: Die roten Markierungen dienen einer orientierenden Abgrenzung des jeweiligen Übergangs von intra- und extrafollikulärem Gewebe und sind anhand der Zellkerne mit DAPI (grau) vorgenommen.

(Fortsetzung Abbildung 12) **B (=A+C+D)**: Überlagerung des DAPI-Signals aus A mit den Signalen für die Expression von CD3 (orange) und CD20 (hellblau) aus C sowie Ki67 (violett) aus D. Das GC stellt sich als Areal ungleichmäßig verteilter unterschiedlich großer Zellkerne mit erhöhtem Anteil Ki67⁺ epithelferner Zellen als ‚dark‘ Zone (DZ) und vergleichsweise höherem Anteil Ki67⁻ epithelnäherer Zellen als ‚light‘ Zone (LZ) dar (D). CD20⁺ B-Zellen sind hier die dominierende Zellpopulation (C). Der FM, lässt sich als GC umgebender Saum kleinerer, dicht gepackter Zellkerne erkennen und nimmt in seiner Ausdehnung in Richtung Epithel zu. CD20⁺Ki67⁻ B-Zellen sind hier die dominierende Zellpopulation (C/D). Das Plattenepithel (PE) lässt sich über aneinandergereihte basal sitzende CD20⁻CD3⁻Ki67⁺ proliferierende Zellen (weiße Pfeile D) vermuten und enthält kaum CD20⁺ B-Zellen oder CD3⁺ T-Zellen (C). Das Kryptenepithel (KE) lässt sich als aufgelockerter Zellverband mit einigen CD20⁻CD3⁻Ki67⁺ proliferierenden Zellen sowie einigen CD20⁺ B-Zellen und CD3⁺ T-Zellen erkennen. Die subepithelialen Regionen (SE) weisen den größten Anteil extrafollikulär identifizierbarer CD20⁺ B-Zellen auf, mit einem Maximum direkt unterhalb des KE (C). Hier lassen sich außerdem einige CD3⁺ T-Zellen detektieren. Die interfollikulären, epithelfernen Regionen (IF) enthalten vornehmlich CD3⁺ T-Zellen und einige CD20⁺ B-Zellen im Bereich um schmale Gewebearisparungen, die von runden Zellkernen umgeben sind und als HEVs interpretiert wurden.

3.4.2 CD27 exprimierende Lymphozyten in der humanen Tonsilla palatina

In den unterschiedlichen Präparaten konnten neben der in Abbildung 12 dargestellten Übersicht, einer typischen Variante voll ausgeprägter Sekundärfollikel, abweichende Strukturen nachgewiesen werden, die durch die Schnittebene bedingt oder einem anderen Follikelstadium zugeordnet werden können (Vergleich Abschnitt 3.4.1). Die folgenden Auswertungen zur Bestimmung tonsillärer mBC-Bereiche beziehen sich auf die follikulären und extrafollikulären Bereiche des typischer voll ausgeprägter Sekundärfollikel, wie sie in allen Präparaten identifiziert werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden mBCs definiert als Ki67⁻ ruhende CD20⁺ B-Zellen, die das CD27 Antigen als bekannten mBC-Marker exprimieren. Histologische Lokalisationsstudien tonsillärer mBCs über das CD27 Antigen existieren bislang nur in Form von Paraffinschnitten, wobei die angewandte Subtraktionstechnik keine Erfassung aller mBCs erlaubte (Vergleich Abschnitt 4.2.1).

In den untersuchten Tonsillenpräparaten ließen sich, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 für die Milz festgestellt, Unterschiede in der Signalintensität für die Expression von CD27 feststellen. Mit dem Wissen um die zusätzliche Expression von CD20, Ki67 und IgD, κ/λ sowie der Darstellung der Zellkerne mit DAPI ließen sich verschiedene Bereiche abgrenzen, die in Abbildung 13 dargestellt sind.

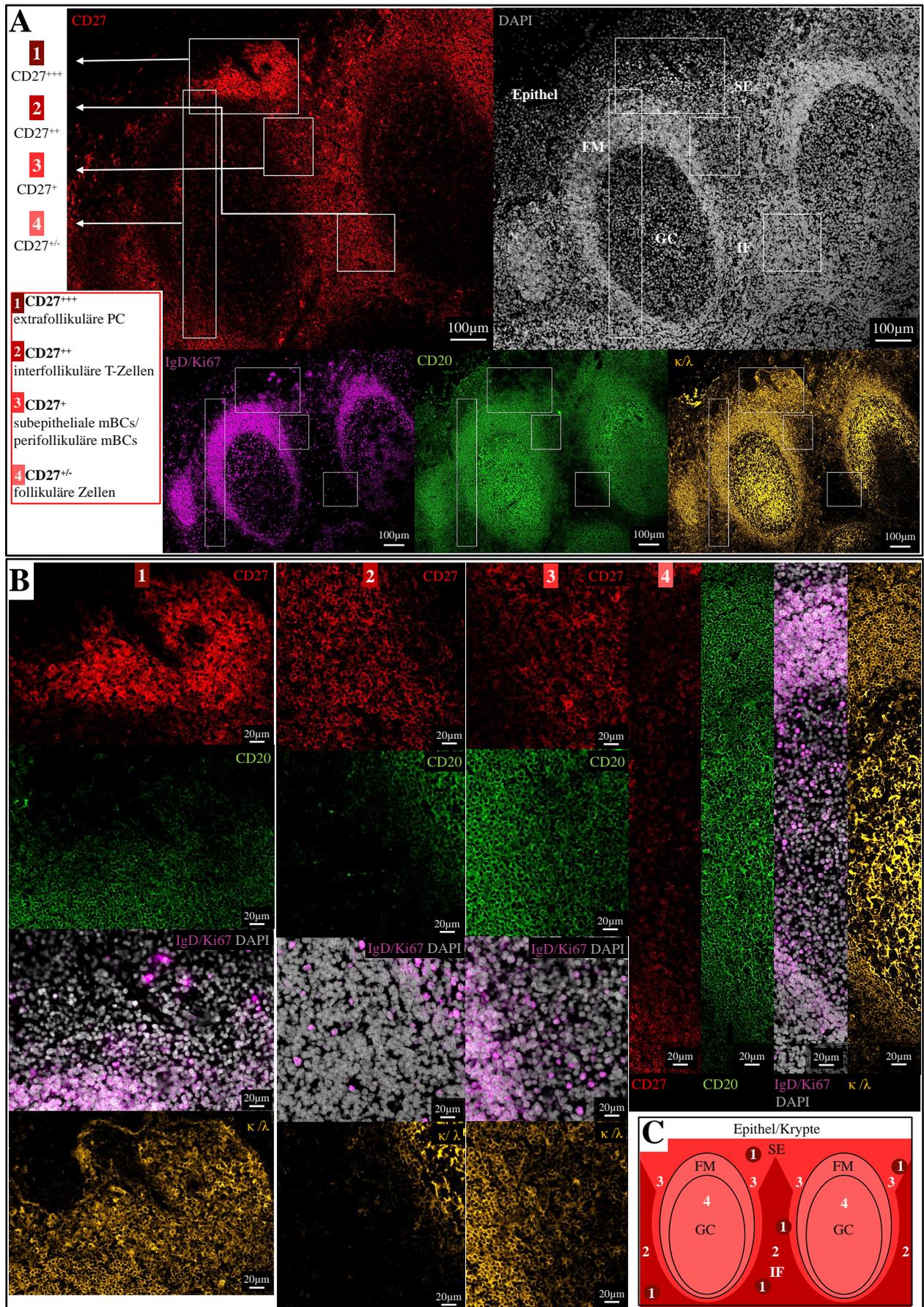


Abbildung 13 Verteilung CD27 exprimierender Lymphozyten in der humanen Tonsilla palatina

(Fortsetzung Abbildung 13) LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Tonsilla palatina human.

A: Zwei angeschnittene Sekundärfollikel mit der Information über die Lage der Zellkerne (DAPI grau), CD20 exprimierende B-Zellen (grün) sowie Ki67⁺ proliferierende und IgD exprimierende Zellen in einem Kanal (violett), κ/λ exprimierende Zellen (orange) und CD27 exprimierende Zellen (rot). Über die Signalabstufung des CD27-Signals können vier verschiedene Bereiche voneinander abgegrenzt werden: Bereich 1 als Zellen mit stärkstem Signal bis Bereich 4 als signalärmstes Areal.

B: Vergrößerung der über das CD27 Signal abgegrenzten Bereiche. Bereich 1 als extrafollikuläre überwiegend CD20⁻Ki67⁻CD27⁺⁺⁺ PCs mit zytoplasmatischer κ/λ Expression. Bereich 2 als interfollikuläre CD20⁻ κ/λ ⁻CD27⁺⁺ T-Zellen. Bereich 3 als subepitheliale und perifollikuläre CD20⁺Ki67⁻CD27⁺ mBCs. Bereich 4 als CD27 signalarmes follikuläres Areal mit einigen CD20⁻ κ/λ ⁻CD27⁺ T-Zellen oder Ki67⁺CD27⁺ Plasmablasten und vereinzelt CD20⁺CD27⁺Ki67⁻ mBCs im FM.

C: Schematische Übersicht der dominierenden Zellpopulation in den jeweils untersuchten Arealen.

Extrafollikuläre CD27⁺⁺⁺ PCs

(Abbildung 13/1)

Das stärkste CD27 Signal ging in allen Präparaten extrafollikulär von größtenteils Ki67⁻ Zellen aus, die eine hohe zytoplasmatische κ/λ Expression und sehr schwache CD20 Expression aufwiesen. Diese Eigenschaften sind typisch für CD27⁺⁺⁺ PCs. Anhäufungen von PCs fanden sich in allen Präparaten vornehmlich subepithelial, teilweise ‚Straßen bildend‘ zwischen den Follikeln fortlaufend, sowie als Cluster um Gefäßlumen angeordnet und vereinzelt im GC. In den interfollikulären T-Zellbereichen ließen sich kaum PCs darstellen. Zwischen den unterschiedlichen Präparaten fiel eine hohe Variabilität der Anzahl dieser Zellen auf, die von einigen vor allem in der SE gelegenen Zellen bis zu starken Anhäufungen über das gesamte Gewebe verteilt reichten.

Interfollikuläre CD27⁺⁺ T-Zellen

(Abbildung 13/2)

Neben den CD27⁺⁺⁺ PCs fand sich in allen Präparaten ein starkes Signal für κ/λ ⁻CD20⁻ Zellen der interfollikulären T-Zell Zone. Innerhalb dieser CD27⁺⁺ T-Zellbereiche ließen sich vereinzelt Ki67⁺ proliferierende Zellen detektieren, die an den Übergängen zu B-Zellbereichen in ihrer Anzahl erhöht erschienen, was sich vermutlich durch eine erhöhte Interaktion der Lymphozyten erklären lässt.

Subepitheliale und perifollikuläre CD27⁺ mBCs

(Abbildung 13/3)

In der SE und perifollikulär, in Form eines lückenhaften Saums um den gesamten Sekundärfollikel, befand sich in allen Präparaten ein in der Ausprägung variables CD27⁺CD20⁺ κ/λ ⁺Ki67⁻ Areal, welches per definitionem als mBC-Bereich identifiziert werden konnte. Eine klare Abgrenzung als Zone, wie sie in der MZ der Milz beschrieben ist, konnte dabei in keinem der Präparate vorgenommen werden. Dieser unregelmäßige Saum aus mBCs verbreiterte sich in Richtung Epithel mit einem Maximum in der SE.

Follikuläre CD27^{+/-} Zellen

(Abbildung 13/4)

Die Sekundärfollikel aller Präparate präsentierten sich als CD27 signalarme Gebiete, sodass sie innerhalb eines Schnittes wie ausgestanzt wirkten. In der vergrößerten Ansicht des einzelnen Follikels war dennoch ein Übergang zwischen FM und GC erkennbar. Im GC fanden sich zudem in zunehmender Anzahl in Richtung Epithel einzelne Zellen mit starkem CD27 Signal.

Der Großteil dieser Zellen konnte als $Ki67^-CD20^-$ T-Zellen oder $Ki67^+$ Plasmablasten identifiziert werden. Innerhalb des FM konnten einzelne $CD27^+CD20^+Ki67^-$ mBCs detektiert werden.

3.4.3 Lokalisation von mBCs in der humanen Tonsilla palatina

Der im vorherigen Abschnitt 3.4.2 beschriebene perifollikuläre und subepitheliale Bereich, in welchem sich die $CD27^+Ki67^-CD20^+$ mBCs befinden, konnte in allen untersuchten Präparaten als unregelmäßiger Saum mit zunehmender Ausdehnung in Richtung Epithel und einem Maximum in der SE nachgewiesen werden. Einige mBCs konnten, wie in der Milz, ebenfalls im FM identifiziert werden. Eine deutliche Zone in Form eines MZ-Kompartiments, analog zur Milz, ließ sich jedoch nicht identifizieren. Im Gegensatz zur Milz erschien die Ausprägung dieses Bereichs innerhalb und zwischen den Präparaten variabel. Teilweise waren der sehr dünne und lückenhafte mBC-Saum um einige Sekundärfollikel kaum nachweisbar. In zwei Präparaten fanden sich dagegen auffällig ausgedehnte mBC-Areale in der SE und IF. Die GC-Flächen wirkten dabei sehr groß, der FM dagegen vergleichsweise schmal (nicht dargestellt).

Abbildung 14 zeigt exemplarisch das manuell ausgezählte Gebiet der größten mBC Akkumulation aus Abbildung 13. Die Beurteilung der Expression von IgD auf mBCs innerhalb des FM war aufgrund der dichten Lage der Membranen erschwert. Es ist nicht auszuschließen, dass sich in diesem Bereich das Verhältnis von IgD^- ‚post-switch‘ mBCs und IgD^+ ‚pre-switch‘ mBCs zugunsten letzterer verschoben hat. Das Verhältnis von IgD^+ zu IgD^- mBCs weist außerhalb des FM in dieser und weiteren manuellen Auszählungen auf einen abnehmenden Anteil von IgD^+ ‚pre-switch‘ mBCs mit Entfernung vom Sekundärfollikel hin.

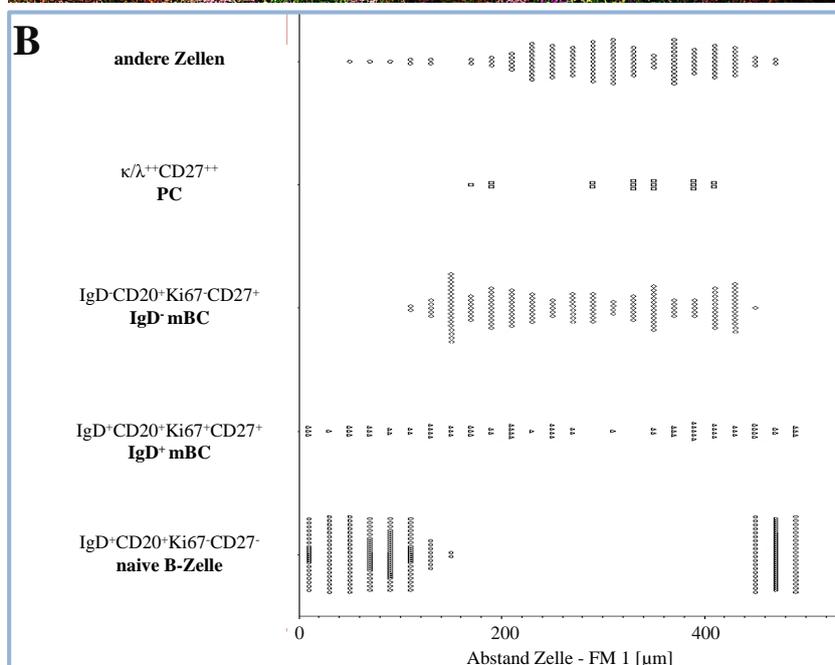
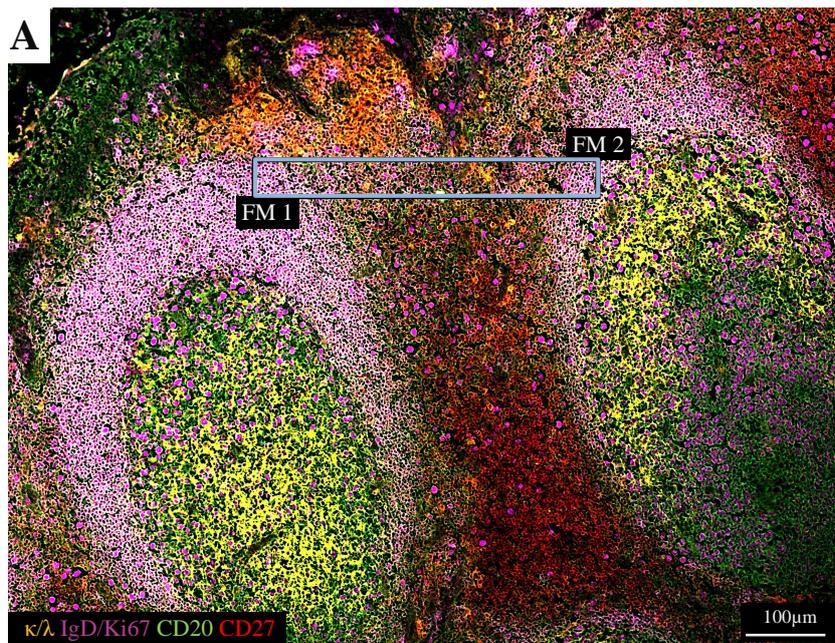


Abbildung 14 Analyse der Verteilung von mBCs in der SE der humanen Tonsilla palatina

A: Überlagerte Signale für CD20 (grün), Ki67 und IgD (violett), κ/λ (orange) und CD27 (rot) aus Abbildung h. Blauer Kasten markiert das manuell ausgezählte mBC-Areal.

B: Auszählung des Rechtecks zwischen FM1 und FM2. IgD⁺ ‚pre-switch‘ und IgD⁻ ‚post-switch‘ mBCs verteilen sich gleichmäßig über das gesamte subepitheliale Gebiet mit abnehmender Dichte bei zunehmender Entfernung vom Sekundärfollikel.

3.4.4 Verteilung der Ig-Isotypen IgM, IgD, IgG und IgA in der humanen Tonsilla palatina

Die IgD⁺ ‚pre-switch‘ und IgD⁻ ‚post-switch‘ mBCs fanden sich gleichmäßig und ohne erkennbare Clusterbildung in den perifollikulären und subepithelialen Gebieten verteilt (Vergleich Abbildung 14). Für eine direkte Beurteilung der Verteilung verschiedener mBC-Phänotypen wurde die Expression von IgM, IgD, IgG und IgA in allen Präparaten auf dem jeweils einzelnen Gefrierschnitt untersucht. Die Auswertung des IgG-Signals war erschwert, da eine Reaktion mit den extrafollikulären Bestandteilen des Bindegewebes, wie beispielsweise den Retikulumzellen, diese beeinflusst hat. Abbildung 15 zeigt einen Überblick über die am

häufigsten beobachtete Verteilung der Ig exprimierenden Zellen.

IgA, IgG, IgD und IgM im GC

(Abbildung 15/A)

In allen Präparaten fiel das GC als Areal deutlicher Ig-Färbung auf. Dies ist durch eine Immunkomplexbildung mit den residenten FDCs, insbesondere in der ‚light‘ Zone, zu erklären. Die Signale einzelner Zellen wurden hier überlagert. In vier Präparaten konnten neben diesem typischen Befund ebenfalls Sekundärfollikel mit wenig Immunkomplexbildung und einer Häufung von Zellen mit membranständigem IgG oder IgA gefunden werden. Es fanden sich drüber hinaus sogar follikelartige Strukturen, die eine Ansammlung homogen verteilter entweder IgA oder IgG exprimierender Zellen innerhalb eines Ringes von IgM⁺IgD⁺ naiven B-Zellen aufwiesen. In seriellen Schnitten war der Großteil der Zellen dieser Areale Ki67⁺ (Daten nicht gezeigt).

IgA, IgG, IgD und IgM im FM

(Abbildung 15/B2)

In allen Präparaten konnten vereinzelte IgA und IgG exprimierende Zellen im FM gefunden werden. Dies stimmt mit der Identifikation CD27⁺CD20⁺Ki67⁻ mBCs im FM, wie sie in Abschnitt 3.4.2. beschrieben wurden, überein. Diese IgA⁺ und IgG⁺ ‚post-switch‘ mBCs konnten in jedem FM in geringer Anzahl nachgewiesen werden.

IgA, IgG, IgD und IgM extrafollikulär

(Abbildung 15/B1)

Ein deutliches extrafollikuläres Signal für die Expression von Igs ging von den PCs aus. In 14 Präparaten konnten dabei IgA⁺ und IgG⁺ PCs als die beiden Hauptpopulationen dokumentiert werden. Einige IgM⁺ PCs befanden sich in allen Präparaten vor allem subepithelial, wohingegen IgD⁺ PCs sind in diesen Präparaten kaum zu identifizieren waren. In einem Präparat ließ sich in allen Schnitten eine deutlich erhöhte Anzahl IgD⁺ PCs gegenüber den IgA⁺ und IgG⁺ PCs feststellen.

Im Vergleich zu den PCs war das Signal der Igs auf mBCs verhältnismäßig schwach. Subepithelial und perifollikulär konnte auf variabler Zellzahl oberflächenexprimiertes Ig nachgewiesen werden, wobei es sich hier um die in Abschnitt 3.4.2. beschriebene Hauptlokalisierung von mBCs handelt. In direkter Nachbarschaft des Follikels exprimierte die Mehrheit der Zellen IgD und IgM. Der Anteil der darunter befindlichen naiven B-Zellen kann jedoch nur mit zusätzlicher CD27-Färbung bestimmt werden. Die Dichte der IgG⁺ und IgA⁺ B-Zellen nahm mit Entfernung zum Follikel gegenüber dem der IgM⁺IgD⁺ B-Zellen zu. Diese IgA⁺ und IgG⁺ Zellen bildeten dabei in keinem der Präparate erkennbare Strukturen und wurden stets in heterogener Verteilung nachgewiesen.

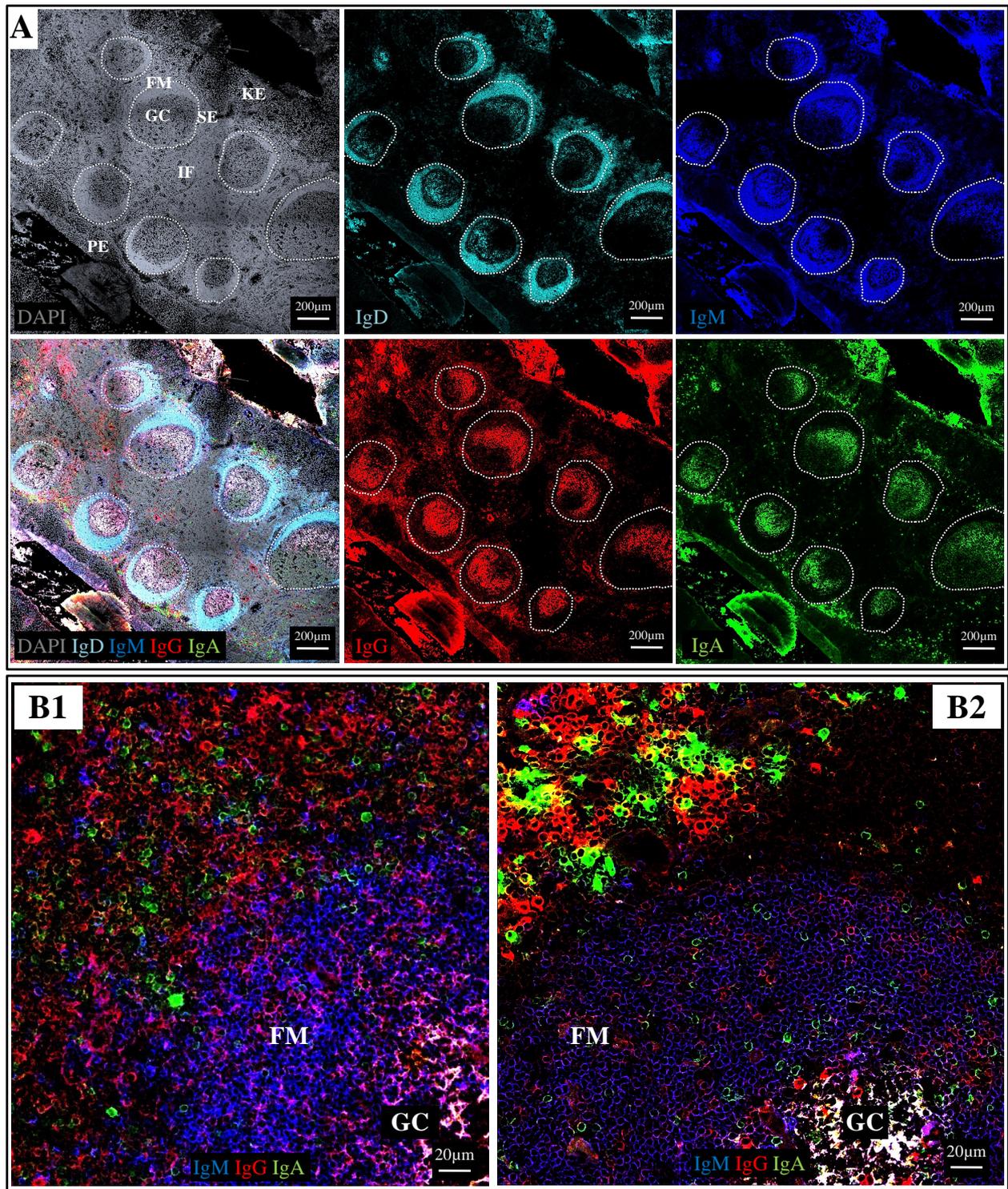


Abbildung 15 Verteilung Ig exprimierender Zellen in der humanen Tonsilla palatina

A: LSM-Aufnahme mit 10x Objektiv; Tonsilla palatina human (KE = Kryptenepithel; PE = Plattenepithel). Übersichtsaufnahme eines seriellen Schnittes zu Abbildung 12. Die weiße Strichelung markiert die Abgrenzung des FM zum extrafollikulären Areal anhand der DAPI-Färbung (grau). Die Anti-Ig-Antikörper bilden Immunkomplexe in den „light“ Zonen der GCs. Die Dichte von IgD⁺IgM⁺ B-Zellen nimmt in Richtung SE zu. IgG⁺ und IgA⁺ B-Zellen sind in dieser Auflösung kaum detektierbar. IgG⁺⁺ und IgA⁺⁺ PCs können vereinzelt im IF als fluoreszenzintensive einzelne Zellen und als Anhäufung im SE beobachtet werden.

B1: LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Tonsilla palatina human. Die SE im Bereich einer Krypte zur Veranschaulichung der heterogenen Verteilung der IgA⁺ und IgG⁺ B-Zellen.

B2: LSM-Aufnahme mit 63x Objektiv; Tonsilla palatina human. Die SE im Bereich einer Krypte mit extrafollikulären IgA⁺⁺ und IgG⁺⁺ PCs sowie IgA⁺ und IgG⁺ B-Zellen innerhalb des FM.

3.4.5 Fazit aus der Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Tonsillae palatinae

Mit der Anwendung der etablierten Methode auf Gefrierschnitten humaner Tonsillen konnte erstmals die Verteilung von CD27⁺ mBCs direkt nachgewiesen werden. Es ließen sich, wie in der Milz, wenige mBCs im FM und der Hauptteil perifollikulär nachweisen. Dieser perifollikuläre mBC-Saum war im Unterschied zur Milz asymmetrisch geformt, verbreiterte sich in Richtung Epithel und erreichte in der SE seine maximale Ausdehnung. Seine Ausprägung war sehr variabel und präsentierte sich ebenso lückenhaft oder kaum nachweisbar, sodass für dieses SLO kein ebenso deutliches mBC-Kompartiment, wie das der Milz in Form der humanen MZ, beobachtet werden konnte.

Auch für andere SLOs wurde bisher ebenso kein MZ-artiges Areal beschrieben. Die Ursache dieser unterschiedlichen Anordnung und die Bedeutung für das Überleben und die Reifung dieser mBCs bleiben damit weitgehend unklar. Im Rahmen der Suche nach beeinflussenden Faktoren befasst sich der folgende abschließende Abschnitt 3.5. mit der Expression von MAdCAM-1, einem wesentlichen Unterschied der mBC-Areale in den untersuchten humanen Milzen und Tonsillae palatinae.

3.5 Expression von MAdCAM-1 in der humanen Milz und der humanen Tonsilla palatina

Ein Unterschied der mBC-Eigenschaften in den beiden untersuchten SLOs besteht in der vermehrten Expression von β_7 auf den mBCs der Milz im Vergleich zu den tonsillären mBCs.⁴⁰ Der Ligand MAdCAM-1 als mukosaassoziiertes Adressin ermöglicht das sogenannte ‚Homing‘ β_7 exprimierender Lymphozyten und wird in der humanen Milz-MZ exprimiert.⁶⁸

Abbildung 16 zeigt die nachgewiesene Expression von MAdCAM-1, wie sie in allen MZ-Bereichen der Milz gefunden werden konnte. Das MAdCAM-1-Signal war hier insbesondere im MZ-Zentrum zu detektieren. Dabei bildete dieses Molekül einen Ring um den gesamten aus GC und FM bestehenden Sekundärfollikel, konnte jedoch weder im FM und GC noch in der Umgebung follikelferner PALS-Areale identifiziert werden. In unmittelbarer Nähe der MAdCAM-1 exprimierenden Zellen befanden sich in allen Schnitten CD20⁺CD27⁺ mBCs. Ein Unterschied in der Anordnung von ‚pre-switch‘ und ‚post-switch‘ mBCs konnte nicht beobachtet werden.

In der Tonsille wurde dagegen kein MAdCAM-1-Signal detektiert.

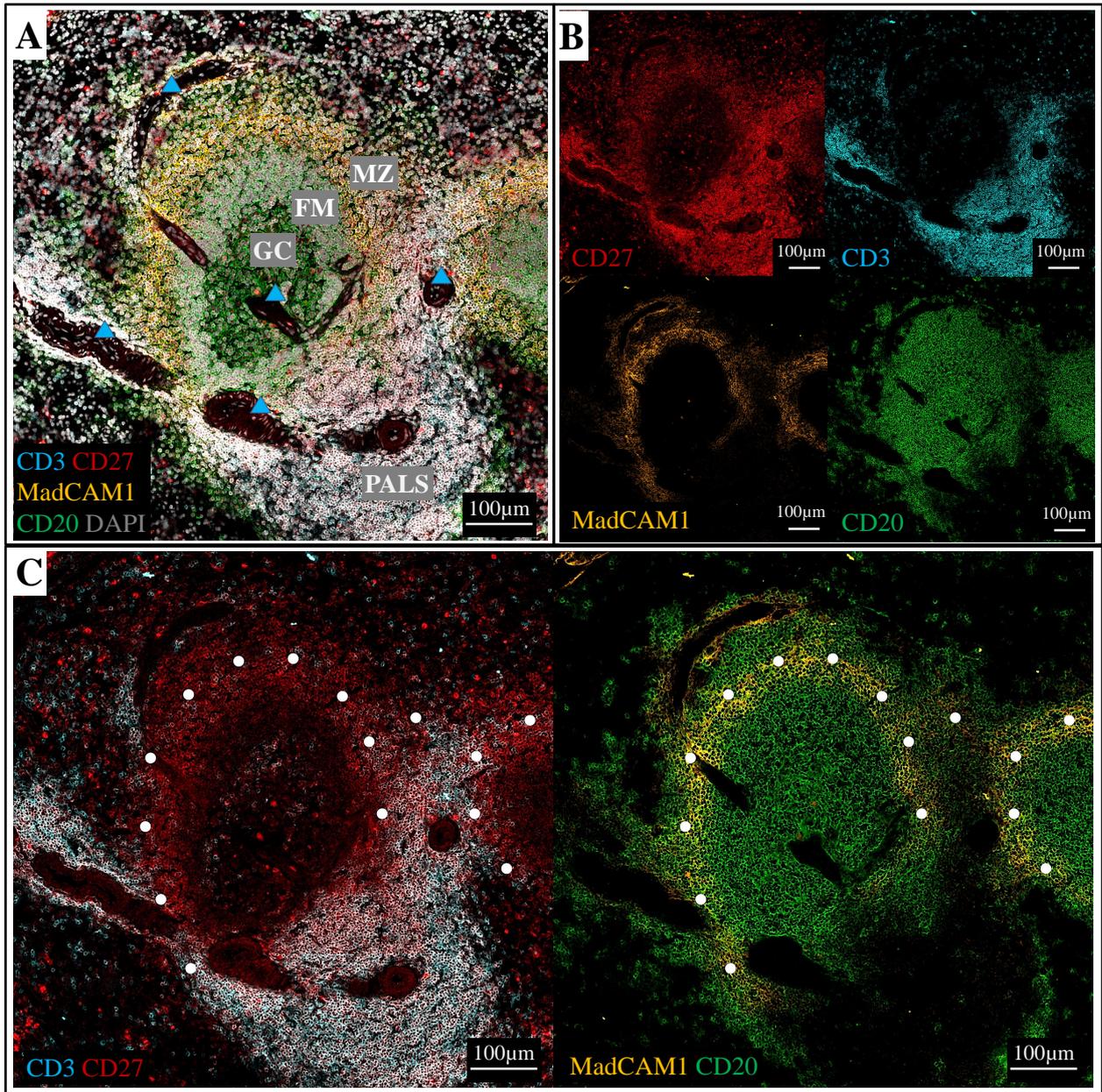


Abbildung 16 Expression von MAdCAM-1 in der humanen Milz

LSM-Aufnahme mit 20x Objektiv; Milz human.

A: Überlagerung des Signals DAPI-gefärbter Zellkerne (grau) mit den Signalen aus B für CD20⁺ B-Zellen (grün), CD3⁺ T-Zellen (blau), CD27⁺ T-Zellen und mBCs (rot) sowie MAdCAM-1 (gelb), wobei letzteres durchgängig in den zentralen Bereichen der MZ erscheint. Die blauen Pfeilspitzen markieren längs und quer angeschnittene zentralarterielle Gefäße, die hier alle Bereiche der weißen Pulpa durchlaufen.

B: Getrennte Signale der überlagerten Kanäle aus A (ohne DAPI).

C: Die weißen Kreise markieren orientierend den Bereich der Expression von MAdCAM-1 zur Veranschaulichung der maximalen Expression im CD27⁺CD20⁺CD3⁻ mBC-Bereich.

3.6 Übersicht der Lymphozytenverteilung im Menschen: weiße Milzpulpa versus Tonsilla palatina

Die folgende Tabelle 3 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die nachgewiesene Lymphozytenverteilung der humanen weißen Milzpulpa im Vergleich zur humanen Tonsilla palatina.

Differenzierungsparameter	Humane weiße Milzpulpa	Humane Tonsilla palatina
T-Zellzone	Als PALS um die zentralarteriellen Gefäße; variabel in der Ausdehnung mit Unterbrechungen oder Clustern. (Vergleich 3.3.1.)	Als IF in den epithelfernen, interfollikulären Bereichen; stets großflächige Areale. (Vergleich 3.4.1.)
Weitere auffällige T-Zellakkumulationen	Übergang vom GC zum FM; zentraler Bereich der MZ. (Vergleich 3.3.2. und 3.3.3.)	Keine
B-Zellzone	Sekundärfollikel mit symmetrischem FM und GC, welches sich meist ohne erkennbare ‚light‘ und ‚dark‘ Zonen darstellt. Oder in Form kleiner B-Zellakkumulationen ohne erkennbares GC. (Vergleich 3.3.1.)	Ovaler Sekundärfollikel; GC mit erkennbarer ‚light‘ und ‚dark‘ Zone und asymmetrischer FM, welcher sich in Richtung Epithel verbreitert. (Vergleich 3.4.1.)
Naive B-Zellen außerhalb des Sekundärfollikels	An der PALS-Oberfläche sowie am Übergang der MZ zur roten Pulpa. (Vergleich 3.3.2. und 3.3.3.)	Perifollikulär mit zunehmender Dichte in Richtung Epithel sowie innerhalb des Epithels und um HEVs. (Vergleich 3.4.1.)
mBCs	Als humane MZ zwischen FM und roter Pulpa sowie vereinzelt im FM. (Vergleich 3.3.2. und 3.3.3.)	Perifollikuläres, teils unterbrochenes Areal mit Zunahme der Zelldichte in Richtung Epithel sowie vereinzelt im FM. (Vergleich 3.4.2. und 3.4.3)
PCs	Keine oder vereinzelt im GC.	In der SE vor allem als Cluster oder Band sowie eher vereinzelt in der IF. (Vergleich 3.4.2.)
MadCAM-1	Durchgängig exprimiert im zentralen MZ-Bereich sowie der follikelnahen PALS-Oberfläche. (Vergleich 3.5.)	Kein Nachweis

Tabelle 3 Übersicht der Lymphozytenverteilung im Menschen: weiße Milzpulpa versus Tonsilla palatina

4 DISKUSSION

Die Histologie ist eine essentielle Methode zur Erforschung des Immunsystems, da sich dessen physiologische sowie pathologische Prozesse in der strukturellen Zusammensetzung der einzelnen Gewebe eines Organismus widerspiegeln.

Die strukturelle Besonderheit der in der vorliegenden Arbeit histologisch untersuchten Gewebeschnitte humaner Milzen und Tonsillae palatinae besteht, wie aller SLOs, in deren dynamisch wechselnder Lymphozytenzusammensetzung innerhalb ihres ortsständigen retikulären Bindegewebes. In diese Dynamik lymphatischer Gewebe inbegriffen sind die bisher unzureichend verstandenen mBCs.

Da die Mehrzahl der histologischen Studien humaner Milzen und Tonsillae palatinae auf konventionell lichtmikroskopisch untersuchten Paraffinpräparaten basiert, lag das Ziel der vorliegenden Arbeit in der methodischen Erweiterung und Verbesserung dieser Untersuchungen durch die Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten. Hierdurch konnten erstmals mBCs auf einem einzelnen Gewebeschnitt lokalisiert und weiter charakterisiert werden.

Es gelang zunächst, die Erkenntnisse aus Paraffinschnitten über die humane weiße Milzpulpa zu reproduzieren. Darüber hinaus konnten detaillierte Untersuchungen über die Verteilung der mBC-Subpopulationen ergänzt sowie erstmalig, durch die Etablierung einer funktionierenden CD27-Histologiefluoreszenzfärbung in der Tonsilla palatina, in dieser die histologische Verteilung von CD27⁺ mBCs beschrieben werden.

4.1 Die Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen als innovative Ergänzung histologischer mBC-Lokalisationsstudien

In der histologischen Praxis mit humanem Gewebe, sowohl im Rahmen der Forschung als auch der medizinischen Interventionen, bildet aktuell die Lichtmikroskopie die Basis solider Abbildungen mit Auflösungen im Mikrometerbereich. Die Funktionen einzelner Zellorganellen und des ultrastrukturellen Gewebeverbands können durch elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Auflösungen im Nanometerbereich ergänzt werden.

Für die Untersuchungen wenig mineralisierter Gewebe, wie der SLOs, werden aktuell, sowohl für die konventionelle Lichtmikroskopie als auch für lichtmikroskopische Spezialverfahren, Paraffin- oder Gefrierschnitte verwendet.

Der für die vorliegende Arbeit gewählte methodische Ansatz für die Etablierung immunhistochemischer Färbungen basiert auf Kombinationen durchflusszytometrisch verwendeter fluoreszenzmarkierter Antikörper unter Nutzung von Haptensystemen. Der limitierende methodische Nachteil in der Anfertigung von Paraffinschnitten liegt in der Notwendigkeit der initialen Formalinfixierung. Durch die leichte Proteinendenaturierung bleiben Enzymaktivitäten sowie Antigeneigenschaften im Vergleich zu Gefrierschnitten weniger gut erhalten, sodass

die Anfertigung unfixierter Gefrierschnitte als geeignetes Verfahren der Gewebeaufbereitung gewählt wurde.

Für detaillierte morphologische Untersuchungen mit der Notwendigkeit bester Strukturfixierung und Haltbarkeit wäre hingegen die Einbettung in Paraffin zu bevorzugen, da diese den Gewebeverband schützt, wenngleich durch die Extraktion von Lipiden und nicht mit Proteinen assoziierten Kohlenhydraten keine gänzlich native Morphologie wiedergegeben werden kann.

Den etablierten immunhistochemischen Multifluoreszenzfärbungen können im Rahmen der histologischen mBC-Lokalisationsstudien in humanen SLOs folgende methodische Vorteile zugeschrieben werden:

- *Die simultane jedoch separate digitale Information mehrerer Fluoreszenzsignale am LSM.*

Die histologischen Studien an humanen Milzen und Tonsillae palatinae werden nachwievor durch konventionell lichtmikroskopisch ausgewertete Paraffinschnitte dominiert, auf denen routinemäßig zwei sich überlagernde Färbungen eingesetzt werden. Zur Untersuchung von Koexpressionen eines Areals müssen serielle Schnitte zur indirekten Analyse angefertigt werden, da die Überlagerung der beiden Färbungen in doppelpositiven Arealen kein genaues Bild der Markerverteilung der einzelnen Zellen erzeugt. Durch die hier etablierte methodische Ergänzung fünffach fluoreszenter LSM-Aufnahmen als separate digitale Information konnten Koexpressionen in der vorliegenden Arbeit, unabhängig von seriellen Schnitten, direkt analysiert und dadurch das Wissen um die mBC-Verteilung dieser beiden SLOs erweitert werden.

- *Die entfallende Spezieslimitation in der Detektion durch die parallele Verwendung mehrerer Mausantikörper.*

Gefrierschnittfärbungen mit der Verwendung von zwei bis drei Fluoreszenzkanälen beruhen in der Regel auf der Kombination speziesspezifischer Antikörper. Durch die Anwendung des Haptensystems konnten Färbungen mit der parallelen Verwendung mehrerer Mausantikörper etabliert werden. Neben dem Gewinn von theoretisch allen möglichen Antikörper-Kombinationsvarianten durch die Verfügbarkeit individuell variabler Konjugate werden auf diese Weise Kreuzreaktivitätsprobleme, die in Verbindung der Nutzung mehrerer speziesspezifischer Antikörper stehen, völlig umgangen.

- *Die Möglichkeit der Visualisierung durchflusszytometrisch erhobener Daten.*

Das zur Etablierung verwendete Haptensystem erlaubt die simultane Verwendung des breiten Spektrums konjugierter zumeist Mausantikörper auf einem einzelnen Gewebeschnitt, wie sie ebenfalls in der Durchflusszytometrie genutzt werden. Dies bietet die optimale Möglichkeit für direkte visuelle Vergleiche zu durchflusszytometrisch erhobenen Daten.

Zu beachten ist hierbei, dass diese Visualisierung vorrangig der Lokalisierung und vergleichenden Abschätzung über die Dichte von Populationen dient, jedoch nicht für detaillierte

Analysen prozentualer Verteilungen von Zellpopulationen genutzt werden kann, da diese aufgrund der fehlenden dreidimensionalen Information keine realen Verhältnisse wiedergeben. In Einberechnung der Tiefe, für die jedoch das grundlegende Volumen unbekannt ist, ergäbe sich im Beispiel eines Follikels für Oberflächenvolumina ein mathematisch höherer Wert. In der Darstellung des manuell ausgezählten tonsillären mBC-Areals in Abbildung 14 würden superfiziell angeordnete Zellpopulationen somit einen höheren prozentualen Anteil einnehmen, weil davon auszugehen ist, dass diese das GC und den FM des Sekundärfollikels im gesamten ummanteln. Da die Follikelformen differieren, kann unter Nutzung dieser zweidimensionalen histologischen Methode kein mathematischer Ausgleichsfaktor bestimmt werden.

4.2 Die histologische mBC-Lokalisation in den humanen SLOs: organspezifische mBC-Kompartimente versus follikelassoziierte mBC-Areale

Mithilfe der etablierten Methode der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung humaner CD27⁺CD20⁺Ki67⁻ mBCs in Bezug auf die Sekundärfollikel in Milzen sowie in Tonsillae palatinae, als Teil des MALT, untersucht und miteinander verglichen. Als Gemeinsamkeit dieser beiden SLOs konnte dabei der prädominierende mBC-Anteil als unklar begrenztes follikelassoziiertes Kompartiment nachgewiesen werden.

Die SE Regionen der MALT-Gewebe und die innere Wand des subkapsulären Sinus in Lymphknoten werden im Menschen seit langem als MZ-Äquivalente angesehen, sind jedoch bisher nur wenig verstanden.^{74,80} Entgegen der Betrachtung der humanen MZ als organspezifisches Kompartiment, vergleichbar mit dem der Nagetiere, könnte ein generell superfiziell follikulär angeordnetes mBC-Areal existieren. Dessen strukturelle Variabilität differieren, jedoch universelle Eigenschaften, inklusive der rezirkulierenden mBCs, teilen. Die Überlegungen für ein obligates follikelassoziierte mBC-Areal werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

4.2.1 Die mBC-Lokalisation in den untersuchten humanen Milzen und Tonsillae palatinae

Für die Lokalisationsstudien in der vorliegenden Arbeit wurden mBCs als Ki67⁻ ruhende CD20⁺ B-Zellen definiert, die zudem das CD27 Antigen als bekannten mBC Marker exprimieren.

Eine detaillierte Untersuchung über die histologische Verteilung von humanen CD27⁺ B-Zellen in Milzfollikeln wurde durch die Arbeitsgruppe Steiniger⁸¹ publiziert. Mithilfe von Subtraktionsfärbungen eines anti-CD27 und anti-CD3 Markers auf Paraffinschnitten wurde die Lokalisation von CD27⁺CD3⁻ mBCs beginnend im FM mit Zunahme in Richtung perifollikulärer Zone beschrieben. In Übereinstimmung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellt sich die höchste Dichte dieser CD27⁺ mBCs dabei als symmetrischer Saum um die Sekundärfollikel dar, welcher in der Literatur als humane MZ bezeichnet wird.

CD27⁺CD3⁻ B-Zellen an der folliculären Oberfläche konnten in dieser Studie ebenfalls in humanen Gewebeproben aus Lymphknoten, Appendizes und Follikeln des terminalen Ileum mit zunehmender Dichte in Richtung Epithel nachgewiesen werden. In der Anwendung auf Gewebeproben aus Tonsillae palatinae gelang es unter Verwendung der Subtraktionsfärbung jedoch nicht, ein eindeutig CD27⁺CD3⁻ perifolliculäres Areal zu definieren.

In Übereinstimmung der Ergebnisse der Arbeitsgruppe Steiniger konnten in den Auswertungen der untersuchten humanen Milzen die als CD27⁺CD3⁻ definierten mBCs erstmals direkt, durch die direkte Analyse von Koexpression, als CD27⁺CD20⁺Ki67⁻ Population mit zunehmender Dichte in Richtung folliculärer Oberfläche detektiert werden.

Dieser methodische Vorteil konnte in der Anwendung auf Gefrierschnitten aus Gewebeproben von Tonsillae palatinae genutzt werden, in denen CD27⁺CD20⁺Ki67⁻ mBC, wie in der Milz, vereinzelt im FM sowie den FM als umgebendes Areal nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zur Milz ist war dieses Areal jedoch stets asymmetrisch mit Verbreiterung in Richtung Epithel, ähnlich der nachgewiesenen Areale in Lymphknoten, Appendizes und Follikeln des terminalen Ileum. In den Subtraktionsfärbungen auf Paraffinschnitten wurde der epithelferne vergleichsweise dünne CD27⁺ mBC-Saum womöglich durch die CD3-Färbung aufgrund der hohen T-Zelldichte überlagert.

Ob die Asymmetrie mit Ausdehnung in Richtung Epithel und die Inkontinuität dieses nachgewiesenen tonsillären CD27⁺ mBC-Areals gegenüber dem kontinuierlichen symmetrischen CD27⁺ mBC-Areal der Milz als Korrelat einer organspezifischen mBC-Organisation, als schlichte Konsequenz des die weiße Milzpulpa umgebenden Blutstromes oder als Folge des immunologischen und folliculären Status zu begründen ist, bleibt weiterhin aufzuklären.

Die Existenz einer humanen MZ-Zelllinie wird kontrovers diskutiert.^{80,82,1} Die humanen mBCs der Milz sind einerseits, wie die MZ-B-Zellen der Maus, in der peripheren Follikeloberfläche lokalisiert und in der Lage in T-Zellunabhängigen Immunantworten Antikörper gegen mikrobielle Polysaccharide zu produzieren.⁸⁰ Andererseits unterscheiden sich murine MZ-B-Zellen maßgeblich durch ihre unmutierten B-Zell-Rezeptoren, ihre Sessilität und ihre fehlende Expression von CD27 und Gedächtniseigenschaften. Jedoch wird CD27 auf den mBCs in Mäusen und wahrscheinlich ebenfalls in Ratten generell nicht exprimiert.⁸³

4.2.2 Die humane MZ als Variante eines superfiziell folliculären SLO-Areals

Das an der folliculären Oberfläche der weißen Milzpulpa von Mäusen und Ratten nachweisbare B-Zellareal wird als MZ bezeichnet und als organspezifisches Kompartiment betrachtet, da in ihren extrasplenischen lymphatischen Organen bisher keine B-Zellen dieses Phänotyps nachgewiesen wurden.^{53,80} Die MZ-B-Zellen werden daher als vornehmlich sesshafte Population angesehen, wenngleich darauf hingewiesen wurde, dass diese zumindest von der MZ in den Follikel migrieren können.^{54,84}

In Analysen mikrodissasierter B-Zellen der außerhalb des FM gelegenen Oberfläche humaner

Follikel in Milzen,⁸⁵ Peyer-Plaques⁸⁶ und Lymphknoten⁸⁷ wurde hingegen festgestellt, dass hier, als Gemeinsamkeit dieser SLOs, eine Mischung von B-Zellpopulationen nachgewiesen werden kann, die sich phänotypische Eigenschaften mit Hypermutation der variablen Ig-Genbereiche teilen und eine Exklusivität dieser Zellen für die humane Milz ausschließen. Die Annahme eines obligat follikelassoziierten mBC-Areals würde die systemische Rezirkulation der humanen MZ-mBCs einbeziehen.

Für die humane weiße Milzpulpa wird der Term ‚MZ‘ in der Literatur jedoch weiterhin übernommen und bezieht sich auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchte mBC-Akkumulation, die zwischen dem FM und der, in Nagetieren nicht ausgebildeten, perifollikulären Zone nachgewiesen werden kann.

Basierend auf den vorliegenden Untersuchungen wird die Hypothese vertreten, dass ein mit Nagetieren vergleichbares organspezifisches MZ-Kompartiment im Menschen nicht existiert. Dies wird durch folgende Beobachtungen begründet:

- *Die humane MZ der Milz als unklar begrenztes Areal.*

Die Begrenzung der MZ in den untersuchten humanen Milzen ließ sich mit der angewandten Methode, wie auch in Paraffinschnitten der Arbeitsgruppe Steiniger, nicht eindeutig definieren. Die $CD20^+CD27^+Ki67^-$ mBCs sowie die $CD20^+CD27^-Ki67^-$ naiven B-Zellen waren in unterschiedlichem Verhältnis sowohl im FM als auch in der MZ nachweisbar, wobei diese beiden Areale ohne klare Grenze ineinander übergingen. In Mäusen und Ratten bildet hier der marginale Sinus eine eindeutige Trennung zwischen zwei unterschiedlichen B-Zellpopulationen. In den immunfluoreszenten Abbildungen von $CD27^+$ Zellen auf Paraffinschnitten humaner Milzen anderer Arbeiten^{88,89} lässt sich ebenfalls erkennen, dass die Oberfläche humaner Milzfollikel aus einer Mischung von IgD^+ und $IgD^{+/-}$ B-Zellen sowie $CD27^+$ B- und T-Zellen zusammengesetzt sind, ohne dass eine eindeutige Trennung zwischen dem in der Literatur als IgD^+ FM und der von den Autoren als $CD27^+$ definierte MZ vorgenommen werden kann.

- *Die follikuläre Assoziation der humanen MZ-mBCs.*

In Mäusen und Ratten bilden die MZ-B-Zellen ein eigenständiges Kompartiment, welches den gesamten Komplex der weißen Pulpa, bestehend aus Follikel und PALS, umgibt.

In den Untersuchungen der humanen Milzgewebeproben waren die $CD20^+CD27^+Ki67^-$ mBCs hauptsächlich follikulär lokalisiert, an der Oberfläche der PALS Region hingegen kaum detektierbar. Hier ließen sich stattdessen $IgM^+IgD^+CD20^+CD27^-$ naive B-Zellen nachweisen, die auch am Übergang zur perifollikulären Zone lokalisiert waren.

Dies könnte darüber hinaus ein Hinweis sein, dass humane $CD27^-$ naive B-Zellen und $CD27^+$ mBCs unterschiedliche Migrationswege in die Milz nutzen.¹ Die naiven B-Zellen könnten bevorzugt über das offene System der Arteriolen der roten Pulpa und mBCs über die MZ immigrieren, wobei die in den zentralen Bereichen der humanen MZ nachgewiesenen Myofibroblasten eine Rolle spielen könnten,⁸⁹ welche darüber hinaus das Fehlen der Peri-MZ naiven

B-Zellen in der Tonsilla palatina erklären könnte. Detaillierte Untersuchungen zur Rezirkulation humaner Lymphozyten in die Milz, sowie durch andere lymphatische Organe, fehlen bisher.¹

- *Die MZ-Äquivalente der humanen SLOs.*

In humanen Gewebeproben aus Lymphknoten, Appendizes und Follikeln des terminalen Ileum wurden mBCs bereits als perifollikuläres follikelassoziertes Areal beschrieben⁸¹ und konnten in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erstmals ebenfalls für die Tonsilla palatina nachgewiesen werden, sodass von einer generellen Anordnung auszugehen ist. Wie zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt, wurden Gemeinsamkeiten in der zellulären Zusammensetzung dieser MZ-Äquivalente für den Menschen, jedoch nicht in Nagetieren, nachgewiesen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass in Nagetieren teilweise ganze lymphatische Organe wie Tonsillen und Appendix nicht vergleichbar ausgebildet sind und Unterschiede in der Funktion der MZ und die Existenz von MZ-Äquivalenten somit denkbar sind.

Bereits in einer frühen Publikation von Van den Oord et al.⁹⁰ wurde das Problem der Bezeichnung des oberflächlichen Follikelareals humaner Milzen deutlich und ein mit Lymphknoten vergleichbares SLO-Kompartiment mit dynamisch schwankendem Anteil aktivierter B-Zellen angenommen, der mehr oder weniger stark mit dem FM verbunden ist.

Auf die Problematik der Benennung der Region an der Oberfläche humaner Milzfollikel wurde kürzlich erneut durch Steiniger¹ hingewiesen und der Vorschlag zur Bezeichnung als superfizielle Zone eingeräumt.

4.2.3 Die Differenzen in den Sekundärfollikelstadien der humanen Milz und Tonsilla palatina als Korrelat ihres Antigenangebots

Neben der Gemeinsamkeit humaner mBCs als follikulär superfiziell angeordnetes Areal, wurden jedoch Unterschiede in Form und Ausprägung nachgewiesen. Das mBC-Areal stellte sich um die symmetrischen GCs der untersuchten Milzen ohne erkennbare ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone als breiter ebenfalls symmetrischer Saum dar. Um die ausgeprägten asymmetrischen Sekundärfollikel der untersuchten Tonsillae palatinae konnte ein vergleichsweiser dünner Saum mit Unterbrechungen und Verbreiterung in Richtung Epithel nachgewiesen werden.

Ein interessanter Aspekt der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen histologischen Studie von CD27⁺ B-Zellen durch Steiniger et al.⁸¹ ist der Befund der Traumamilz eines 6-jährigen Kindes mit ausgeprägten asymmetrischen Sekundärfollikeln und nachweisbarer ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone. Hier wurde das superfizielle CD27⁺ Follikelareal als asymmetrisch mit Verbreiterung in zunehmender Entfernung von der PALS beschrieben, was den Untersuchungen ausgeprägter tonsillärer Sekundärfollikel der vorliegenden Arbeit entspricht.

In den Überlegungen ist zu beachten, dass es sich bei der Entnahmeindikation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SLO-Gewebe um unterschiedliche immunologische Situationen handelte. Die Tonsillae palatinae wurden infolge chronisch rezidivierender Entzündungen

entnommen, was als Ursache der ausgeprägten B-Zellreaktionen mit großen Sekundärfollikeln nicht ausgeschlossen werden kann. Die in die Auswertung einbezogenen Milzen waren hingegen primär nicht von immunologisch assoziierten Krankheitsbildern beeinflusst. Die nachgewiesenen Sekundärfollikel waren möglicherweise daher kleiner, meist ohne erkennbare ‚dark‘ Zone sowie ‚light‘ Zone und in verhältnismäßig wesentlich größeren Abständen ausgebildet. Tonsillen stehen darüber hinaus in ständigem direktem Antigenkontakt aus der Umwelt, die Milz erfährt diesen ausschließlich über das Blut.

Die Unterschiede in der Ausprägung und zellulären Zusammensetzung des perifollikulären mBC-Saums der beiden SLOs könnten sich folglich durch an das Antigenangebot und den immunologischen Status angepasste Follikelstadien begründen lassen. Interessant wäre die Untersuchung von weiteren Kindermilzen, in denen B-Zellreaktionen mit ausgeprägten Sekundärfollikeln zu erwarten sind, sowie allgemein die Milz und Tonsillae palatinae aus demselben Spender.

Steiniger et al.⁸¹ konnten in ihren Studien humaner Milzen drei wesentliche Follikelstadien oder follikuläre Erscheinungsformen auf Paraffinschnitten unterscheiden:

I Primärfollikel oder Follikel ohne GC

II Sekundärfollikel mit ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone

III Sekundärfollikel mit degenerierendem GC

I Primärfollikel oder Follikel ohne GC

Follikel ohne GC und ohne Hinweise, dass es sich um dezentrale Follikelanschnitte handelt wurden in diesen Studien als gemischte B-Zellpopulation identifiziert. Diese setzt sich zusammen aus kleineren CD27⁻ B-Zellen, die sich vornehmlich im Follikelkern konzentrieren, und größeren CD27⁺ B-Zellen, die in ihrer Anzahl, wie in Sekundärfollikeln, in Richtung rote Pulpa zunehmen.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden diese Follikel nicht in die Auswertungen einbezogenen, konnten jedoch innerhalb der Etablierungsstudien vermehrt in Milzen von ITP-Patienten beobachtet werden. Da einige dieser Milzen ausschließlich Follikel ohne erkennbares GC beinhalteten, wurde die Möglichkeit der Erklärung durch die Schnittebene als unwahrscheinlich erachtet. In den orientierenden Untersuchungen der Etablierungsstudien der vorliegenden Arbeit konnten in diesen Follikeln, in Übereinstimmung mit dem Nachweis von CD27⁺CD3⁻ mBCs auf Paraffinschnitten, IgA⁺ und IgG⁺ B-Zellen detektiert werden (unpublizierte Daten).

Erwähnenswert ist diesem Zusammenhang, dass in Studien zum FDC-Netzwerk auf Paraffinschnitten der Milz⁷⁶ in solchen primärfollikulären B-Zellakkumulationen FDCs nachgewiesen werden konnten, die darauf hinweisen, dass ein GC präsent gewesen sein muss. In diesen Follikeln fand sich darüber hinaus homogenes hyalines extrazelluläres Material, welches als amyloid- oder fibrinoidartiges Material aus Igs oder anderen proteinösen Zellrückständen ver-

mutet wurde. In den Etablierungsstudien der vorliegenden Arbeit konnte in den Milzfollikeln ohne GC ebenfalls extrazelluläres Material nachgewiesen werden. In der Literatur findet sich bisher jedoch keine weitere Erwähnung.

In den untersuchten Tonsillae palatinae konnten hingegen keine B-Zellakkumulationen ohne GC, die nicht durch einen dezentralen Anschnitt bedingt erscheinen, nachgewiesen werden, weshalb vermutlich ebenfalls kein plaqueartiges Material detektiert werden konnte. Es konnten jedoch große zerfallende GCs beobachtet werden, in deren Zentren die Struktur gänzlich aufgehoben war.

Durch das im Vergleich zur Milz übermäßige Angebot an Antigenen, könnte es aufgrund der oligoklonalen Entwicklung von GCs,²³ das heißt der beschränkten Menge verschiedener B-Zellen, die bei der Hypermutation ihres Igs unterstützt werden, erforderlich sein, dass sich alte GCs in Tonsillen in einem ständigen wesentlich schnelleren Wechsel mit neuen GCs befinden als in der Milz. Bekannt ist bisher, dass hohe Antigendosen zur Apoptose der GC-B-Zellen führen können.⁹¹ FDCs bilden das Gerüst der GCs und binden auf ihrer Oberfläche für sehr lange Zeit Immunkomplexe, die so vor ihrem Abbau geschützt sind. Ob die Apoptose der FDCs, hier die einzige Möglichkeit darstellt, um Immunkomplexe schnell auszutauschen und an wechselnde Antigene anzupassen, wohingegen sich diese in der Milz noch für längere Zeit ablagern, ist bisher nicht näher untersucht.

II Sekundärfollikel mit ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone

Im Gegensatz zu Kindermilzen ist das ausgeprägte Sekundärfollikelstadium in Erwachsenenmilzen im Allgemeinen kaum detektierbar. Das polarisierte GC mit ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone ist von einem asymmetrischen vornehmlich CD27⁻ FM umgeben, der ohne erkennbare Grenze in das vorwiegend CD27⁺ Areal übergeht. In den untersuchten Tonsillen handelte es sich hierbei um das dominierende Follikelstadium.

III Sekundärfollikel mit degenerierendem GC

Die Sekundärfollikel mit degenerierendem GC stellen das typische Stadium humaner Milzen im Erwachsenenalter dar.⁵⁶ Sie sind durch ein degeneriertes GC mit verllorener ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone gekennzeichnet, dessen schmalerer symmetrischer CD27⁻ FM von einem breiteren CD27⁺ oberflächlichem Follikelareal umgeben ist, wobei sich dieses als teilweise einheitliches CD27⁺ Kompartiment darstellen kann. Letzteres Bild konnte jedoch in den untersuchten Milzen nicht dargestellt werden.

Auffällig in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war, dass die interindividuellen Unterschiede deutlich waren, sich jedoch die intraindividuellen Follikel scheinbar alle in einem ähnlichen Status befanden. Möglicherweise können in Abhängigkeit des lokalen Antigenangebots und immunologischen Status die Follikel in unterschiedlichen Status persistieren und in Anpassung an einen Wechsel dieses Antigenangebots reaktiviert oder ausgetauscht werden. Ob diese Follikelformationen periodisch nacheinander verlaufen oder sich abhängig vom Antigenangebot Stadium II und III abwechseln können, lässt sich für den Menschen nicht

überprüfen, da dies mehrfache Probenentnahmen des gleichen Individuums erfordern würde. Die Rückbildung von Keimzentren ist bisher jedoch auch in Nagetieren nicht langfristig untersucht. In Ratten und Mäusen ist bekannt, dass drei bis vier Tage nach intravenöser Injektion T-Zellabhängiger Antigene einheitlich strukturierte GCs entstehen, die im Verlauf die ‚dark‘ Zone und ‚light‘ Zone ausbilden. Bei einmaliger Antigengabe dauert diese GC-Reaktion etwa drei Wochen,²⁰ wobei sich die Zoneneinteilung in deren Spätphase bereits nach zwei Wochen aufhebt. In Untersuchungen der zentralen Bereiche von Milzfollikeln der Ratte fanden sich jedoch auch sieben Wochen nach Antigengabe antigenspezifische B-Zellblasten.⁹²

Wie sich diese involutierten GC-Reste anschließend weiterentwickeln und ob sie für längere Zeit persistieren und reaktiviert werden können, bleibt aufzuklären. Darüber hinaus werden Experimente an Versuchstieren meist mit an Carrier gekoppelten Haptene oder Schaferythrozyten durchgeführt, was neben den vielen Vorteilen jedoch die reale Infektionen nur bedingt widerspiegelt. Bisher ebenfalls nicht geklärt ist, ob die GC-Kinetik durch die unterschiedlichen Ansprüche der jeweiligen SLOs unterschiedliche Geschwindigkeiten entwickeln.

4.2.4 Die Differenzen der ‚pre-switch‘ zu ‚post-switch‘ mBC-Verteilung in der humanen Milz und Tonsilla palatina und die Bedeutung der humanen MZ

Mithilfe der in der vorliegenden Arbeit etablierten Multifluoreszenzfärbungen war es erstmals möglich, die Verteilung der vier prädominierenden B-Zell-Rezeptorisotypen IgM, IgD, IgA und IgG als simultane Aufnahme einzelner Gefrierschnitte zu untersuchen, wobei folgende Muster nachgewiesen werden konnten:

- *Die humane MZ mit zum GC-gerichteten ‚pre-switch‘ mBCs und zur roten Pulpa gerichteten ‚post-switch‘ mBCs*

In Übereinstimmung zweier nicht näher kommentierter serieller Gefrierschnitte eines humanen Milzfollikels von Columbo et al.⁹³, konnte die humane MZ als heterogen zusammengesetzte B-Zellzone mit oberflächenexprimiertem IgM⁺IgD^{+/-} sowie ansatzweise IgA⁺ und IgG⁺ nachgewiesen werden. In der Auswertung aller untersuchten Sekundärfollikel konnte darüber hinaus die Tendenz der Lokalisation von IgM⁺IgD^{+/-} ‚pre-switch‘ mBCs im GC-gerichteten inneren Teil der MZ und der Zunahme der IgA⁺ sowie IgG⁺ ‚post-switch‘ mBC-Dichte im zur roten Pulpa gerichteten äußeren Teil beobachtet werden. Dieser Befund ist mit der auf seriellen Paraffinschnitten durch IgD- und IgM-Färbungen nachgewiesenen Untergliederungsmöglichkeit der humanen MZ, in einen inneren IgM⁺IgD^{+/-} und äußeren heterogenen IgM⁺IgD^{+/-} sowie IgM⁻IgD⁻ Bereich,¹ vereinbar.

- *Die perifollikuläre mBC-Akkumulation der humanen Tonsilla palatina als heterogenes ‚pre-switch‘-, ‚post-switch‘-Areal*

Für die humane Tonsilla palatina liegen bisher keine Studien über die histologische Verteilung

der auf mBCs exprimierten Ig-Isotypen vor. In manuellen Auszählungen schien die Dichte der ‚post-switch‘ mBCs mit zunehmendem Abstand vom GC die Dichte der ‚pre-switch‘ mBCs, wie in der Milz, zu überwiegen, wengleich kein sichtbares GC-gerichtetes ‚pre-switch‘ mBC-Areal nachgewiesen werden konnte und IgM^+IgD^+ mBCs einen im Vergleich zur Milz geringeren Anteil einzunehmen schienen.

Eine verhältnismäßige Anreicherung von ‚post-switch‘ mBCs in den Tonsillae palatinae könnte aus deren Funktion als Teil des MALT resultieren, durch welches sämtliche in Kontakt zur Umwelt liegende Schleimhautepithelien und exokrine Drüsen von einer Schicht antimikrobieller IgA-Antikörper überzogen sind.¹¹ Wie bereits erwähnt, waren die Sekundärfollikelstadien der untersuchten Tonsillae palatinae sowie der Milzen, möglicherweise aufgrund des immunologischen Status bei deren Entnahme, nicht identisch, sodass das physiologische ‚pre-switch‘-, ‚post-switch‘ mBC-Verhältnis abweichen könnte.

Durchflusszytometrische Untersuchungen über die Ig-Verteilung auf humanen mBCs liegen für Milzen und Tonsillae palatinae bereits vor.⁴⁰ Ein interessanter Unterschied der beiden SLOs konnte in dieser Studie bezogen auf das ‚pre-switch‘-, ‚post-switch‘ mBC-Verhältnis nachgewiesen werden. In der Milz nahmen die IgM^+IgD^+ ‚pre-switch‘ mBCs fast den halben Anteil aller mBCs ein, wohingegen diese in der Tonsilla palatina mit einem Viertel vergleichsweise reduziert nachgewiesen wurden. Diese Daten sind mit der histologischen Auswertung insofern gut vereinbar, als dass in der Milz gegenüber der Tonsilla palatina ein, im Verhältnis zum Gesamt-mBC-Kompartiment, größeres Areal von $\text{IgM}^+\text{IgD}^{+/-}$ ‚pre-switch‘ mBCs beobachtet werden konnte.

Durchflusszytometrische Untersuchungen über die darüber hinaus nachgewiesene variable Expression von IgD auf diesen vermehrten $\text{IgM}^+\text{IgD}^{+/-}\text{CD27}^+$ mBCs humaner Milzen liegen jedoch nicht vor. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen auf Paraffinschnitten überein,⁸¹ weshalb Artefakte als unwahrscheinlich erachtet wurden.

Im Blut wurden bereits zwei IgM^+ mBC-Populationen beschrieben, die sich über ihre unterschiedliche IgD-Expression voneinander abgrenzen. Diese $\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ ‚IgM-only‘ mBCs nehmen einen Anteil von zirka 15% der gesamten mBCs im Blut ein,³¹ wurden in der Milz jedoch nur als zirka 3% Anteil der mBC-Population beschrieben.⁸²

Die Ursache könnte in der Existenz zweier unterschiedlicher IgM^+IgD^+ mBC-Populationen zu suchen sein, die sich aus GC-unabhängigen MZ-B-Zellen und klassischen post-GC ‚pre-switch‘ mBCs zusammensetzten. Dies würde die Vielseitigkeit humaner MZ-B-Zellen erklären, denen sowohl T-Zellabhängige als auch T-Zellunabhängige Immunantworten zugeschrieben werden und begründen weshalb ein Teil dieser Zellen post-GC-Mutationen tragen.⁸⁰

Die Rolle der humanen MZ

Die Rolle der humanen MZ für die $\text{IgM}^+\text{IgD}^{+/-}\text{CD27}^+$ MZ-B-Zellen im Blut ist bisher nicht gänzlich verstanden. Klein et al.³¹ konnten zeigen, dass MZ-mBCs und systemische IgM^+IgD^+

mBC eine vergleichbare Anhäufung somatischer Hypermutationen aufweisen und schlussfolgerten dass die im Blut präsenten IgM⁺IgD⁺ mBCs zirkulierende MZ-B-Zellen sind. Weiterhin weisen Menschen mit kongenitaler Asplenie oder chirurgischer Splenektomie durch die beeinträchtigte Produktion der MZ-B-Zellen von IgM- und IgG-Antikörpern gegen Polysaccharide ein höheres Risiko gegenüber Infektionen mit bekapselten Bakterien auf,^{94,95} wobei dies durch die Entfernung der roten Pulpa, als eines der größten phagozitierenden Kompartimente des menschlichen Körpers, ebenfalls begünstigt wird und das Fehlen der MZ nicht die einzige Ursache zu sein scheint. Darüber hinaus manifestieren sich diese MZ-B-Zelldefekte in Kindern weniger stark, sodass die Pathogenese post-splenektomierter Infektionen komplexer als nur MZ-abhängig zu sein scheint.⁹⁶ Studien in humanisierten Mäusen sowie humanen fetalen Geweben weisen darauf hin, dass die somatische Hypermutation der MZ-B-Zellen bereits in der fetalen Leber und mesenterialen Lymphknoten stattfindet,⁸⁰ wohingegen eine humane MZ in Feten noch nicht ausgebildet ist.⁵⁸ Humane CD27⁺ MZ-mBCs können im Blut zirka zwei Jahre postnatal nachgewiesen werden, obwohl GCs und mBCs bereits 4 Monate postnatal präsent sind.⁸⁹ Im Blut von Kindern mit kongenitaler Asplenie konnte eine normale MZ-B-Zellpopulation nachgewiesen werden, sodass vermutet werden kann, dass MZ-B-Zellvorläufer alternative Bereiche für deren Entwicklung kolonisieren können.⁹⁷ Interessant wäre hierbei die histologische und durchflusszytometrische Untersuchung der SLO-MZ-Äquivalente in Patienten mit kongenitaler Asplenie.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass verschiedene Pathologien des Gastrointestinaltraktes ebenfalls mit einer reduzierten Funktion der Milz und den IgM⁺ mBCs im Blut korreliert werden.^{98,99} Studien an Hasen indizieren, dass die Milz und das GALT funktionell zusammenhängen.¹⁰⁰ Vossenkämper et al.¹⁰¹ vermuten, dass die humanen MZ-B-Zellen von transitionalen B-Zellen, die im GALT aktiviert werden, abstammen. Diese werden in die MZ rekrutiert, weshalb sie mutiert und speziell gegen bakterielle Antigene gerichtet sind. Dass die humane MZ erst im zweiten Lebensjahr ausgebildet ist, würde sich dabei durch die postnatal erst langsam zunehmende mikrobielle Kolonisation der Darmmukosa erklären.

MAdCAM-1

In diesen Überlegungen ist zu beachten, dass das Expressionsmuster der Integrine auf den humanen mBCs und ihrer Liganden in den SLOs deutliche Unterschiede aufweisen. Ein Unterschied der mBCs in den beiden untersuchten SLOs besteht in der vermehrten Oberflächenexpression des Integrins β_7 in der Milz.⁴⁰ Sein Ligand MAdCAM-1, als bekanntes mukosaassoziiertes Adressin des GALT, ermöglicht das ‚Homing‘ β_7 exprimierender Lymphozyten und ist ebenfalls für die humane MZ jedoch nicht für die Tonsilla palatina beschrieben.¹⁰² Phylogenetisch entstammt die Milz der Darmwand,¹⁰³ sodass die gemeinsame Expression von MAdCAM-1 in den intestinalen lymphatischen Geweben nicht überrascht.

In den untersuchten Präparaten humaner Milzen konnte, in Übereinstimmung mit auf Paraffinschnitten nachgewiesenen MAdCAM-1⁺ Stromazellen,¹ die stärkste MAdCAM-1 Expression

in den zentralen Bereichen der MZ nachgewiesen werden, wobei dessen funktionelle Signifikanz dort bisher jedoch nicht aufgeklärt ist. Bezüglich der untersuchten mBCs-Subklassenverteilung konnten keine Besonderheiten in der Anordnung zu den MAdCAM-1⁺ Stromazellen nachgewiesen werden.

In der Milz von Mäusen,¹⁰⁴ jedoch nicht in Ratten,⁴⁸ kann MAdCAM-1 auf den endothelialen Zellen, die den marginalen Sinus begrenzen, ebenfalls nachgewiesen werden, wobei diesem Molekül hier eine entscheidende Rolle in der Strukturierung dieses marginalen Sinus zugeschrieben und eine migrationsbeschleunigende Komponente beigemessen wird,¹⁰⁵ wenngleich eine systemische Blockade mit anti-MAdCAM-1 Antikörpern in Mäusen die Lymphozytenmigration in die Milz, im Gegensatz zu den Peyer-Plaques, nicht zu unterbinden scheint.¹⁰⁴ In den thorakalen und pharyngealen MALT-Geweben, zu denen die untersuchten Tonsillae palatinae zählen, spielt das Integrin β_7 vermutlich weder eine Rolle für das mBC-Homing noch werden bei nasaler, im Gegensatz zu peroral enteraler, Immunisierung stark β_7 -exprimierende mBCs induziert,¹⁰⁶ was sich in der fehlenden Nachweisbarkeit von MAdCAM-1 in der humanen Tonsilla palatina widerspiegelt.

MAdCAM-1 könnte demnach ein entscheidendes Adhäsionsmolekül darstellen, welches die humane MZ als besonderes Rezirkulationskompartiment der aus dem GALT abstammenden mBCs fungieren lässt sowie deren reguläre ringförmige Anordnung erklärt.

4.3 Schlusswort und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse über die histologische mBC-Organisation in humanen Milzen und Tonsillae palatinae unterstützen den kürzlich durch Steiniger¹ publizierten Vorschlag der Bezeichnung der humanen MZ als superfizielle Zone und darüber hinaus die Verwendung dieses Terms ebenso für andere humane SLOs.

Weiterhin aufzuklären bleibt in diesem Zusammenhang ob die Asymmetrie mit Ausdehnung in Richtung Epithel und die Inkontinuität des nachgewiesenen tonsillären CD27⁺ mBC-Areals gegenüber dem kontinuierlichen symmetrischen CD27⁺ mBC-Areal der Milz als Folge des immunologischen und resultierenden follikulären Status zu begründen ist. Hierfür könnten zum einen langfristig Daten mit vergleichenden Untersuchungen unterschiedlicher Patientengruppen ergänzt werden, wie Milzen aus Sepsispatienten oder Kindermilzen, in denen B-Zellreaktionen mit ausgeprägten Sekundärfollikeln zu erwarten sind oder Tonsillae palatinae immunologisch gesunder Traumapatienten. Zum anderen müsste der Verlauf von GC-Reaktionen in Versuchstieren im Falle der Applikation mehrerer Antigene neu untersucht werden, um über die langfristigen Follikeldynamiken sowie ihre Determinanten und damit mögliche Ursachen der großen interindividuellen follikulären Status in den humanen Milzen im Vergleich zu den Tonsillae palatinae weiter aufzuklären. Interessant wären darüber hinaus detailliertere Untersuchungen über die mBC-Subklassenzusammensetzung in den humanen lymphatischen Geweben, wie der β_7 -exprimierenden mBCs, sowie ihrer Adhärenzmoleküle,

um der Frage nachzugehen, welche mBC-Subklassen zwischen den verschiedenen mukosaassoziierten lymphatischen Geweben und der Milz rezirkulieren und welche Bedeutung letzterer, insbesondere bezüglich der nachgewiesenen großen IgM⁺IgD^{+/-} mBC-Population, dabei zugeschrieben werden kann.

In den diesbezüglich künftigen Studien an Versuchstieren muss, neben den vielen Vorteilen, vorsichtiger mit terminologischen Gleichsetzungen umgegangen werden und generell immer bedacht werden, dass die makro- und mikroanatomischen Unterschiede der verschiedenen Spezies grundlegende funktionelle Differenzen ihrer Physiologien widerspiegeln könnten.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa
λ	Lambda
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
DIG	Digoxigenin
engl	englisch
FDC	follicular dendritic cell (follikuläre dendritische Zelle)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	follikulärer Mantel
GALT	gut-associated lymphatic tissue (Darmassoziertes lymphatisches Gewebe)
GC	germinal center (Keimzentrum)
HEV	hoch-endotheliale Venole
IF	interfollikuläre Region
Ig	Immunglobulin
IgM, IgD, IgA, IgG	Immunglobulin-Isotyp M, D, A, G
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAdCAM	mucosal addressin cell adhesion molecule (mukosales Adressin-Zelladhäsionsmolekül)
MALT	mucosa-associated lymphatic tissue (Mukosaassoziertes lymphatisches Gewebe)
mBC	memory B cell (Gedächtnis-B-Zelle)

MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mm	Millimeter
MZ	marginale Zone
NALT	nasal-associated lymphatic tissue (Nasenassoziiertes lymphatisches Gewebe)
PALS	periarterielle lymphatische Begleitscheide
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	plasma cell (Plasmazelle)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SE	subepitheliale Region
sek	Sekunde
SLO	sekundäres lymphatisches Organ
T_H-Zellen	T-Helfer-Zellen
TRITC	Tetramethylrhodamin

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Steiniger B. S. “Human spleen microanatomy: why mice do not suffice”. In: *Immunology* 145.3 (Juli 2015), S. 334–346. DOI: 10.1111/imm.12469.
- [2] Parkin J. und Cohen B. “An overview of the immune system”. In: *Lancet (London, England)* 357.9270 (2. Juni 2001), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
- [3] Shah D. K. und Zúñiga-Pflücker J. C. “An overview of the intrathymic intricacies of T cell development”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192.9 (1. Mai 2014), S. 4017–4023. DOI: 10.4049/jimmunol.1302259.
- [4] Zhang N. und Bevan M. J. “CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System”. In: *Immunity* 35.2 (26. Aug. 2011), S. 161–168. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.
- [5] Zhu J. und Paul W. E. “Heterogeneity and plasticity of T helper cells”. In: *Cell Research* 20.1 (Jan. 2010), S. 4–12. DOI: 10.1038/cr.2009.138.
- [6] Pieper K., Grimbacher B., und Eibel H. “B-cell biology and development”. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131.4 (1. Apr. 2013), S. 959–971. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
- [7] Lanzavecchia A. und Sallusto F. “Human B cell memory”. In: *Current Opinion in Immunology* 21.3 (Juni 2009), S. 298–304. DOI: 10.1016/j.coi.2009.05.019.
- [8] Kuijpers T. W., Bende R. J., Baars P. A., Grummels A., Derks I. A., Dolman K. M., Beaumont T., Tedder T. F., Noesel C. J. van, Eldering E., und Lier R. A. van. “CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses”. In: *Journal of Clinical Investigation* 120.1 (4. Jan. 2010), S. 214–222. DOI: 10.1172/JCI40231.
- [9] Stashenko P., Nadler L. M., Hardy R., und Schlossman S. F. “Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78.6 (Juni 1981), S. 3848–3852.
- [10] Medina F., Segundo C., Campos-Caro A., González-García I., und Brieva J. A. “The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression”. In: *Blood* 99.6 (15. März 2002), S. 2154–2161.
- [11] Brandtzaeg P. und Pabst R. “Let’s go mucosal: communication on slippery ground”. In: *Trends in Immunology* 25.11 (Nov. 2004), S. 570–577. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.005.
- [12] Pabst R. “[Lymphatic tissue of the nose (NALT) and larynx (LALT) in species comparison: human, rat, mouse]”. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64.7 (Juli 2010), S. 445–446. DOI: 10.1055/s-0030-1255509.
- [13] Debertain A. S., Tschernig T., Tönjes H., Kleemann W. J., Tröger H. D., und Pabst R. “Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children”. In: *Clinical and Experimental Immunology* 134.3 (Dez. 2003), S. 503–507.
- [14] Randall T. D. “Chapter 7 - Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT): Structure and Function”. In: *Advances in Immunology*. Hrsg. von Cerutti S. F. Ä. Bd. 107. Mucosal Immunity. Academic Press, 2010, S. 187–241.
- [15] Mueller S. N. und Ahmed R. “Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses”. In: *Immunological Reviews* 224.1 (1. Aug. 2008), S. 284–294. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00657.x.

- [16] Girard J.-P., Moussion C., und Förster R. “HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes”. In: *Nature Reviews. Immunology* 12.11 (Nov. 2012), S. 762–773. DOI: 10.1038/nri3298.
- [17] Hoshino H., Kobayashi M., Mitoma J., Sato Y., Fukuda M., und Nakayama J. “An Integrin *alpha4beta7*•IgG Heterodimeric Chimera Binds to MAdCAM-1 on High Endothelial Venules in Gut-Associated Lymphoid Tissue”. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59.6 (1. Juni 2011), S. 572–583. DOI: 10.1369/0022155411404416.
- [18] Toellner K.-M., Jenkinson W. E., Taylor D. R., Khan M., Sze D. M.-Y., Sansom D. M., Vinuesa C. G., und MacLennan I. C. M. “Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 195.3 (4. Feb. 2002), S. 383–389.
- [19] Toyama H., Okada S., Hatano M., Takahashi Y., Takeda N., Ichii H., Takemori T., Kuroda Y., und Tokuhisa T. “Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells”. In: *Immunity* 17.3 (Sep. 2002), S. 329–339.
- [20] MacLennan I. C. “Germinal centers”. In: *Annual Review of Immunology* 12 (1994), S. 117–139. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001001.
- [21] Rajewsky K. “Clonal selection and learning in the antibody system”. In: *Nature* 381.6585 (27. Juni 1996), S. 751–758. DOI: 10.1038/381751a0.
- [22] Kroese F. G., Timens W., und Nieuwenhuis P. “Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function”. In: *Current Topics in Pathology. Ergebnisse Der Pathologie* 84 (Pt 1) (1990), S. 103–148.
- [23] Kroese F. G., Wubbena A. S., Seijen H. G., und Nieuwenhuis P. “Germinal centers develop oligoclonally”. In: *European Journal of Immunology* 17.7 (Juli 1987), S. 1069–1072. DOI: 10.1002/eji.1830170726.
- [24] Zhang Y., Garcia-Ibanez L., und Toellner K.-M. “Regulation of germinal center B-cell differentiation”. In: *Immunological Reviews* 270.1 (1. März 2016), S. 8–19. DOI: 10.1111/imr.12396.
- [25] Manis J. P., Tian M., und Alt F. W. “Mechanism and control of class-switch recombination”. In: *Trends in Immunology* 23.1 (Jan. 2002), S. 31–39.
- [26] Black S. J., Loo W. van der, Loken M. R., und Herzenberg L. A. “Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 147.4 (1. Apr. 1978), S. 984–996.
- [27] Höfer T., Muehlinghaus G., Moser K., Yoshida T., E Mei H., Hebel K., Hauser A., Hoyer B., O Luger E., Dörner T., Manz R. A., Hiepe F., und Radbruch A. “Adaptation of humoral memory”. In: *Immunological Reviews* 211 (Juni 2006), S. 295–302. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00380.x.
- [28] Manz R. A., Arce S., Cassese G., Hauser A. E., Hiepe F., und Radbruch A. “Humoral immunity and long-lived plasma cells”. In: *Current Opinion in Immunology* 14.4 (Aug. 2002), S. 517–521.
- [29] Bernasconi N. L., Traggiai E., und Lanzavecchia A. “Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells”. In: *Science (New York, N.Y.)* 298.5601 (13. Dez. 2002), S. 2199–2202. DOI: 10.1126/science.1076071.
- [30] Yoshida T., Mei H., Dörner T., Hiepe F., Radbruch A., Fillatreau S., und Hoyer B. F. “Memory B and memory plasma cells”. In: *Immunological Reviews* 237.1 (1. Sep. 2010), S. 117–139. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x.

- [31] Klein U., Rajewsky K., und Küppers R. “Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 188.9 (2. Nov. 1998), S. 1679–1689.
- [32] Klein U., Küppers R., und Rajewsky K. “Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans”. In: *Blood* 89.4 (15. Feb. 1997), S. 1288–1298.
- [33] Liu Y. J., Bouteiller O. de, Arpin C., Brière F., Galibert L., Ho S., Martinez-Valdez H., Banchereau J., und Lebecque S. “Normal human IgD+IgM- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts”. In: *Immunity* 4.6 (Juni 1996), S. 603–613.
- [34] Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., und Komiyama A. “CD27: a memory B-cell marker”. In: *Immunology Today* 21.5 (Mai 2000), S. 204–206.
- [35] Agematsu K., Kobata T., Yang F. C., Nakazawa T., Fukushima K., Kitahara M., Mori T., Sugita K., Morimoto C., und Komiyama A. “CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis”. In: *European Journal of Immunology* 25.10 (Okt. 1995), S. 2825–2829. DOI: 10.1002/eji.1830251017.
- [36] Agematsu K. “Memory B cells and CD27”. In: *Histology and Histopathology* 15.2 (Apr. 2000), S. 573–576.
- [37] Wirths S. und Lanzavecchia A. “ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells”. In: *European Journal of Immunology* 35.12 (Dez. 2005), S. 3433–3441. DOI: 10.1002/eji.200535364.
- [38] Fecteau J. F., Côté G., und Néron S. “A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177.6 (15. Sep. 2006), S. 3728–3736.
- [39] Weston-Bell N., Townsend M., Di Genova G., Forconi F., und Sahota S. S. “Defining origins of malignant B cells: a new circulating normal human IgM+D+ B-cell subset lacking CD27 expression and displaying somatically mutated IGHV genes as a relevant memory population”. In: *Leukemia* 23.11 (24. Sep. 2009), S. 2075–2080. DOI: 10.1038/leu.2009.178.
- [40] Giesecke C., Frölich D., Reiter K., Mei H. E., Wirries I., Kuhly R., Killig M., Glatzer T., Stölzel K., Perka C., Lipsky P. E., und Dörner T. “Tissue Distribution and Dependence of Responsiveness of Human Antigen-Specific Memory B Cells”. In: *The Journal of Immunology* 192.7 (1. Apr. 2014), S. 3091–3100. DOI: 10.4049/jimmunol.1302783.
- [41] Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres R., Lamers M. C., und Carsetti R. “B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 190.1 (5. Juli 1999), S. 75–89.
- [42] Cesta M. F. “Normal structure, function, and histology of the spleen”. In: *Toxicologic Pathology* 34.5 (2006), S. 455–465. DOI: 10.1080/01926230600867743.
- [43] Di Sabatino A., Carsetti R., und Corazza G. R. “Post-splenectomy and hyposplenic states”. In: *The Lancet* 378.9785 (Juli 2011), S. 86–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61493-6.
- [44] Mebius R. E. und Kraal G. “Structure and function of the spleen”. In: *Nature Reviews. Immunology* 5.8 (Aug. 2005), S. 606–616. DOI: 10.1038/nri1669.
- [45] Kotzé H. F., Heyns A. D., Wessels P., Pieters H., Badenhorst P. N., und Lötter M. G. “Evidence that ¹¹¹In-labelled platelets pool in the spleen, but not in the liver of normal humans and baboons”. In: *Scandinavian Journal of Haematology* 37.3 (Sep. 1986), S. 259–264.

- [46] Laan A. M. van der, Ter Horst E. N., Delewi R., Begieneman M. P. V., Krijnen P. A. J., Hirsch A., Lavaei M., Nahrendorf M., Horrevoets A. J., Niessen H. W. M., und Piek J. J. “Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir”. In: *European Heart Journal* 35.6 (Feb. 2014), S. 376–385. DOI: 10.1093/eurheartj/eh331.
- [47] Kraal G. “Cells in the marginal zone of the spleen”. In: *International Review of Cytology* 132 (1992), S. 31–74.
- [48] Iizuka T., Tanaka T., Suematsu M., Miura S., Watanabe T., Koike R., Ishimura Y., Ishii H., Miyasaka N., und Miyasaka M. “Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164.5 (1. März 2000), S. 2463–2471.
- [49] Haan J. M. den und Kraal G. “Innate Immune Functions of Macrophage Subpopulations in the Spleen”. In: *Journal of Innate Immunity* 4.5 (2012), S. 437–445. DOI: 10.1159/000335216.
- [50] Gray D., MacLennan I. C., Bazin H., und Khan M. “Migrant mu+ delta+ and static mu+ delta- B lymphocyte subsets”. In: *European Journal of Immunology* 12.7 (Juli 1982), S. 564–569. DOI: 10.1002/eji.1830120707.
- [51] Dammers P. M., Visser A., Popa E. R., Nieuwenhuis P., und Kroese F. G. “Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165.11 (1. Dez. 2000), S. 6156–6169.
- [52] Nieuwenhuis P. und Ford W. L. “Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes”. In: *Cellular Immunology* 23.2 (Mai 1976), S. 254–267.
- [53] Cinamon G., Matloubian M., Lesneski M. J., Xu Y., Low C., Lu T., Proia R. L., und Cyster J. G. “Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone”. In: *Nature Immunology* 5.7 (Juli 2004), S. 713–720. DOI: 10.1038/ni1083.
- [54] Cinamon G., Zachariah M. A., Lam O. M., Foss F. W., und Cyster J. G. “Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport”. In: *Nature Immunology* 9.1 (Jan. 2008), S. 54–62. DOI: 10.1038/ni1542.
- [55] Steiniger B., Rüttinger L., und Barth P. J. “The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments”. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 51.5 (Mai 2003), S. 655–664.
- [56] Steiniger B., Barth P., und Hellinger A. “The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration?” In: *The American Journal of Pathology* 159.2 (Aug. 2001), S. 501–512. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61722-1.
- [57] Weill J.-C., Weller S., und Reynaud C.-A. “Human Marginal Zone B Cells”. In: *Annual Review of Immunology* 27.1 (2009), S. 267–285. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132607.
- [58] Scheeren F. A., Nagasawa M., Weijer K., Cupedo T., Kirberg J., Legrand N., und Spits H. “T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+IgD+CD27+ B cells”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 205.9 (1. Sep. 2008), S. 2033–2042. DOI: 10.1084/jem.20070447.
- [59] Krieken J. H. van und Velde J. te. “Immunohistology of the human spleen: an inventory of the localization of lymphocyte subpopulations”. In: *Histopathology* 10.3 (März 1986), S. 285–294.

- [60] Steiniger B., Barth P., Herbst B., Hartnell A., und Crocker P. R. “The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone”. In: *Immunology* 92.2 (Okt. 1997), S. 307–316.
- [61] Ewijk W. van und Nieuwenhuis P. “Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp”. In: *Experientia* 41.2 (15. Feb. 1985), S. 199–208.
- [62] Willführ K. U., Westermann J., und Pabst R. “Absolute numbers of lymphocyte subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen”. In: *European Journal of Immunology* 20.4 (Apr. 1990), S. 903–911. DOI: 10.1002/eji.1830200428.
- [63] Steiniger B. S., Seiler A., Lampp K., Wilhelmi V., und Stachniss V. “B lymphocyte compartments in the human splenic red pulp: capillary sheaths and periarteriolar regions”. In: *Histochemistry and Cell Biology* 141.5 (17. Dez. 2013), S. 507–518. DOI: 10.1007/s00418-013-1172-z.
- [64] Ferguson A. R., Youd M. E., und Corley R. B. “Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells”. In: *International Immunology* 16.10 (Okt. 2004), S. 1411–1422. DOI: 10.1093/intimm/dxh142.
- [65] Zhang L., Ding Z., Xu H., und Heyman B. “Marginal Zone B Cells Transport IgG3-Immune Complexes to Splenic Follicles”. In: *The Journal of Immunology* 193.4 (15. Aug. 2014), S. 1681–1689. DOI: 10.4049/jimmunol.1400331.
- [66] Hjelm F., Karlsson M. C. I., und Heyman B. “A novel B cell-mediated transport of IgE-immune complexes to the follicle of the spleen”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180.10 (15. Mai 2008), S. 6604–6610.
- [67] Aumüller G., Engele J., Kirsch J., und Mense S. *Duale Reihe Anatomie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2014.
- [68] Steiniger B., Timphus E. M., und Barth P. J. “The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants”. In: *Histochemistry and Cell Biology* 126.6 (Dez. 2006), S. 641–648. DOI: 10.1007/s00418-006-0210-5.
- [69] Brandtzaeg P. “History of oral tolerance and mucosal immunity”. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 778 (13. Feb. 1996), S. 1–27.
- [70] Mowat A. M. “Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens”. In: *Nature Reviews. Immunology* 3.4 (Apr. 2003), S. 331–341. DOI: 10.1038/nri1057.
- [71] Nave H., Gebert A., und Pabst R. “Morphology and immunology of the human palatine tonsil”. In: *Anatomy and Embryology* 204.5 (Nov. 2001), S. 367–373.
- [72] Jović M., Avramović V., Vlahović P., Savić V., Veličkov A., und Petrović V. “Ultrastructure of the human palatine tonsil and its functional significance”. In: *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie* 56.2 (2015), S. 371–377.
- [73] Dono M., Burgio V. L., Tacchetti C., Favre A., Augliera A., Zupo S., Taborelli G., Chiorazzi N., Grossi C. E., und Ferrarini M. “Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. I. Morphologic, cytochemical and phenotypic characterization”. In: *European Journal of Immunology* 26.9 (Sep. 1996), S. 2035–2042. DOI: 10.1002/eji.1830260911.
- [74] Dono M., Zupo S., Leanza N., Melioli G., Fogli M., Melagrana A., Chiorazzi N., und Ferrarini M. “Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164.11 (1. Juni 2000), S. 5596–5604.
- [75] Spencer J., Perry M. E., und Dunn-Walters D. K. “Human marginal-zone B cells”. In: *Immunology Today* 19.9 (Sep. 1998), S. 421–426.

- [76] Steiniger B., Trabandt M., und Barth P. J. “The follicular dendritic cell network in secondary follicles of human palatine tonsils and spleens”. In: *Histochemistry and Cell Biology* 135.4 (Apr. 2011), S. 327–336. DOI: 10.1007/s00418-011-0799-x.
- [77] *spectrumviewer / BD Biosciences-US*. URL: <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer> (besucht am 24.04.2016).
- [78] Stefan W., Gröbler B., Gluch M., und Heinz H. *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*. Sep. 2003. URL: http://www.cai.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/Mathematisch-Naturwissenschaftliche_Fakultaet/CAI/Literatur/Die_konfokale_Laser_Scanning_Mikroskopie.pdf (besucht am 24.04.2016).
- [79] Vidarsson G., Dekkers G., und Rispens T. “IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions”. In: *Immunotherapies and Vaccines* 5 (2014), S. 520. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [80] Cerutti A., Cols M., und Puga I. “Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes”. In: *Nature Reviews Immunology* 13.2 (Feb. 2013), S. 118–132. DOI: 10.1038/nri3383.
- [81] Steiniger B., Timphus E.-M., Jacob R., und Barth P. J. “CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone”. In: *Immunology* 116.4 (Dez. 2005), S. 429–442. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02242.x.
- [82] Bagnara D., Squillario M., Kipling D., Mora T., Walczak A. M., Silva L. D., Weller S., Dunn-Walters D. K., Weill J.-C., und Reynaud C.-A. “A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans”. In: *The Journal of Immunology* 195.8 (15. Okt. 2015), S. 3716–3724. DOI: 10.4049/jimmunol.1500753.
- [83] Xiao Y., Hendriks J., Langerak P., Jacobs H., und Borst J. “CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172.12 (15. Juni 2004), S. 7432–7441.
- [84] Arnon T. I., Horton R. M., Grigorova I. L., und Cyster J. G. “Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress”. In: *Nature* 493.7434 (31. Jan. 2013), S. 684–688. DOI: 10.1038/nature11738.
- [85] Dunn-Walters D. K., Isaacson P. G., und Spencer J. “Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 182.2 (1. Aug. 1995), S. 559–566.
- [86] Dunn-Walters D. K., Isaacson P. G., und Spencer J. “Sequence analysis of rearranged IgVH genes from microdissected human Peyer’s patch marginal zone B cells”. In: *Immunology* 88.4 (Aug. 1996), S. 618–624.
- [87] Tierens A., Delabie J., Michiels L., Vandenberghe P., und De Wolf-Peeters C. “Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion”. In: *Blood* 93.1 (1. Jan. 1999), S. 226–234.
- [88] Tangye S. G., Liu Y. J., Aversa G., Phillips J. H., und Vries J. E. de. “Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 188.9 (2. Nov. 1998), S. 1691–1703.
- [89] Zandvoort A., Lodewijk M. E., Boer N. K. de, Dammers P. M., Kroese F. G., und Timens W. “CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells”. In: *Tissue Antigens* 58.4 (Okt. 2001), S. 234–242.
- [90] Oord J. J. van den, Wolf-Peeters C. de, und Desmet V. J. “The marginal zone in the human reactive lymph node”. In: *American Journal of Clinical Pathology* 86.4 (Okt. 1986), S. 475–479.

- [91] Han S., Zheng B., Dal Porto J., und Kelsoe G. “In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 182.6 (1. Dez. 1995), S. 1635–1644.
- [92] Liu Y. J., Zhang J., Lane P. J., Chan E. Y., und MacLennan I. C. “Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens”. In: *European Journal of Immunology* 21.12 (Dez. 1991), S. 2951–2962. DOI: 10.1002/eji.1830211209.
- [93] Colombo M., Cutrona G., Reverberi D., Bruno S., Ghiotto F., Tenca C., Stamatopoulos K., Hadzidimitriou A., Ceccarelli J., Salvi S., Boccardo S., Calevo M. G., De Santanna A., Truini M., Fais F., und Ferrarini M. “Expression of immunoglobulin receptors with distinctive features indicating antigen selection by marginal zone B cells from human spleen”. In: *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 19 (2013), S. 294–302. DOI: 10.2119/molmed.2013.00069.
- [94] Kruetzmann S., Rosado M. M., Weber H., Germing U., Tournilhac O., Peter H.-H., Berner R., Peters A., Boehm T., Plebani A., Quinti I., und Carsetti R. “Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 197.7 (7. Apr. 2003), S. 939–945. DOI: 10.1084/jem.20022020.
- [95] Castagnola E. und Fioredda F. “Prevention of life-threatening infections due to encapsulated bacteria in children with hyposplenism or asplenia: a brief review of current recommendations for practical purposes”. In: *European Journal of Haematology* 71.5 (Nov. 2003), S. 319–326.
- [96] Wasserstrom H., Bussel J., Lim L. C.-L., und Cunningham-Rundles C. “Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181.5 (1. Sep. 2008), S. 3684–3689.
- [97] Weller S., Braun M. C., Tan B. K., Rosenwald A., Cordier C., Conley M. E., Plebani A., Kumararatne D. S., Bonnet D., Tournilhac O., Tchernia G., Steiniger B., Staudt L. M., Casanova J.-L., Reynaud C.-A., und Weill J.-C. “Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire”. In: *Blood* 104.12 (1. Dez. 2004), S. 3647–3654. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0346.
- [98] Sabatino A. D. “Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease?” In: *World Journal of Gastroenterology* 19.15 (2013), S. 2313. DOI: 10.3748/wjg.v19.i15.2313.
- [99] Di Sabatino A., Carsetti R., Rosado M. M., Ciccocioppo R., Cazzola P., Morera R., Tinozzi F. P., Tinozzi S., und Corazza G. R. “Immunoglobulin M memory B cell decrease in inflammatory bowel disease”. In: *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 8.5 (Okt. 2004), S. 199–203.
- [100] Yeramilli V. A. und Knight K. L. “Development of CD27+ marginal zone B cells requires GALT”. In: *European Journal of Immunology* 43.6 (1. Juni 2013), S. 1484–1488. DOI: 10.1002/eji.201243205.
- [101] Vossenkämper A., Blair P. A., Safinia N., Fraser L. D., Das L., Sanders T. J., Stagg A. J., Sanderson J. D., Taylor K., Chang F., Choong L. M., D’Cruz D. P., MacDonald T. T., Lombardi G., und Spencer J. “A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 210.9 (26. Aug. 2013), S. 1665–1674. DOI: 10.1084/jem.20122465.
- [102] Guillianio M. J., Foxx-Orenstein A. E., und Lebman D. A. “The microenvironment of human Peyer’s patches inhibits the increase in CD38 expression associated with the germinal center reaction”. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166.4 (15. Feb. 2001), S. 2179–2185.
- [103] Jønsson V. “Comparison and definition of spleen and lymph node: a phylogenetic analysis”. In: *Journal of Theoretical Biology* 117.4 (21. Dez. 1985), S. 691–699.

- [104] Kraal G., Schornagel K., Streeter P. R., Holzmann B., und Butcher E. C. “Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen”. In: *The American Journal of Pathology* 147.3 (Sep. 1995), S. 763–771.
- [105] Zindl C. L., Kim T. H., Zeng M., Archambault A. S., Grayson M. H., Choi K., Schreiber R. D., und Chaplin D. D. “The Lymphotoxin *LTalpha1beta2* Controls Postnatal and Adult Spleen Marginal Sinus Vascular Structure and Function”. In: *Immunity* 30.3 (20. März 2009), S. 408–420. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.010.
- [106] Brandtzaeg P. und Johansen F.-E. “Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties”. In: *Immunological Reviews* 206 (Aug. 2005), S. 32–63. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Marie Lettau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Etablierung immunhistochemischer Multifluoreszenzfärbungen für Gedächtnis-B-Zell-Lokalisationsstudien in humanen lymphatischen Geweben‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 11. Mai 2017

(Marie Lettau)

CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

DANKSAGUNG

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Dörner, aussprechen, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für die unmittelbaren Durchsichten und die konstruktive Kritik beim Verfassen dieser Arbeit.

An dieser Stelle bedanke ich mich zugleich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Dörner, die mich herzlich aufgenommen und stets ermutigt haben. Vielen Dank dabei insbesondere an Claudia Giesecke für ihren Ideenreichtum und die Diskussionen während der Datenerhebung sowie Sarah Fleischer und Karin Reiter für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr Engagement.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Birte Steiniger, die sich die Zeit für eine anregende Diskussion ihrer und meiner Daten nahm.

Vielen Dank an die Chirurgie der Charité sowie das DRFZ Team für die Hilfe bei der Gewebeorganisation und ebenfalls den DRFZ Kollegen insbesondere für den technischen Beistand am LSM und Mikrotom sowie den Labormanagern für das Antikörperlabeling.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken für ihre Motivation, ihr Interesse und ihre Unterstützung, insbesondere meinem Bruder Thomas Lettau für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.