

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Phänotypischer Vergleich der Architektur der lymphatischen Organe von Knockoutmäusen der TNF/LT-Familie

Tobias Pötzel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 27.03.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Die TNF-Superfamilie	6
1.1.1 Die TNF-Liganden	6
1.1.2 Die TNF-Rezeptoren	7
1.2 Die TNF/Lymphotoxin-Superfamilie	9
1.2.1 Die Liganden	10
1.2.2 Die Rezeptoren	12
1.3 Einfluß der TNF/LT-Superfamilie auf die Bildung von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques.....	13
1.3.1 Grundlagen der Entwicklung von Lymphknoten	13
1.3.2 Grundlagen der Entwicklung der Peyer'schen Plaques.....	16
1.3.3 Bisherige Daten aus der Analyse von Knockout-Mäusen	16
1.4 Einfluß der TNF/LT-Superfamilie auf die Architektur der Milz	18
1.4.1 Grundaufbau der Milz	18
1.4.2 Entwicklung der weißen Pulpa	19
1.5 Moleküle, die neben dem TNF/LT System für die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen Bedeutung haben	24
1.6 Schematische Zusammenfassung	25
1.7 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Bezugsquellennachweise	30
2.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	30
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	30
2.1.3 Geräte.....	31
2.1.4 In dieser Arbeit verwendete Software	31
2.2 Medien und Puffer	32
2.3 Antikörper und Zweitreagenzien	32
2.3.1 monoklonale Antikörper.....	32

2.3.2 In dieser Arbeit verwendete Zweitreagenzien	34
2.4 Versuchstiere	34
2.5 Zelluläre Arbeitsmethoden	34
2.5.1 Organentnahme.....	34
2.5.2 Kultivierung von Splenozyten	35
2.5.3 Kultivierung von Leukozyten aus peripherem Blut	35
2.6 Analyse von Gewebeschnitten mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop	35
2.6.1 Die Aufbereitung von Gewebeschnitten	35
2.6.2 Färbeprozedur	36
2.6.4 Das konfokale Prinzip	37
2.6.5 Der Strahlengang des Mikroskops.....	37
2.6.6 Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe.....	39
2.6.7 Verwendung der Software	39
2.6.8 Besonderheit von PE (Phycoerythrin)	41
2.7 Durchflußzytometrie.....	41
3 Vergleich der Phänotypen der TNF/LT Knockout Mäuse	43
3.1 Entwicklung von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques in der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Maus.....	43
3.2 Vergleich der Milzarchitektur der TNF/LT defizienten Mäuse	44
3.2.2 T/B Segregation	44
3.2.3 B-Lymphozyten	46
3.2.4 Follikuläre dendritische Zellen (FDC)	51
3.2.5 Marginalzonen Makrophagen.....	53
3.2.6 Dendritische Zellen.....	58
4 Diskussion.....	64
4.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie.....	64
4.2 Phänotypischer Vergleich von TNF/LT defizienten Mäuse.....	65
4.3 Ausblick.....	69
5 Zusammenfassung	72
Literaturverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der TNF / Lymphotoxin Ligand-Rezeptor Gruppe	10
Abb. 2: Darstellung der Interaktionen von Stromazellen mit den haematopoietischen Vorläuferzellen.	15
Abb. 3: Darstellung der zeitlichen Abläufe während der Entwicklung von Lymphknoten: ...	16
Abb. 4: Schematischer Grundriß der weißen Pulpa der Milz.....	19
Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktion der Stromazellen mit den jeweiligen Zielzellen.	22
Abb. 6: Schema des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops..	38
Abb. 7: Fluoreszenzspektrum von PE	41
Abb. 9: T/B Segregation.....	45
Abb. 10: B-Lymphozyten.....	48
Abb. 11: Facs-Analyse der Lymphozyten in Blut und Milz.....	49
Abb. 12: FACS-Analyse der B-Zellen in der Milz.....	50
Abb. 13: FDC-Netzwerke. Anti-CD21/35 (Fic), PNA (PE)	52
Abb. 14: FDC-Netzwerke in der Milz von LIGHT ^{-/-} und LIGHT/LTβ ^{-/-} Mäusen	53
Abb. 15: Metallophile Makrophagen (MOMA1). Anti-MOMA-1(grün) und PNA (rot).	55
Abb. 16: Metallophile Makrophagen (3d6=Sialoadhesin)..	56
Abb. 17: Marginalzonen Makrophagen (ERTR9).....	57
Abb. 18: DC-Färbung.....	60
Abb. 19: Darstellung der NK Zellen in Milz und Blut. Anti-NK1.1 (PE) und Anti-DX5 (Fic)..	62
Abb. 20: Darstellung der NK-T Zellen in Milz und Blut. Anti-NK1.1 (Fic), Anti-CD3 (PE)	63
Abb. 21: Darstellung der Milzstruktur mit PNA (rot) zur besseren räumlichen Darstellung. .	65
Abb. 22: Vergleich der TNFRp55 ^{-/-} Maus mit der TNF ^{-/-} ..	67
Abb. 23: Vergleich der Milzen von LTα ^{-/-} , LTαβ ^{Δ/Δ} und LTβ-R ^{-/-} Mäusen..	69

Abkürzungsverzeichnis

B Zellen	B Lymphozyten
BSA	Rinderserumalbumin
DC	dendritische Zellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FDC	follikulär dendritische Zellen
HVEM	<u>H</u> erpes <u>V</u> irus <u>E</u> ntry <u>M</u> ediator
ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten (LK) und Peyer'sche Plaques
LT	Lymphotoxin
LTIC	Lymphoid tissue inducing cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Metallophile Makrophagen
MZ	Marginalzone
MZM	Marginalzonen Makrophagen
NK Zellen	Natural Killer Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PNA	Peanut-Agglutinin
PP	Peyer'sche Plaques
RT	Raumtemperatur
T Zellen	T Lymphozyten
TACE	TNF α converting enzyme)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Rezeptor-associated factors
VCAM1	Vascular adhesion molecule 1

1 Einleitung

Das Immunsystem des Menschen ist aus zwei Organsystemen aufgebaut. Den primär und sekundär lymphatischen Organen. Zu den primär lymphatischen Organen zählt man Thymus und das Knochenmark. Hier entwickeln sich Vorläuferzellen der verschiedenen lymphozytären Zellen. Das sekundär lymphatische System dient nicht der Produktion von Lymphozyten, sondern stellt vielmehr die Wirkungsstätte dieser immunkompetenten Zellen dar. Die Bestandteile des sekundären lymphatischen Systems, Milz, Lymphknoten und Mukosa assoziierte Gewebe sind daher auch an strategisch günstigen Positionen angelegt worden um Antigen abzufangen. Die zielgerichtete Antigenabwehr durch das Immunsystem ist ein komplizierter Prozess der Antigenerkennung, Präsentation und Eliminierung die die Interaktion verschiedener Zellpopulationen benötigt. Der Organismus hat im Laufe seiner Entwicklung ein System an Botenstoffen und Rezeptoren entwickelt um dieses Wechselspiel zu ermöglichen. Eine der ersten Faktoren die man in diesem Zusammenhang brachte war der Tumor Nekrose Faktor α (TNF) und das Lymphotoxin α (LT). Durch humane und murine Genom-Sequenzierungsprojekte konnte man noch mehr Familienmitglieder entdecken. Bis heute wurde ein System von über 20 Liganden und Rezeptoren der TNF Superfamilie etabliert. Die Wirkung des TNF Systems auf die beteiligten Zellen ermöglicht ein komplexes und kompliziertes Wechselspiel zwischen so unterschiedlichen Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Entzündung aber auch Apoptose und Organogenese. Die Ergebnisse über die Wechselwirkung der beteiligten Liganden und Rezeptoren beginnen nun in den klinischen Alltag Einzug zu halten. Aktuell werden TNF Antikörper bei der Behandlung von chron. Darmerkrankungen und rheumatoiden Erkrankungen eingesetzt. Erste Therapieversuche laufen auch bei Arteriosklerose, Osteoporose, anderen Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebstherapie.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Gruppe von Liganden und Rezeptoren der TNF/LT Superfamilie und deren speziellen Einfluß auf die Organogenese von sekundären lymphatischen Gewebe. Zu diesem Zweck wurde die Architektur der Milz bzgl. verschiedener Zellpopulationen untersucht. Dabei wurde im Gegensatz zu der bisher üblichen lichtmikroskopischen

schen Immunhistochemie ein konfokales Lasermikroskops verwendet, mit dem eine detailliertere Untersuchung der Gewebeschnitte möglich ist.

1.1 Die TNF-Superfamilie

Nach der „HGNC Gene Family Nomenclature“ unterscheidet man innerhalb der TNF Familie 23 Rezeptoren und 19 Liganden.

1.1.1 Die TNF-Liganden

Tab. 1.1 : Die TNF-Rezeptoren

Ligand	Name	Aliase
LTA	lymphotoxin alpha = TNF superfamily, member 1	TNFSF1, TNFB, LT
TNF	tumor necrosis factor = TNF superfamily, member 2	TNFSF2, TNFA, DIF
LTB	lymphotoxin beta = TNF superfamily, member 3	TNFSF3, TNFC, p33
TNFSF4	TNF superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kD)	OX-40L, gp34, TXGP1
TNFSF5	TNF superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)	CD40LG, IMD3, HIGM1, CD40L, hCD40L, TRAP, CD154, gp39
TNFSF6	TNF superfamily, member 6	FasL, APT1LG1
TNFSF7	TNF superfamily, member 7	CD70, CD27L, CD27LG
TNFSF8	TNF superfamily, member 8	CD30LG
TNFSF9	TNF superfamily member 9	1BB-L
TNFSF10	TNF superfamily, member 10	TRAIL, Apo-2L, TL2
TNFSF11	TNF superfamily, member 11	TRANCE, RANKL, OPGL, ODF
TNFSF12	TNF superfamily, member 12	TWEAK, DR3LG, APO3L
TNFSF13	TNF superfamily, member 13	APRIL
TNFSF14	TNF superfamily, member 14	LIGHT, HVEM-L

TNFSF15	TNF superfamily, member 15	TL1, VEGI
TNFSF16	—	—
TNFSF17	—	—
TNFSF18	TNF superfamily, member 18	AITRL, TL6, hGITRL
TNFSF19	—	—

1.1.2 Die TNF-Rezeptoren

Tab. 1.2 : Die TNF-Rezeptoren

Rezeptor	Name	Aliase
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	p55-R, CD120a, TNF-R-I p55, TNF-R, TNFR1, TNFAR, TNF-R55, p55TNFR, TNFR60
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	CD120b, p75, TNF-R, TNF-R-II, TNFR80, TNFR2, TNF-R75, TNFBR , p75TNFR
TNFR 3	LTBR (lymphotoxin beta receptor)	TNFRSF3, TNFR2-RP, CD18, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III
TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	OX40, ACT35, TXGP1L
TNFRSF5	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	p50, Bp50, CD40
TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	FAS, CD95, APO-1, APT1
TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 b, decoy	DcR3
TNFRSF7	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	Tp55, S152, CD27

TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	Ki-1, D1S166E, CD30
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4-1BB, CD137, ILA
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	DR4, Apo2, TRAILR-1
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB
TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	DcR1, TRAILR3, LIT, TRID
TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	DcR2, TRUNDD, TRAILR4
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, activator of NFkB	RANK
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	OPG, OCIF, TR1
TNFRSF12	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12 (translocating chain-association membrane protein)	DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3
TNFRSF12L	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12-like	DR3L
TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	TACI
TNFRSF13C	tumor necrosis factor receptor	BAFFR

	superfamily, member 13C	
TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpes virus entry mediator)	HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA
NGFR	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	TNFRSF16
TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	BCM, BCMA
TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	AITR, GITR
TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	-----
TNFRSF19L	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19-like	FLJ14993, RELT
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	DR6
TNFRSF22	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22	SOBa, Tnfrh2, 2810028K06Rik
TNFRSF23	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23	mSOB, Tnfrh1

Obwohl diese Nomenklatur den Namen für die verschiedenen Liganden und Rezeptoren vorgibt, findet man in den aktuellen Publikationen vorwiegend die alten Bezeichnungen (Aliase). Um diese Arbeit möglichst verständlich zu halten, wurden daher die alten, aber üblichen Bezeichnungen gewählt.

1.2 Die TNF/Lymphotoxin-Superfamilie

Aus der großen TNF Superfamilie gibt es eine Gruppe von 5 Liganden und 4 Rezeptoren die bei der Entstehung und Funktion von sekundären lymphatischem Gewebe eine überragende Rolle besitzen. Die Funktion der verschiedenen TNF/Lymphotoxin (LT) –Familienmitglieder bei der Entwicklung der sekundären lymphatischen Organe zu definieren, stellt den Kern dieser Arbeit dar.

Zu den sekundären lymphatischen Organen zählt man neben Milz, Lymphknoten, Mukosassoziierten lymphatischen Geweben in Lunge und Darm auch die wenig organisierten Ansammlungen lymphatischer Zellen in Gastro-, Urogenital- und Respirationstrakt. Den Einfluß der TNF/LT-Familie auf die Entwicklung und Funktion des sekundären lymphatischen Systems war und ist Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Es gilt immer wieder die neuesten Erkenntnisse der verschiedenen Einflußbereiche der TNF/LT-Familie miteinander abzugleichen.

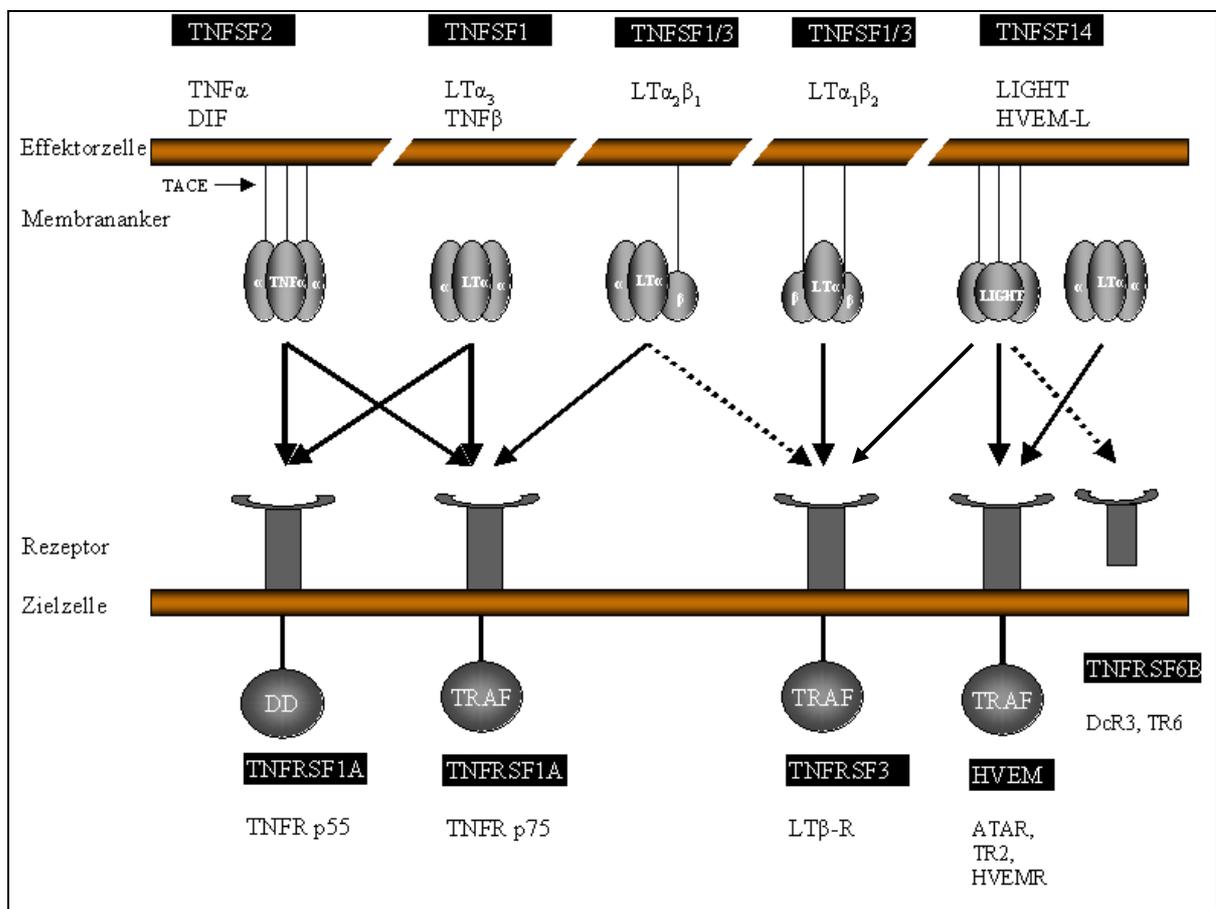


Abb. 1: Schema der TNF / Lymphotoxin Ligand-Rezeptor Gruppe Die Pfeile stellen das Bindungsverhalten dar. Bei gestrichelten Pfeilen ist das Bindungsverhalten noch nicht endgültig geklärt (nach Scheu et al.).

1.2.1 Die Liganden

Die Liganden der TNF/LT-Familie sind alle strukturell dem TNF ähnlich. Mit der Röntgen-Kristallographie hat man festgestellt dass alle Liganden trimäre Komplexe mit Ausnahme des

Nerve growth factor bilden (24). Die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit der Liganden spiegelt sich auch in ihrer Herkunft wieder. TNF, $LT\alpha$ und $LT\beta$ werden alle von Genen kodiert die auf dem selben Chromosom benachbart liegen (Fu and Chaplin et al., 1999)

TNF wird von den verschiedensten immunkompetenten Zellen gebildet. Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und vor allem Makrophagen. TNF besitzt einen langen N-terminalen Anker an der Zelloberfläche und stellt somit ein Typ II Membranprotein da. Zur Sekretion kann es durch die Metalloproteinase TACE (=TNF α converting enzyme) gespalten werden, welche von den selben Zellen produziert wird, die auch TNF α herstellen. (Black et al., 1997)

$LT\alpha$ ist genau wie TNF strukturell ein Homotrimer. Die Sekretion von $LT\alpha$ durch aktivierte B und T Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen erfolgt nur als rein lösliches Ligand $LT\alpha_3$ (Paul and Ruddle et al., 1988). Es besitzt keine Transmembran-Domäne. Sowohl $LT\alpha_3$ als auch TNF α interagieren beide mit den Rezeptoren TNFRp55, bzw. TNFRp75 (Lewis et al., 1991; Loetscher et al., 1990; Smith et al., 1990). $LT\alpha_3$ kann zusätzlich auch noch HVEM binden (siehe unten).

Im Gegensatz zu TNF α kommt $LT\alpha$ aber auch als membrangebundener Ligand vor. In diesem Fall bildet $LT\alpha$ zusammen mit $LT\beta$ einen heterotrimeren Komplex. $LT\beta$, welches von aktivierten und ruhenden Leukozyten expremiert wird, ist ein Typ II Membranprotein. (Browning et al., 1993; Browning et al., 1995; Ware et al., 1995). Hierbei ist eine oder zwei $LT\beta$ Kette(n) mit ein oder zwei Kette(n) $LT\alpha$, nichtkovalent verbunden. Hieraus entsteht der membrangebundene Ligand $LT\alpha_1\beta_2$ bzw. $LT\alpha_2\beta_1$. Hauptsächlich findet man $LT\alpha_1\beta_2$ im Organismus. Man weiß heute noch nicht ob $LT\alpha_2\beta_1$ in bedeutender Menge vom Körper produziert wird und deshalb überhaupt funktionell bedeutend ist.

LIGHT steht für „Lymphotoxin homolog which exhibits Inducible expression and completes with the herpes simplex virus Glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes“ (Mauri et al., 1998). LIGHT wird von aktivierten T Lymphozyten und immaturren dendritischen Zellen gebildet. Es kommt als homotrimeres Typ II Transmembranprotein vor und es wird ähnlich wie TNF, im Falle der Sekretion durch eine Metalloproteinase von

der Zelloberfläche abgespalten. LIGHT bindet sowohl am HVEM Rezeptor als auch am $LT\beta$ -R.

1.2.2 Die Rezeptoren

Den Rezeptoren ist allen zu eigen, dass sie eine ähnliche extrazelluläre Domäne besitzen die typischerweise sich wiederholende Cysteinreste aufweist. Betrachtet man die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoren so kann man feststellen dass TNFRp55 eine Death Domain (DD) besitzt, die für die Weiterleitung von Apoptosesignalen wichtig ist. Rezeptoren ohne DD sind TNFRp75, $LT\beta$ -R und HVEM. Diese Rezeptoren, die keine DD besitzen, binden mit ihrem zytoplasmatischen Anteil an TNF Rezeptor-associated factors (TRAFs), die wiederum z.B. durch NF- κ B und JNK Aktivierung in die Zellhomöostase bzw. Gen-Transkription eingreifen. Hierdurch können TNF Rezeptoren Lymphozyten nach Antigenkontakt zur Proliferation und Differenzierung stimulieren (6).

Für TNFRp55/p75 besteht auch noch eine Besonderheit. Durch Abspaltung an der Plasmamembran kommen diese Rezeptoren auch in einer löslichen Form vor. Die Funktion solcher löslicher Rezeptoren ist nicht vollständig geklärt. Vermutet wird das hierdurch die Bioverfügbarkeit der beteiligten Liganden (TNF / $LT\alpha$) reguliert wird und so eine Art Inhibition erreicht werden kann. (Gravenstein, Borst et al., 1998; Ware et al., 1994)

Den $LT\beta$ -R findet man auf nicht-lymphoiden Zellen, wie Epithelzellen, Stromazellen, follikulär dendritische Zellen und auf aktivierten Makrophagen ist er ebenfalls detektierbar (Browning et al., 1997; Futterer et al., 1998; Ehlers et al., 2003). Als Liganden für diesen Rezeptor sind bisher $LT\alpha 1\beta 2$ und LIGHT beschrieben worden. (Crowe et al., 1994 ; Maurie et al., 1998).

HVEM („Herpes Virus Entry Mediator“) wird von Monozyten, Endothelzellen, NK-, T-, B-Zellen und immaturren dendritischen Zellen exprimiert. Neben LIGHT existiert auch noch $LT\alpha 3$ als Bindungspartner. (More et al., 2000 ; Salio et al., 1999 ; Harrop et al., 1998).

TNFRSF6B kommt nur in einer sezernierten Form vor. Er kann FAS-Ligand (Pitti et al., 1998) und LIGHT (Yu et al., 1999) binden.

1.3 Einfluß der TNF/LT-Superfamilie auf die Bildung von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques

Lymphknoten (LK) und Peyer'sche Plaques (PP) entwickeln sich nach dem selben Schema. In einem prädisponierten Bereich treten mesenchymale Stromazellen mit einwandernden $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R^+$ Zellen in Kontakt die Lymphotoxin α und β bilden (30,42). Diese Zellen stellen eine Population an Vorläuferzellen dar, welche sich in antigenpräsentierende Zellen oder NK Zellen, aber nicht T und B Zellen entwickeln können (29). Durch Wechselwirkung der Stromazellen mit diesen eingewanderten Zellen entsteht die Grundlage für die Migration der endgültigen Zellpopulationen und damit die Ausbildung von funktionstüchtigen Lymphknoten und Peyer'sche Plaques. Die Ausbildung von T Zellbereichen, die von B Zellfollikeln umgeben werden, ist der letzte Schritt in der Entwicklung und stellt das einheitliches Erscheinungsbild aller sekundär lymphatischen Gewebe dar (Mebius et al.,2001)

Die Entwicklung von LK und PP läuft in einem festen embryonalen Zeitfenster ab und ist dann fixiert (Rennert et al., 1998). Man fand diesbezüglich durch Injektion eines $LT\beta R$ -Ig Fusionsproteins in schwangeren Mäusen heraus, daß man durch Applikation an verschiedenen Zeitpunkten während der Gestation, unterschiedliche Defekte in der Entwicklung von LK und PP erzielen kann. Applikation am Tag 18 ergab keine Veränderung der LK aber bereits fehlende PP. Applikation am Tag 16 führte zum Verlust der poplitealen LK und PP. Gab man das Fusionsprotein am Tag 12 so entwickelten sich nur noch die mesenterialen, cervicalen, sacralen und lumbalen LK. Die Entwicklung von LK und PP erfolgt also in einem begrenzten Zeitfenster durch Interaktionen von Lymphotoxin mit dem $LT\beta R$ oder durch andere Liganden des $LT\beta R$ und ist dann fixiert.

1.3.1 Grundlagen der Entwicklung von Lymphknoten

Der erste Schritt in der Entwicklung von Lymphknoten ist, daß sich das Endothel der größeren Venen an bestimmten Stellen zu Lymphsäcken ausdehnt. Danach wandern Bindegewebszellen ein, welche die Adhensionsmoleküle VCAM1 (vascular adhesion molecule 1) und ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1) exprimieren. So bildet sich eine Lymphknotenanlage aus. Von diesen Anlagen beginnen sich nun die Lymphgefäße auszubreiten (Sabin et al.,

1908; Bailey et al., 1975). Zwischen dem 12,5 und 13,5 Tag beginnen nun in einem 2. Schritt aus der fötalen Leber $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R^+$ Zellen in diese Anlagen einzuwandern (34,45), sog. „Lymphoid tissue inducing cells“ (= LTIC). Ermöglicht wird diese Migration durch Chemokine und ihre Rezeptoren. Die LTIC besitzen die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 und können so in die LK-Anlagen migrieren, in denen Stromazellen die korrelierenden Liganden, CXCL13 für den CXCR5 (30) und CCL19 und CCL21 für CCR7 sezernieren (27,30,34). Desweiteren führt noch die Interaktion von Integrinen $\alpha4\beta1$ und $\alpha4\beta7$ der LTIC mit den Adhensionsmolekülen VCAM1 und ICAM1 auf den Stromazellen zu einem optimalen Kontakt. Induziert durch Stimulation des $IL7\alpha$ -R und TRANCE beginnen nun die LTIC mit der $LT\alpha_1\beta_2$ Expression (21,27). (Abb. 2)

Durch Aktivierung des $LT\beta$ -R auf den Stromazellen kommt es zur Aktivierung zweier NF- κ B Signalwege, welche zur vermehrten VCAM-1 Expression und Produktion von Chemokinen (CXCL12, CXCL13, CCL19 und CCL21) führt (14). Eine höhere VCAM1-Expression in Verbindung mit erhöhter Chemokinproduktion lässt mehr haematopoietische Zelle einwandern. So nimmt die Zahl der $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierenden Zellen immer mehr zu und damit auch der Stimulus auf die $LT\beta R^+$ Stromazellen. (Adachi et al., 1997). In der nun folgenden Phase beginnen sich nun HEV (high endothelial venules) auszubilden, welche in $LT\alpha_1\beta_2$ abhängiger Weise Adhensionsmoleküle und Chemokine (CXCL12, CXCL13, CCL19 und CCL21) produzieren. (Cyster et al. 1999; Okada et al. 2002). Der letzte bekannte Schritt besteht in der Einwanderung lymphatischer Zellen in ihre vorbestimmten Bereiche. Die Kompartimentierung der sekundären lymphatischen Organe entsteht durch die Chemokin produzierenden Stromazellen. T Zellen und DC exprimieren den CCR7 Rezeptor und wandern in die T Zell Bereiche in denen Stromazellen CCL19 und CCL21 exprimieren. B Zellen und FDC besitzen den CXCR5 Rezeptor und wandern in die Follikelbereiche in denen CXCL13 exprimiert wird (4). (Abb. 3)

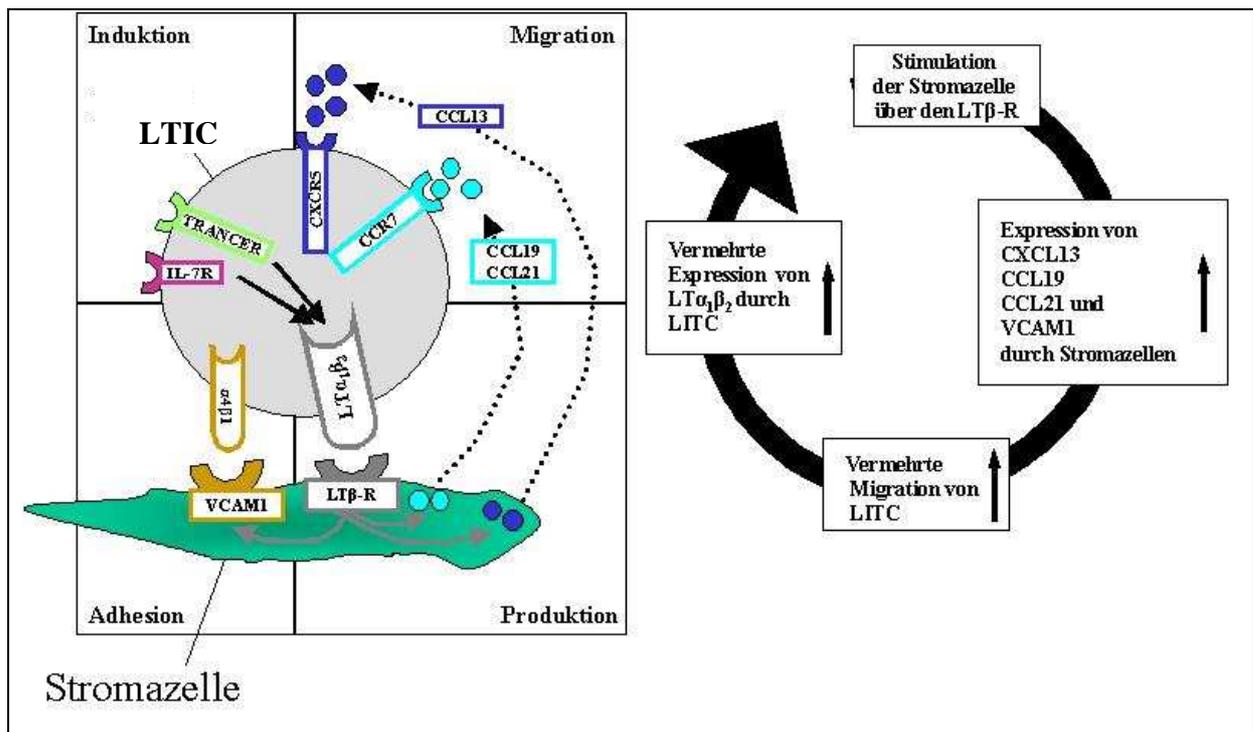


Abb. 2: Darstellung der Interaktionen von Stromazellen mit den haematopoietischen Vorläuferzellen.

Links sind die beteiligten Rezeptoren/Liganden dargestellt. Chemokine und Chemokinrezeptoren sorgen für die Migration von Zellen, Adhäsionsmoleküle für die geeignete Interaktion von LT $\alpha_1\beta_2$ sezernierenden Zellen mit Stromazellen wodurch die Stromazellen über den LT β R stimuliert werden können und wiederum Chemokine und Adhäsionsmoleküle produzieren. In LK ist die initiale Induktion der LITC zur Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ abhängig von Signalen über IL-7R und TRANCE-R. *Rechts* Schema des sich selbstverstärkenden Kreislaufs der beteiligten Faktoren. (nach Mebius et al. 2003; Tumanov et al. 2003)

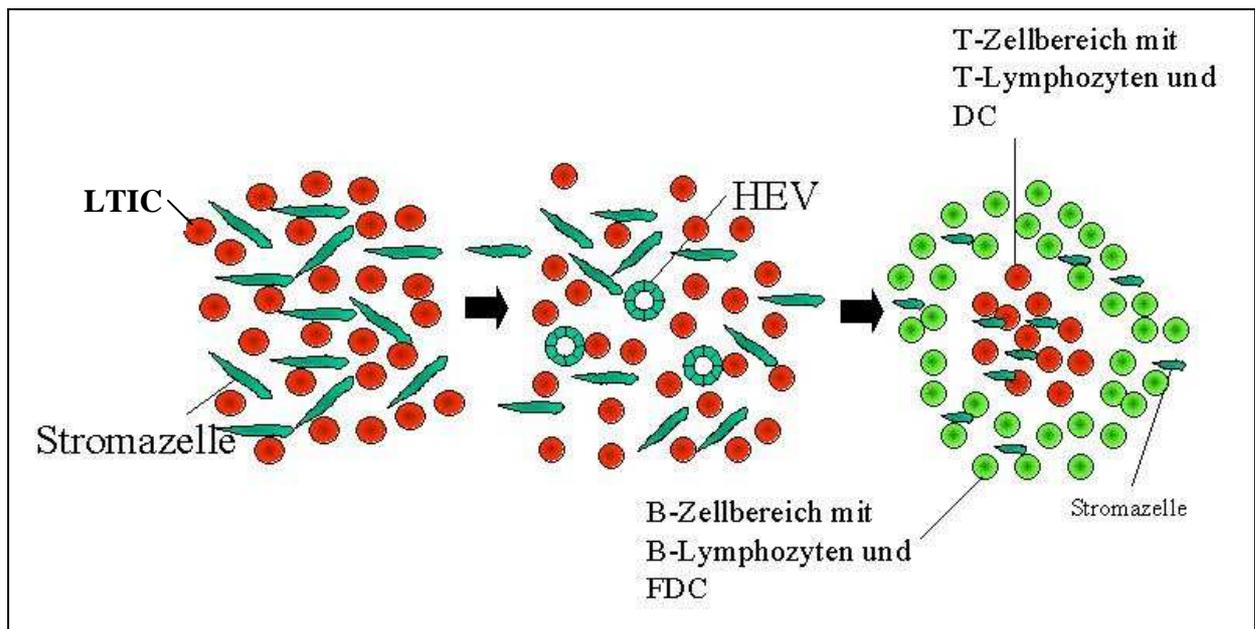


Abb. 3: Darstellung der zeitlichen Abläufe während der Entwicklung von Lymphknoten.: *Links* sieht man die räumliche Anordnung von Stromazellen und LTIC in den LK-Anlagen. *Mitte*. Durch die Interaktion von Stromazellen und LTIC kommt es zur Expression von HEV. *Rechts*. Am Ende gelangen Lymphozyten in die Anlagen und besiedeln ihr vorgesehenes Kompartiment. (nach Mebius et al. 2003)

1.3.2 Grundlagen der Entwicklung der Peyer'schen Plaques

Die Entstehung von Peyer'schen Plaques in Darm beginnt am Tag 15,5 der Embryogenese mit der Anhäufung von VCAM-1 und ICAM-1 exprimierenden „Spots“ in proximalen Teilen des Darms, die sich nach distal ausbreiten. In einer zweiten Entwicklungsphase ab Tag 16,5 der Embryogenese beginnen wiederum $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7-R^+$ die VCAM-1/ICAM-1 Bereiche zu besiedeln (Mebius et al. 2003). Die Induktion zur $LT\alpha_1\beta_2$ Produktion durch LTIC wird ebenso durch IL7-R induziert, wobei TRANCE bei der Entwicklung der PP keine Rolle zu spielen scheint (19). Die weitere Entwicklung verläuft analog zu den Lymphknoten (Yokota Y. et al., 1999; Ansel K.M. et al., 2000).

1.3.3 Bisherige Daten aus der Analyse von Knockout-Mäusen

Nach den obigen Erkenntnissen induzierten $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierende $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7-R^+$ Zellen im Bereich von den vorgesehenen Organanlagen die Entwicklung von Lymphknoten

und Peyer'sche Plaques. In der $LT\beta$ -R^{-/-} Maus fehlen daher alle LK und PP (Futterer et al., 1999).

Betrachtet man allerdings die Liganden für den $LT\beta$ -R so kompliziert sich das Bild. Die $LT\alpha$ ^{-/-} und die $LT\beta$ ^{-/-} Maus besitzen zwar ebenso keine PP mehr, aber zeigen Unterschiede in der Entwicklung der verschiedenen Lymphknotengruppen. Speziell für den mesenterialen und cervikalen LK scheinen Besonderheiten zu gelten. In den $LT\beta$ ^{-/-} entwickeln sich immer, in den $LT\alpha$ ^{-/-} in 5% der Fälle mesenteriale LK (Rennert et al. 1998; Matsumoto et al. 1999). Dieser zeigt dann sogar einen intakten Aufbau mit T/B Segregation (17).

Auch die übrigen Liganden und Rezeptoren der TNF/LT-Familie zeigen Veränderungen in der Entwicklung der sekundären lymphatischen Organe. Die TNF, TNFRp55 und TNFRp75 defizienten Mäuse zeigen normalerweise keinen Defekt in der Entwicklung der LK (Pasparakis et al, 2000). Trotzdem findet man bei der TNFRp55-KO im mesenterialen LK durchmischte T/B Areale (Fu et al.; Chaplin et al., 1999).

$LIGHT$ ^{-/-} Tiere zeigen zwar keinen Defekt in der Entwicklung von LK und PP, in Kombination mit $LT\beta$, in einer doppelt defizienten Mauslinie, kommt es aber zu einem reduzierten Auftreten des mesenterialen LK (38).

Die hervorstechende Rolle des $LT\beta$ -R bei der LK-Entwicklung findet muß bei der Entwicklung der PP differenzierter betrachtet werden. Man findet bei den TNF ^{-/-} und $TNFRp55$ ^{-/-} einen kompletten oder teilweisen Verlust der PP, die, falls sie auftreten in der Größe reduziert sind und vermischt T und B Bereiche aufweisen (22). Allerdings ist dieser Phänotyp bei unterschiedlichen Knockoutmausstämmen unterschiedlich (30). Genauso ist noch nicht endgültig geklärt welcher Ligand ($LT\alpha_3$, TNF) des TNFRp55-Rezeptors dabei die entscheidene Rolle spielt. (Koni et al., 2000). Interessanterweise findet man in den PP einen „dose dependent effect“. So zeigt die doppelt heterozygote $LT\alpha$ ^{+/-} $LT\beta$ ^{+/-} Maus keine PP mehr, obwohl die Singleknockouts ($LT\alpha$ ^{+/-} und $LT\beta$ ^{+/-}) keine Veränderung der Anzahl der PP zeigen.

1.4 Einfluß der TNF/LT-Superfamilie auf die Architektur der Milz

1.4.1 Grundaufbau der Milz

Die Milz ist das größte sekundär lymphatische Organ in Säugetieren und enthält ca. 25% der reifen Lymphozyten. Das Parenchym der Milz ist aus roter und der weißer Pupla aufgebaut. Dabei umgibt die rote Pulpa die knötchenförmige weiße Pulpa. Die Milzknötchen der weiße Pulpa stellen das eigentliche lymphatische Organ dar (Abb.4). Sie bestehen aus drei Kompartimenten, die eine feste räumliche Anordnung aufweisen. Innen liegt die periphere arteriolären Scheide (PALS). Die PALS-Region wird von B Lymphozyten umgeben, die wiederum von der Marginalzone umgeben werden. Im Vergleich zu Lymphknoten, die eine getrennte Lymph- und Blutgefäßversorgung besitzen, findet man in der Milz lediglich ein vaskuläres Gefäßsystem. Der komplette Zufluß erfolgt über die A.splenica. Die kleinsten Äste der A. splenica, die Aa. centrales strahlen dabei in die PALS ein. Von den Aa. centrales sprossen Kapillaren durch die PALS, Follikel und der Marginalzone und bilden um diese Kompartimente den Marginalsinus, welcher rote und weiße Pulpa trennt.

In der PALS findet man vorwiegend rezirkulierende T-Lymphozyten und antigenpräsentierende dendritische Zellen. Im B Zell Bereich findet man unterschiedliche Populationen von B Zellen, die um follikulär dendritische Zellen (FDC) angeordnet sind. Hat noch kein Antigenkontakt stattgefunden, so nennt man diese Anordnung Primärfollikel. Bei Antigenkontakt bilden sich Sekundärfollikel aus. Dabei haben sich in den Primärfollikeln Keimzentren ausgebildet in denen Plasmazellen reifen, die hochaffine IgG Antikörper gegen das jeweilige Antigen bilden. Die Keimzentren werden von einer Korona umgeben, welche den nicht beteiligten restlichen B Zellen entpricht. In der Marginalzone findet sich eine spezialisierte B Zell Population (Marginalzonen B Zellen), Makrophagen und retikulären Zellen (Kraal et al., 1992). Aufgabe der Marginalzone ist das Abfangen von Antigen, bzw. Einschleusen von antigenpräsentierenden Zellen aus dem Blut in die weiße Pulpa, damit eine Immunantwort gegen das Antigen induziert werden kann (Kraal et al. 1992).

Die rote Pulpa besteht aus einem Maschenwerk aus Fibroblasten und Makropahgen sowie retikulären Fasern. Die Endäste der Aa. centrales bilden hier ein kapillares Stromgebiet welches sich zu Sinusoiden erweitert bevor sie in die Pulpavenen übergehen. Um die Sinusoide herum verdichtet sich dieses Maschenwerk zu Marksträngen, die eine Art Filter darstellen, um alte

kaputte Blutzellen zu eliminieren. Desweiteren findet man hier auch die oben bereits erwähnten Plasmazellen.

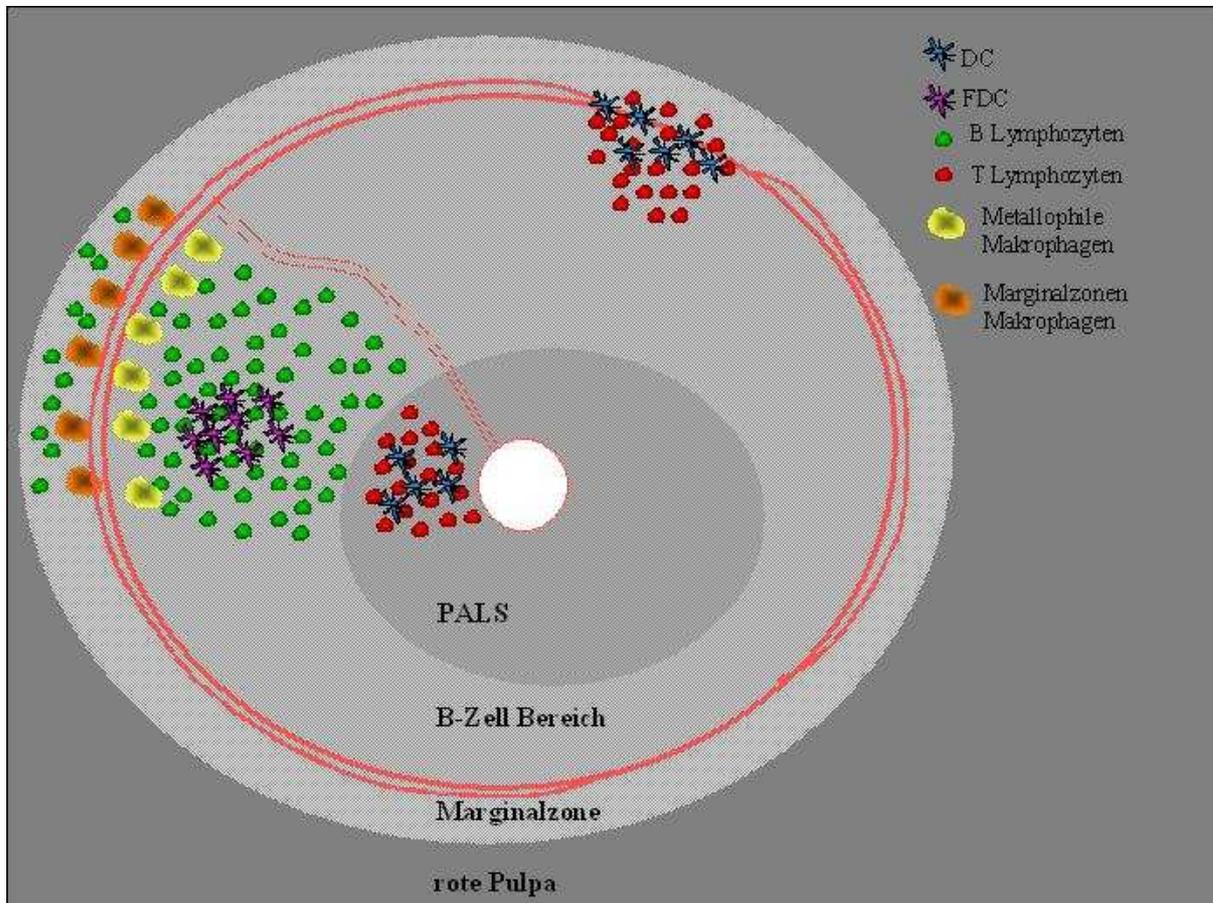


Abb. 4: Schematischer Grundriß der weißen Pulpa der Milz. In der Mitte die PALS-Region mit T Zellen und dendritischen Zellen. Darum liegen B Zellen, teilweise um FDC in Follikeln gruppiert. Im Bereich der Marginalzone findet man neben spezialisierten B Zellen den Marginalsinus der von metallophilen und marginalzonen Makrophagen flankiert wird. An manchen Stellen besitzt der Marginalsinus Öffnungen (Bridging Channels) die zusätzlich zur Lymphozytenwanderung dienen. (FU and Chaplin, 1999)

1.4.2 Entwicklung der weißen Pulpa

Die Entwicklung der Milz ist noch nicht so umfangreich untersucht worden wie die der Lymphknoten und Peyer'schen Plaques. Die Entwicklung beginnt am Tag 11,5/12,5 der Embryogenese durch Kondensation und Proliferation von $Hox11^+$ mesenchymalen Zellen im dorsalen Bereich des Magens (37). Desweiteren sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren bekannt, die ebenso für eine fehlerfrei Entwicklung von Nöten sind, auf die im Weiteren aber nicht mehr weiter eingegangen wird (Herzer et al.; Triboli et al.; Lettice et al.; Lu et al.; Pabst

et al.; Wang et al.). Die ersten haematopoietischen Zellen erscheinen am Tag 15,5 der Embryogenese. Betrachtet man die Entwicklung der weißen Pulpa unter dem Gesichtspunkt des Einflusses des TNF/LT Systems, so sollte man drei Bereiche unterscheiden. Die Ausbildung von getrennten T- und B Zellbereichen, die Ausbildung von FDC-Netzwerken mit Keimzentren und die Ausbildung einer Marginalzone.

T/B Segregation

Grundsätzlich ist der Aufbau der weißen Pulpa den Lymphknoten und Peyer'schen Plaques sehr ähnlich. Betrachtet man die Segregation in T und B Zellbereiche so findet man ebenso $LT\beta$ -R⁺ Stromazellen, die durch Expression von Chemokinen und Adhensionsmolekülen die Migration der jeweiligen Zellen steuern. In den Follikeln findet man Stromazellen welche CXCL13 produzieren und so die $CXCR5$ ⁺ B-Zellen bzw. follikulär dendritische Zellen (FDC) in die Follikel wandern lassen. Hauptproduzent für die Stimulation der Stromazellen durch $LT\alpha_1\beta_2$ sind dabei die B Zellen selber (8,16,18). In der PALS scheint nach aktuellen Studien ein ähnlicher Feedbackprozeß stattzufinden. Die dort lokalisierten $LT\beta$ -R⁺ Stromazellen exprimieren CCL19 und CCL21 und veranlassen so die Migration von $CCR7$ ⁺ T Zellen und aktivierten DCs (3,12,32,33). Die Produktion von $LT\alpha_1\beta_2$ erfolgt hierbei durch naive $CD4$ ⁺ T Zellen. Die Expression von $LT\alpha_1\beta_2$ auf T Zellen wird wie in den Lymphknoten und Peyer'sche Plaques ebenso durch IL-7 induziert (25). Die Segregation in T und B Zellbereiche ist nach der Geburt fixiert (Fu and Chaplin, et al., 1997). Grundsätzlich bleibt festzuhalten, daß die Stimulation der Stromazellen über den $LT\beta$ -R allein durch B und T Lymphozyten nicht ausreicht. Ca. 60% des LT wird von B Zellen und 20% von T Zellen produziert. Man vermutet noch weitere bisher unbekannte Zellpopulationen. (Tumanov et al. 2003) .

FDC-Netzwerke und Keimzentren

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Keimzentren bedarf der Interaktion von antigenpräsentierenden FDC und follikulären B Zellen. Im weiteren Verlauf entstehen Plasmazellen welche hochspezifische IgG Antikörper gegen das entsprechende Antigen bilden. Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass auch eine spezialisierte Population von T Zellen Einfluß auf die Ausbildung der FDC-Netzwerke und damit Einfluß bei der humoralen Immunantwort hat (10,42). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass für eine korrekte Ausbildung und Funktion der Follikel und die Fähigkeit zur Bildung von Keimzentren sowohl die Migration der T und B Lymphozyten in ihre Kompartimente, als auch die Reifung und Migration der FDC keine Defekte aufweisen dürfen. Folglich kann man ähnliche Phänotypen bei unterschiedlichen Knock-

outmäusen finden. Sowohl bei den $TNF^{-/-}$ / $TNFRp55^{-/-}$ als auch bei den $LT^{-/-}$ Mäusen fehlen die FDCs. Allerdings scheint der Grund unterschiedlich. Bei den $TNF^{-/-}$ / $TNFRp55^{-/-}$ Mäusen können sich keine Keimzentren bilden, da hier die FDC's nicht in die Follikel migrieren können (siehe unten), der B Zellbereich ist aber noch vom T Zellbereich getrennt. In den LT -Liganden und LT -Rezeptor KO fehlen die Keimzentren ebenso, allerdings ist hier sowohl die Binnenstruktur der T und B Zellbereiche als auch die der Marginalzone defekt (siehe oben). So versagt die Chemokin gesteuerte Migration der Lymphozyten, DC's und der FDC's in die Kompartimente und die Zellen vermischen sich, bzw. im Fall der FDC's gelangen diese überhaupt nicht in die B Zellbereiche.

Die Ausbildung und Funktion der FDC-Netzwerke und Keimzentren bedarf der permanenten $LT\alpha_1\beta_2$ Expression vornehmlich durch B Zellen und zu geringem Anteil auch durch T Zellen (42). So kommt es zum Beispiel in adulten Mäusen nach Applikation von $LT\beta$ -Fusionsproteinen, welche die Stimulation der Stromazellen blockieren, zum Verlust der FDC-Netzwerke und Keimzentren (17). Dagegen läßt sich in den $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen, die normalerweise keine Keimzentren mehr ausbilden können, durch Knochenmarktransfer mit Wildtyp Knochenmark (Fu and Chaplin et al., 1999) oder durch Überexpression von LIGHT Wang et al.) die Ausbildung von FDC-Netzwerken und Keimzentren induzieren.

Marginalzone

Die Marginalzone (MZ) der Milz begrenzt die weiße Pulpa nach außen und dient als eine Art Checkpoint für Antigen welches über das Blut oder antigenpräsentierende Zellen in den lymphatischen Teil der Milz gelangt. Über die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der MZ führen, ist noch nicht viel bekannt. Aufgebaut ist die Marginalzone aus einem Netzwerk aus retikulären Zellen, spezialisierten Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Entwicklung der MZ hängt in erster Linie von Signalen über den $LT\beta$ -R ab. So fehlt die MZ und die normalerweise dort lokalisierten Zellen in den LT -Liganden und LT -Rezeptor Knockout Mäusen (Banks et al., Alimanzhov et al., Pasparakis et al., Futterer et al.). Das $TNF/TNFRp55$ System hat wohl ebenso Einfluß auf die Ausbildung und Funktion der Marginalzone. In den $TNF^{-/-}$ / $TNFRp55^{-/-}$ Mäusen kommt es zur Entwicklung einer Marginalzone, die allerdings eine Reduktion der Anzahl der Stromazellen und Makrophagen aufweist (22,36). Pasparakis fand desweiteren heraus, dass sich FDCs in der Marginalzone von $TNF/TNFRp55$ defizienten Mäusen ansammeln und nicht in die Follikel wandern können (36). Ob hier die Reifung der FDCs und/oder eine gestörte Funktion der lokalisierten Stromazellen vorliegt, bedarf noch

weiterer Untersuchungen. Auf jeden Fall scheint die Ausbildung der Marginalzone durch LT-abhängige Signale früh in der Organentwicklung stattzufinden und kann im späteren Leben nicht mehr kompensiert werden (Wang et al., FU et al.2001) . Auch die Quelle des für die MZ benötigten LT ist noch nicht komplett geklärt. Fest steht, dass sowohl B als auch T Zellen an der $LT\alpha_1\beta_2$ Produktion an der Entwicklung der MZ beteiligt sind, aber weitere Zellpopulationen müssen noch gefunden werden. (Tumanov et al.2003).

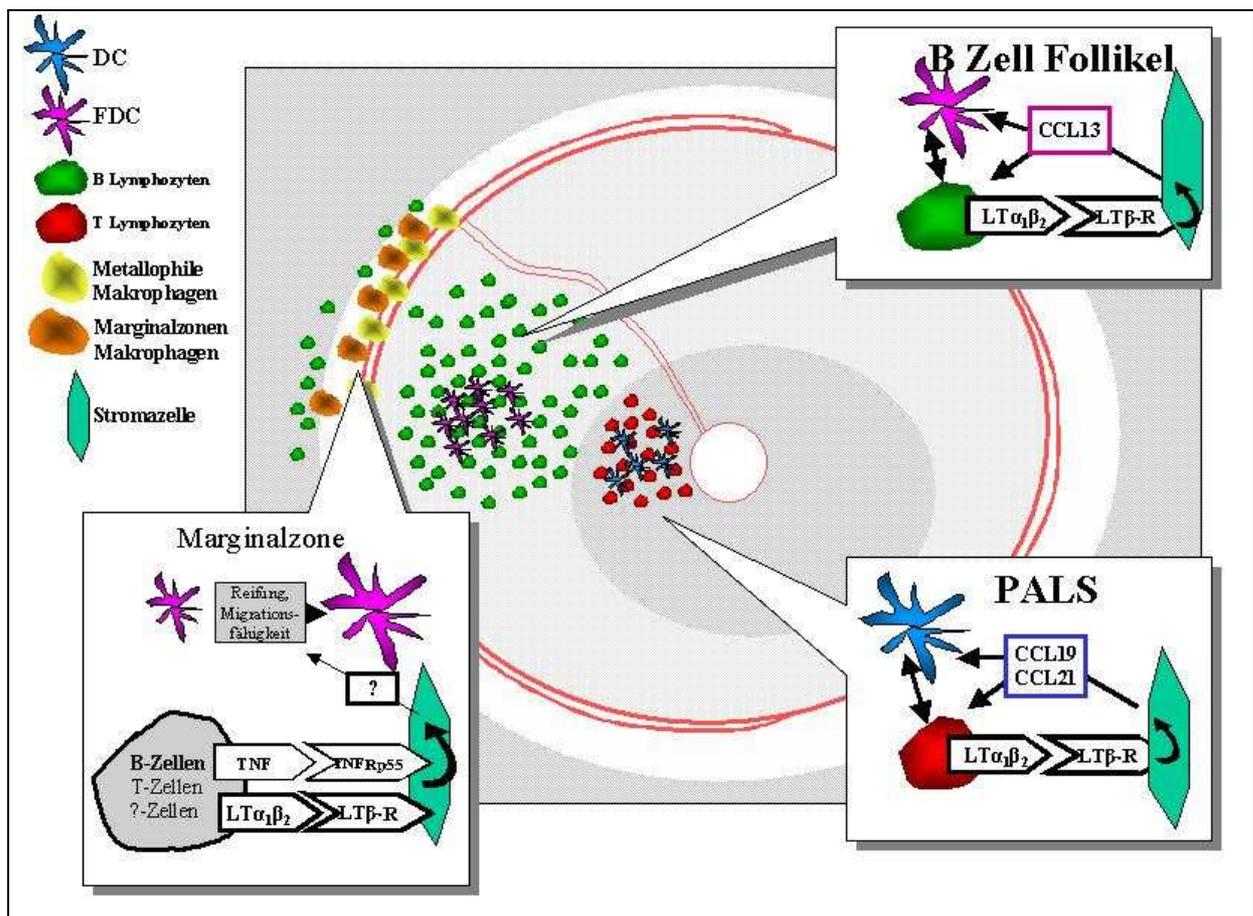


Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktion der Stromazellen mit den jeweiligen Zielzellen

PALS: T-Lymphozyten exprimieren $LT\alpha_1\beta_2$ und stimulieren so die Stromazellen zur Chemokinproduktion (CCL19, CCL21) wodurch weitere T-Lymphozyten einwandern. **B-Zellbereich:** B Zellen produzieren $LT\alpha_1\beta_2$ und stimulieren so Stromazellen zur CXCL13 Produktion wodurch weitere B Zellen und FDC einwandern. **Marginalzone:** Entscheidend für die Entwicklung der Marginalzone sind Signale über den $LT\beta$ -R von Stromazellen. Aber auch TNF hat einen Einfluß. Man findet in den $TNF^{-/-}$ Tieren eine Störung der Migration mit Anhäufung von FDC-Vorläufern in der aberrant entwickelten MZ.

Natural Killer Zellen (NK Zellen) und NK-T-Zellen

Bei NK und NK T Zellen handelt es sich um Zellpopulationen die sich aus den haematopoietischen Vorläuferzellen entwickelt haben und für die Entwicklung von Lymphknoten und Peyer'sche Plaques wichtig sind (29). NK Zellen lysieren Tumorzellen falls diese keine oder nur minimale Mengen MHC-Moleküle exprimieren (Trinchieri and Santoli, 1978; Stern et al., 1980) Durch die Fähigkeit Zellen mit fehlender bzw. erniedrigter Expression von MHC-I-Molekülen zu erkennen, stellen NK Zellen ein funktionell komplementäres System zu den T Zellen dar, das veränderte Zellen dann erkennt, wenn sie für T Zellen „unsichtbar“ sind (41). Natural Killer T-Zellen sind eine Subpopulation von Lymphozyten, die in der Lage sind, eine Reihe von Zielzellen, u.a. Tumor- und virusinfizierte Zellen zu lysieren und nach Aktivierung Zytokine (wie z.B. $\text{IFN}\gamma$ und TNF) zu sezernieren. Zytotoxische T Zellen lysieren Zellen die Fremdantigene in Zusammenhang mit dem Selbst-MHC präsentieren (Zinkernagel and Doherty, 1974; Zinkernagel and Doherty, 1997).

Für die Entwicklung von NK Zellen scheint wiederum die Interaktion $\text{LT}\beta\text{R}^+$ Stromazellen im Knochenmark mit $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ produzierenden Zellen wichtig zu sein (20,43). NK T-Zellen sind charakterisiert durch die Expression von NK Zell Rezeptoren, TCR- $\alpha\beta$ und Oberflächenproteinen, die typisch für aktivierte T-Zellen sind. Man findet diese Zellen in der Milz, Leber, Knochenmark und Thymus in einer relativ konstanten Größenordnung von $\sim 10^6$ Zellen/Organ (13). Die Entwicklung von NK T-Zellen scheint über Signale des $\text{LT}\beta$ -R gesteuert zu werden. Sowohl in der $\text{LT}\alpha$ als auch in der $\text{LT}\beta^{-/-}$ Maus findet man eine ähnliche Reduzierung der NK-T Zellen in den jeweiligen Organen und gleichzeitig auch eine reduzierte Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 nach TCR stimulation (13,46).

Nachweislich ist die Funktion von NK- und NK T- Zellen durch Signale des LT-Systems beeinflusst. In $\text{LT}\alpha^{-/-}$ und $\text{LT}\beta\text{-R}^{-/-}$ ist die Anzahl und auch die Zytotoxizität dieser Zellen reduziert. In $\text{TNF}^{-/-}$ Mäusen hingegen nicht. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die $\text{LT}\beta$ defizienten Mäuse. Diese Mäuse bei der man regelmäßig mucosa-assoziierte LK findet, zeigen keine Veränderungen der NK und NK-T Zellen (39). Dies ist insofern wichtig, da man vermutet dass die Ausbildung von LK und auch NK Zellen von darm-assoziierten $\text{CD4}^+\text{CD3}^-$ $\text{IL7R}\alpha^+\text{LT}\alpha_1\beta_2^+$ hematopoietischen Vorläuferzellen abhängig ist. Eventuell korreliert daher die Fähigkeit zur Ausbildung von mesenterialen und cervikalen LK und der fehlende Defekt in der NK und NK-T Entwicklung mit einer uneingeschränkten Reifung und Entwicklung dieser Vorläuferzellen. Diese Tatsache wird z.B. durch die $\text{LT}\alpha^{-/-}$ indirekt bestätigt. Bei der $\text{LT}\alpha$

Maus welche wie gesagt weder mucosa-assoziierte LK noch normale NK und NK-T Zell Zahl und Funktion besitzt (13,39), wurde eine geringere Anzahl an haematopoietischen Vorläuferzellen festgestellt (21).

1.5 Moleküle, die neben dem TNF/LT System für die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen Bedeutung haben

Man weiß, dass über den *IL7-R* die $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R^+$ Zellen zur Produktion von $LT\alpha_1\beta_2$ stimuliert werden. Fehlen Signale über diesen Rezeptor, so fehlen die PP und einige Lymphknoten (inguinale, popliteale, iliaceale und sacrale). Die brachialen, axillären und mesenterialen LK hingegen sind nicht von IL7-R Signalkaskade abhängig (30).

In *Ikaros* defizienten Mäusen fehlen NK-Zellen, dendritische Zellen und B und T Zellen, genauso wie Lymphknoten und Peyer'sche Plaques. Man vermutet ein Entwicklungsdefekt der die Differenzierung von $IL-7R^+$ fetalen Leberzellen zu $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7-R^+$ betrifft (7).

Für die weitere Entwicklung von $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7-R^+$ Zellen wird **ROR γ** (Retinoid-related orphan receptor γ) (40) und **Id2** (44) benötigt. *ROR γ* und *Id2* defiziente Mäuse besitzen ebenso keine LK und PP.

Für die Entwicklung der Lymphknoten und Peyer'schen Plaques sind Signale über das **CXCR5/CXCL13** System erforderlich. Vermutlich kommt so der Kontakt von mesenchymalen $LT\beta-R^+$ Stromazellen und ersten $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierenden Zellen zustande, welcher als Basis für die weitere Organentwicklung dient. So zeigen die CXCR5/CXCL13 defizienten Mäuse eine variable inkomplette Penetranz für fast alle LK. Der mesenteriale LK entwickelt sich aber immer. Darüberhinaus kommt es zur Zerstörung von B Zellfollikeln und den Verlust der FDC in der Milz (Ansel et al.2000; Cyster et al.2000). Nach Immunisierung allerdings entstehen ektope Keimzentren und FDC-Netzwerke (Voigt et al.1999). Darüberhinaus benötigen B Zellen die CXCR5/CXCL13 Wechselwirkung, um in die Follikelbereiche wandern zu können (Honda et. al. 2001; Mebius et al. 1997). In der CXCR5 defizienten Maus kann auch nach der Geburt durch Transfer von fetalen $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R^+$ Zellen die Bildung von Peyer's Plaques induziert werden (14).

Ein weiteres TNF Mitglied, das bei der Entwicklung von Lymphknoten aber nicht PP beteiligt zu sein scheint ist *TRANCE* (TNF-related activation induced cytokine) und der entsprechende Rezeptor *TRANCE-R*. Trance spielt in der initialen Induktion von LITC zur $LT\alpha_1\beta_2$ Expression ein Rolle, indem es sowohl Einfluß auf die Entwicklung der haematopoietischen Vorläuferzellen als auch auf $LT\alpha_1\beta_2$ Produktion hat (21).

1.6 Schematische Zusammenfassung

Tab. 1. 3: sekundär lymphatische Organe in TNF/LT defizienten Mäusen

Genotyp	Milzarchitektur				Lymphknoten	Referenzen
	Marginalzone	T/B - Segregation	Keimzentren / FDC	Peyer's Patch		
$LT\alpha^{-/-}$	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	abwesend, selten mesenterialen LK	Banks et al., 1995 ; De Togni et al., 1994
$LT\beta^{-/-}$	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	mukosale LK vorhanden	Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997, Alexopoulou et al., 1998
$TNF\alpha^{-/-}$	defekter Marginalsinus; MZ M ϕ und metallophile M ϕ reduziert	vorhanden, aber B-Zellen liegen nur als Ring um T-Zellen	abwesend	vorhanden, aber klein	alle vorhanden	Pasparkis et al., 1996; Marino et al., 1997 ; Pasparkiset al., 2000 ; Komer et al., 1997
$LT\alpha^{-/-} / TNF\alpha^{-/-}$	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	abwesend	Eugster et al., 1996
$LT\beta^{-/-} / TNF\alpha^{-/-}$	abwesend	variabl	abwesend	abwesend	mukosale LK vorhanden	Kuprash et al., 1999
$LT\beta-R^{-/-}$	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	abwesend	Futterer et al., 1998
$TNFRp55^{-/-}$	defekter Marginalsinus; MZ M ϕ und metallophile M ϕ reduziert	vorhanden	abwesend	reduziert / abwesend	alle vorhanden	Neumann et al., 1996; Le Hirt et al., 1996 ; Pfeffer et al., 1993 ; Rothe et al 1993 ; Pasparkis et al., 2000
$TNFRp75^{-/-}$	defekter Marginalsinus; MZ M ϕ und metallophile M ϕ reduziert	vorhanden	vorhanden	vorhanden	alle vorhanden	Erickson et al., 1994 ; Pasparkis et al., 2000

TNFRp55 ^{-/-} / TNFRp75 ^{-/-}	defekter Marginal- sinus; MZ Mφ und metallophile Mφ re- duziert	vorhanden	abwesend	reduziert / abwesend	alle vorhanden	Ettinger et al., 1996; Pasparkis et al., 2000
TNFRp55 ^{-/-} / LTβ ^{-/-}	n.b. ^a	n.b.	n.b.	abwesend	abwesend	Koni and Flavell, 1998
TNFRp75 ^{-/-} / LTβ ^{-/-}	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	mukosale LK vor- handen	Koniand Flavell 1998

Tab. 1.4: Auswirkung der Inhibition von TNF/LT Ligand/Rezeptor Interaktion

Genotyp	Milzarchitektur				Lymphknoten	Referenzen
	Marginalzone	T/B - Segregation	Keimzentren / FDC	Peyer's Patch		
LT β Rezeptor - Fc Transgen	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	reduziert / abwesend	vorhanden	Ettinger et al., 1996;
LT β Rezeptor - Fc oder anti LT β mAK in utero	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	mukosale LK vorhanden. variable Anzahl an peripheren LK je nach Behandlungsbeginn	Rennert et al., 1996 ; Rennert et al., 1997
LT β Rezeptor - Fc oder Anti LT β mAK in adulter Maus	abwesend	vorhanden, aber B-Zellen liegen nur als Ring um T-Zellen	abwesend	vorhanden	alle vorhanden	Mackay et al., 1997 ; Mackay and Browning 1998
TNFRp55 - Fc Transgen	defekter Marginalsinus; MZ M ϕ und metallophile M ϕ reduziert	vorhanden, aber B-Zellen liegen nur als Ring um T-Zellen	abwesend	vorhanden aber desorganisiert	vorhanden	Ettinger et al., 1998;
TNFRp55 - FC in utero	defekter Marginalsinus; MZ M ϕ und metallophile M ϕ reduziert	vorhanden, aber B-Zellen liegen nur als Ring um T-Zellen	abwesend	vorhanden	vorhanden	Rennert et al., 1996
TNFRp55 - FC in adulter Maus	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	Mackay et al., 1997; Mackay and Browning, 1998
TNFRp55 - LT β Rezeptor - Fc in utero	n.b.	n.b.	abwesend	abwesend	nicht vorhanden	Neumann et al., 1996; Le Hirt et al., 1996 ; Pfeffer et al., 1993 ; Rothe et al 1993 ; Pasparkis et al., 2000
LT α ^{-/-} mit agonistischem anti LT β Rezeptor – mAK in utero	abwesend	nicht vorhanden	abwesend	abwesend	mukosale, periphere und carnial gelegene LK vorhanden	Rennert et al., 1998
LT α ^{-/-} mit TNF Transgen	abwesend	vorhanden, aber B-Zellen liegen nur als Ring um T-Zellen	reduziert	abwesend	nicht vorhanden	Alexopoulou et al., 1998

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Kern der Arbeit war es, eine Bilddatenbank von Milzhistologien mittels konfokaler Mikroskopie anzufertigen, um einen kompletten Überblick über die Phänotypen der Knockouts der TNF/LT Superfamilie zu erhalten. Die Vorteile dieser Technik liegen nicht nur in kontrastreicherer und detaillierteren Bildern, sondern auch in der schnellen Erzeugung digitaler Bilddaten, die dann sehr leicht durch gängige Bildbearbeitungsprogramme weiterverarbeitet und archiviert werden können. Obwohl die Knockout Mäuse der TNF/LT Superfamilie bisher umfangreich untersucht wurden gibt es immer noch ungeklärte Sachverhalte. Mit der Bilddatenbank sollte daher ein systematischer Versuch unternommen werden noch ungeklärten Sachverhalten nachzugehen und zu überprüfen.

Der $LT\beta$ -R nimmt sicherlich die Schlüsselstellung für die Übermittlung von Signalen ein, die für den Aufbau von sekundären lymphatischen Organen nötig sind. Dementsprechend zeigt die $LT\beta$ -R defiziente Maus in allen untersuchten Bereichen das schwerwiegendste Defektbild. Die Liganden für den $LT\beta$ -R wurden ebenso untersucht, doch besitzen die Knockouts dieser Mäuse meist nicht den selben ausgeprägten Phänotyp. In der $LT\alpha^{-/-}$ Maus entwickeln sich in 5% der Fälle mesenteriale und cervicale LK. Da der wichtigste Ligand für den $LT\beta$ -R $LT\alpha_1\beta_2$ ist und in der $LT\alpha^{-/-}$ Maus die Expression von $LT\beta$ und umgekehrt in der $LT\beta^{-/-}$ Maus weiterhin $LT\alpha$ produziert werden kann, kann man die Vermutung anstellen ob in diesem Fall eine „Reststimulation“ des $LT\beta$ -R erfolgt. Daneben stellten A.S. Johansson und D.D. Chaplin die Vermutung an, dass durch die Knockoutkonstruktion der $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse der Phänotyp grundsätzlich durch eine TNF Minderexpression verursacht bzw. moduliert wird. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde eine $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ doppeldefiziente Maus generiert. Bei der $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus wurden die Gene mittels CRE-loxP vermittelter Deletion eliminiert (unpubliziert). Einerseits konnte so eine alterierte TNF Expression vermieden werden, andererseits wurde der wichtigste Ligand für den $LT\beta$ -R, das $LT\alpha_1\beta_2$ komplett entfernt. So konnte der alleinige Einfluß dieser Liganden untersucht werden.

Generell bleibt aber auch festzuhalten dass es noch unbekannte Liganden für den $LT\beta$ -R geben kann. Daher sollte man neben den TNF/LT Liganden und Rezeptoren auch LIGHT und den HVEM berücksichtigen. Scheu et al. (38) stellte durch Kreuzung von $LIGHT^{-/-}$ mit $LT\beta^{-/-}$ eine $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ doppeldefiziente Maus her. Diese zeigt dann ein vermindertes Auftreten

von mesenterialen LK, die bei der $LT\beta^{-/-}$ Maus immer gebildet werden. Dieser Synergieeffekt beider Gene könnte auch in der Milz zu Veränderungen geführt haben. $LT\alpha$ kann auch an HVEM binden. Hierdurch könnte ebenso der Phänotyp der $LT\alpha$ defizienten Maus beeinflusst werden. Eine umfangreiche Analyse der Milzhistologien von LIGHT, LIGHT/ $LT\beta^{-/-}$ und HVEM Maus sollte diesbezüglich klare Informationen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweise

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikale	Bezugsquelle
Antikörper	Becton-Pharmingen, Hamburg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fluoromount G	Biozol, Eching
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Penicillin, Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ziege-Normal.Serum	Dianova, Hamburg

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
Avidin/Biotin-Block Kit	Vector Labs, USA
Cryomold® Gewebeschaln	Miles Ins., USA
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments, Nussloch
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Ass.Inc., USA
Objektträger Super-Frost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig

Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden, Falcon, New Jersey, USA Corning, New York, USA
Zellsiebe (70µm)	Falcon, USA

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank	Cytoperm, Heraeus, Hanau
Kryotom	Jung CM3000, Leica, Nussloch
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln Omnifuge 2.0 RS, Heraeus, Hanau Sorvall® RC 26 PLUS, Heraeus, Hanau
Mikroskope	ID 03, Zeiss, Jena DMBRE, Leica, Bensheim LSM510, Zeiss, Jena
pH-Meter	761 Calimetic, Knick
Sterilbank	HLB 2472 GS, Heraeus Hanau
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 15, Heraeus, Hanau Biofuge 15R, Heraeus, Hanau
Waagen	Sartorius, Göttingen

2.1.4 In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Hersteller
Sigmaplot for Windows V 8.0	SPSS Inc., USA
Adobe Photoshop V 6.0	Adobe Systems, USA
Microsoft Word 2000	Microsoft Corporation, USA

2.2 Medien und Puffer

Medium oder Puffer	Zusammensetzung	
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM	NH ₄ CL
	10% (v/v)	Tris-HCL, pH=7,65 pH=7,2
Facs Färbepuffer	1x	PBS
	0,5% (w/v)	BSA
	0,01% (w/v)	NaN ₃

2.3 Antikörper und Zweitreagenzien

2.3.1 monoklonale Antikörper

Name	Klon	Isotyp	Format	Antigen	Hersteller
B220	RA3-6B2	Ratte IgG _{2a} , κ	PE, Fitc	B-Lymphozyten	BD Pharmingen
CD3ε	145-2C11	Arm.Hamster IgG1, κ	PE, Fitc, Bio	Thymozyten, T-Lymphozyten, NK-T-Zellen	BD Pharmingen
CD4 (L3T4)	RM4-5	Ratte IgG _{2b} , κ	PE, Fitc	T-Helfer-Zellen	BD Pharmingen
CD8a (Ly-2)	53-6.7	Ratte IgG _{2a} , κ	PE, Fitc	Thymozyten, T-Suppressor-Zellen, T-zytotoxische-Zellen	BD Pharmingen
CD11c	HL3	Armenischer Hamster IgG1, λ	Bio	dendritische Zellen, intraepitheliale Lym- phozyten	BD Pharmingen

CD19	1D3	Rat IgG _{2a} , κ	PE, Fitc	B-Lymphozyten	BD Pharmingen
CD21	7G6	Rat IgG _{2b} , κ	PE, Fitc	B-Lymphozyten, follikulär dendritische Zellen, peritoneal Makrophagen	BD Pharmingen
CD23	B3B4	Rat IgG _{2a} , κ	PE, Fitc, Bio	B-Lymphozyten	BD Pharmingen
CD16/32	2.4G2	Rat IgG _{2b} , κ		Maus FcγII/III Rezeptor	BD Pharmingen
NK1.1	PK136	Mouse IgG _{2a} , κ	PE	NK-Zellen, NK-T-Zellen	BD Pharmingen
DX5	DX5	Rat IgM, κ	Fitc	NK-Zellen	BD Pharmingen
IgM	R6-60.2	Rat IgG _{2a} , κ	PE, Bio	B-Lymphozyten	BD Pharmingen
IgD	11-26c.2a	Rat IgG _{2a} , κ	Fitc	B-Lymphozyten	BD Pharmingen
MHCII					
CD169(3D6)					
MOMA-1	MOMA-1	Ratte IgM		Metallophile Makrophagen	Dianova
ER-TR9	ER-TR9	Ratte IgM		Marginal Zonen Makrophagen	Dianova
PNA				Marginalsinus, FDC, Bindegewe- be	Vector Labs
Fc-Block (CD16/32)	2.4G2	Ratte			BD Pharmingen

2.3.2 In dieser Arbeit verwendete Zweitreagenzien

Name	Spezifität	Absorptionsmax	Emissionsmax	Hersteller
Streptavidin Alexa Fluor™ 488 Konjugat	biotinylierter Antikörper	495	519	Molecular Probes, USA
Streptavidin Alexa Fluor™ 546 Konjugat	biotinylierter Antikörper	556	573	Molecular Probes, USA
Streptavidin-PE (Phycoerythrin)	biotinylierter Antikörper	480 / 565	578	BD Pharmingen
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rat Konjugat	Rat IgG(H+L)	495	519	Molecular Probes, USA
Alexa Fluor™ 546 goat anti-rat Konjugat	Rat IgG(H+L)	556	573	Molecular Probes, USA
Fitc	Farbstoff von direkt markierten Antikörpern	494	520	BD Pharmingen
Streptavidin-PerCP	biotinylierter Antikörper			
Cy5	Farbstoff von direkt markierten Antikörpern			

2.4 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten. Alle Versuche wurden mit Inzucht Mäusen im Alter zwischen 8 und 16 Wochen durchgeführt. Die C57BL/6 Mäuse wurden vom Institut für Versuchstierzüchtung Charles River, Hannover, bezogen. Die verwendeten Knockout Mäuse wurden mindestens 6-fach auf den C57BL/6 kongenen Hintergrund rückgekreuzt, wo sie als homozygot defiziente Zucht vermehrt wurden.

2.5 Zelluläre Arbeitsmethoden

2.5.1 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen wurden die Versuchstiere durch Genickbruch oder durch CO₂-Begasung getötet. Die Organe wurden durch Desinfektin des Operationsgebiets mit 70% EtOH steril entnommen.

2.5.2 Kultivierung von Splenozyten

Nach Organentnahme der Mäusemilzen wurde die Milz in Medium über ein 70µm Zellsieb homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurden nach Zentrifugation (1400 UpM für 5 min) das Zellpellet in 3ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen sind anhand ihrer Blaufärbung von vitalen zu unterscheiden und wurden nicht mitgezählt.

2.5.3 Kultivierung von Leukozyten aus peripherem Blut

Nach Eröffnung des Abdomens der Mäuse wurde eine Braunüle (Größe G14) in die Aorta abdominalis eingebracht und mittels heparinierter Spritze ca. 500µL Blut entnommen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden anschließend in einem Lymphlyte-Gradienten eingebracht. Nach Zentrifugation für 20 min trennen sich Erythrozyten und Leukozyten in zwei diskontinuellen Schichten ab. Die weiße Schicht der Leukozyten wurde in Medium übernommen und zweimal mit Medium gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung eines Aliquots und Zählung in den Neubauer Zählkammern wie oben beschrieben.

2.6 Analyse von Gewebeschnitten mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop

2.6.1 Die Aufbereitung von Gewebeschnitten

Die Organe wurden nach der Entnahme in Enbettmedium (Firma Leica) eingegossen, in N₂-gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Gewebeblöcke wurden anschließend mit dem Mikrotom in 5-8 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Diese Objektträger wurden dann 15 min bei RT luftgetrocknet, bevor sie in eisgekühltem Aceton 8 min fixiert und bei -80°C aufbewahrt wurden. Unmittelbar vor der Färbeprozedur wurden die aufgetauten Schnitte in PBS für 5 min bei RT rehydriert. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt.

2.6.2 Färbeprozedur

Alle Organe wurden nach dem selben Färbeprotokoll behandelt.

Schritt 1: Avidin/Biotin-Block

- Pro Objektträger werden 100 μL PBS/BSA-Gemisch, 10 μL Normal Goat serum und 1 Tropfen Avidin vermischt und aufgetragen
- anschließend 20 min Inkubation
- 3x5 min Waschung in PBS
- Pro Objektträger werden 100 μL PBS/BSA-Gemisch und 1 Tropfen Biotin vermischt und aufgetragen
- anschließend 20 min Inkubation
- 3x5 min Waschung in PBS

Schritt 2: Primärer Antikörper

- Pro Objektträger werden in 200 μL Antikörper-Gemisch hergestellt. Der primäre Antikörper wird dabei in einer austitrierten Verdünnung eingesetzt.
- anschließend 45 min Inkubation
- 3x5 min Waschung in PBS

Schritt 3: Sekundärer Antikörper

- Pro Objektträger werden in 200 μL Antikörper-Gemisch hergestellt. Der sekundäre Antikörper wird dabei in meiner empfohlenen Verdünnung eingesetzt
- anschließend 45 min Inkubation
- 3x5 min Waschung in PBS

Schritt 4: Fixierung und Eindeckelung

- auf das noch feuchte Organ wird nun ein Tropfen Fluoromount G aufgetragen und mit einem Deckgläschen versehen.
- Die Gefrierschnitte können nun im Kühlschrank für ca. 1 Woche gelagert werden.

2.6.4 Das konfokale Prinzip

Das grundlegende Prinzip des konfokalen Lasermikroskops ist es, ein Objekt punktweise zu bestrahlen und eine physikalische Wechselwirkung in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorzurufen (z.B. Fluoreszenz). Mittels eines Detektors wird das Signal dann punktweise gemessen und zu einem kompletten Bild aufgebaut. Das eigentlich Besondere an der konfokalen Mikroskopie ist aber eine Blende (konfokale Blende = Pinhole). Diese Blende liegt in der Zwischenbildebene, d.h. in einer zum Focus des Mikroskop-Objektivs konjugierten Ebene. Liegt der Focuspunkt im Präparat und das Pinhole in konjugierten Ebenen so liegen sie „konfokal“. Nur Licht aus dem mit dem Objektiv focussierten Bereich kann das Pinhole passieren. Licht das von über- oder unterhalb der Focusebene kommt wird weitestgehend an der Passage gehindert. Der Durchmesser des Pinholes legt das Maß an Objektpunkten fest, die obwohl außerhalb der Focusebene gelegen, trotzdem zum Detektor gelangen können. Dabei gilt, je kleiner das Pinhole desto mehr Licht außerhalb der Focus-Ebene wird ausgeblendet. Die kleinste Schichtdicke, die das LSM510 detektieren kann, sind 500 nm. Das konfokale Mikroskop ist daher tiefendiskriminierend. Gleichzeitig besitzt die Blende aber auch die Möglichkeit Streulicht zu unterdrücken und damit den Kontrast zu verbessern.

2.6.5 Der Strahlengang des Mikroskops (Abb. 6)

Als Lichtquelle dienen Laser. Verwendet wurden ein Argon-Laser mit 488 nm und ein Helium-Neon-Laser mit 543 nm. Das Licht wird mittels eines Farbteilers in den Strahlengang des Mikroskops gelenkt. Farbteiler (= dichroitischer Spiegel) haben die Eigenschaft, Licht niedriger Wellenlänge, in diesem Fall der Laser zu spiegeln, Licht längerer Wellenlänge wird durchgelassen. Das abgelenkte Licht trifft nun auf das Gewebe und führt dort zur punktuellen Anregung. Die vom Gewebe emittierte Strahlung wiederum kann, da es sich um Licht längerer Wellenlänge als das Licht der Laser handelt (siehe Erläuterung zu Fluoreszenz), unabgelenkt die Farbteiler passieren. Anschließend wird durch Emissionsfilter definierter Spektralbereiche sichergestellt, dass nur Licht mit der gewünschten Wellenlänge durchgelassen und damit detektiert werden kann. Da jede verwendete Fluoreszenz ihre separate Lasereinstellung, Farbteiler, Emissionsfilter, Blendeneinstellung und Belichtungsdauer benötigt, besitzt das LSM510 vier getrennt einstellbare konfokale Kanäle.

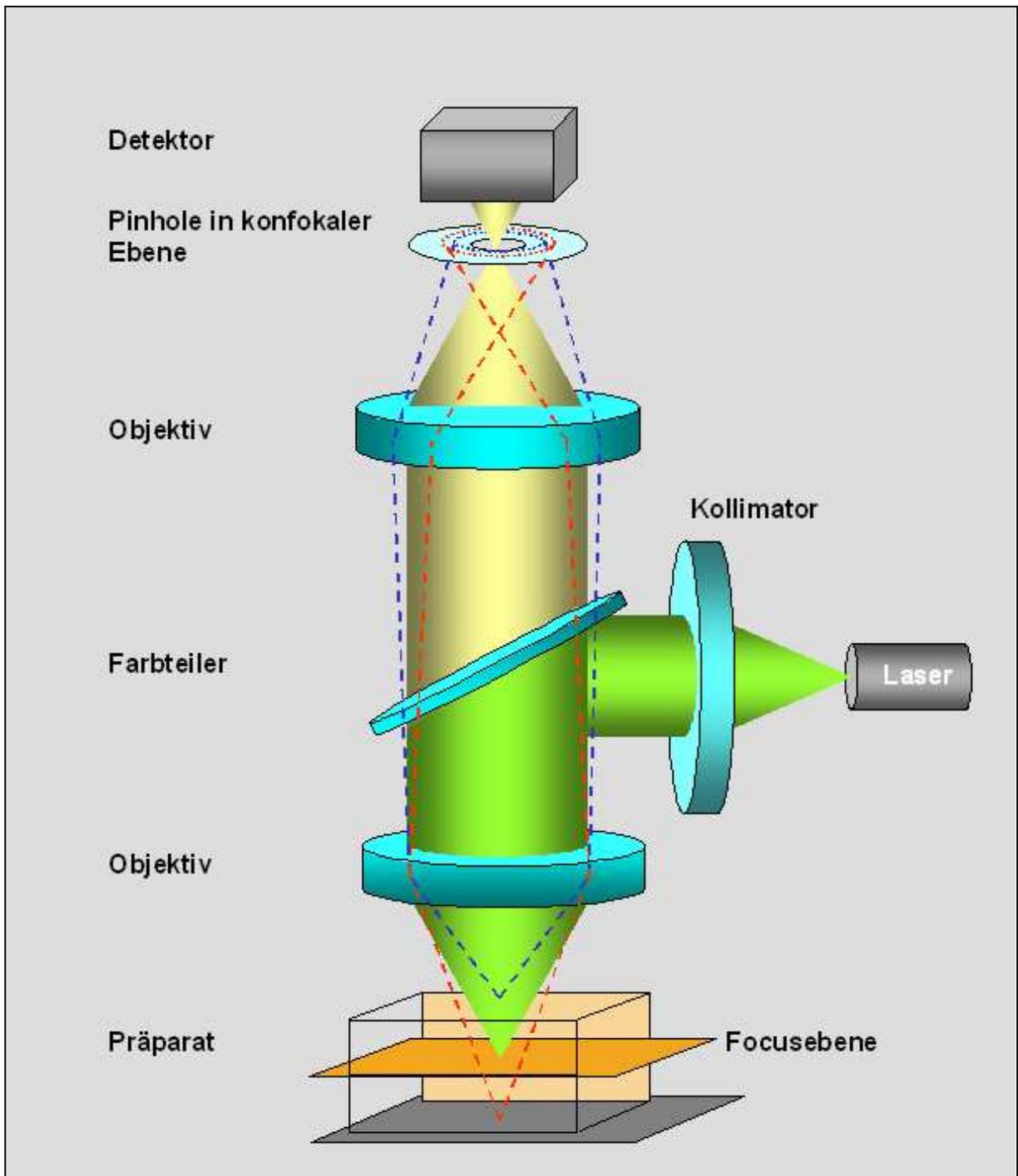


Abb. 6: Schema des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops. Die rot und blau gestrichelten Linien stellen emittiertes Licht außerhalb der Focusebene dar, welches nicht durch das Pinhole gelangen kann.

2.6.6 Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe

Im Gewebe wurden vorher durch die Immunfluoreszenzfärbung Antikörper eingebracht welche mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Durch Bestrahlung eines Fluorochroms mit Licht werden dessen Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Die Elektronen fallen schnell wieder auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von elektromagnetischer Strahlung freigesetzt. Diese emittierte Strahlung besteht aus Licht längerer Wellenlänge als das Licht das ursprünglich das Fluorochrom angeregt hat. Jedes Fluorochrom hat ein typisches Anregungsspektrum. Es sendet nach Anregung Licht eines charakteristischen Emissionsspektrums aus. Die Fluorochrome, die in dieser Arbeit ausgewählt wurden, besitzen ihr Anregungsmaximum (=Absorptionsmaximum) im Bereich der Wellenlänge des jeweils verwendeten Lasers. FITC und Alexa488 wurden mit dem Argon-Laser (488 nm) angeregt. PE und Alexa546 mit dem HeNe-Laser (543 nm). Der Detektor nimmt die Lichtintensität der emittierten Strahlung auf und wandelt sie in ein elektrisches Signal um. Der Farbton wird vom Benutzer mit der Software des Mikroskops frei festgelegt. Für FITC und Alexa488 wurde die Farbe grün und für PE und Alexa546 die Farbe rot zugewiesen. Die Konzentrationen der direktmarkierten Antikörper, bzw. von Zweitreagenzien wurde durch Testreihen so eingestellt dass die Einstellungen des Pinholes und damit die Schichtdicke des untersuchten Gewebes für jeden Farbstoff gleich ist.

Sättigungsverhalten der Emission

Die Emission der angeregten Fluorochrome ist abhängig von der Intensität der Laser. Je höher die Anregungsenergie, umso mehr Photonen können absorbiert werden und umso höher ist die Emissionsrate. Jedes Fluorochrom zeigt dabei ein Sättigungsverhalten, d.h. ab einer gewissen Anregungsenergie wird keine weitere Emissionssteigerung mehr erreicht.

Fading

Als weiteres Problem tritt bei wiederholter Bestrahlung des Gewebes ein Ausbleichen der Fluorochrome auf (=Fading / Photobleaching). Je höher die verwendete Laserintensität, umso höher ist der Farbstoffverbrauch.

2.6.7 Verwendung der Software

Bei der Lasermikroskopie muß man um sichtbaren Farben am Monitor zu erhalten, mit der der Steuerungssoftware die gewünschten Objektive, die Lasertypen sowie die Laserstärke,

Farbteiler, Filtersets, Scan-Geschwindigkeit, Auflösung und Pinhole eingestellt werden. Für jedes Fluorochrom wird ein konfokaler Kanal voreingestellt (=Track). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten LSM510 können bis zu vier Fluorochrome in einem Scanvorgang gemessen werden, wobei jeder hintereinander abgearbeitet wird. Die oben genannten Parameter wurden für jeden Track grundsätzlich so gewählt, dass bei allen die gleiche Einstellung für das Pinhole verwendet werden konnte und somit das detektierte Licht immer aus der selben Focusebene stammt. Desweiteren wurde bei höchster Detektorempfindlichkeit die minimalste Laserenergie ermittelt, die ausreicht, um ein Sättigungsverhalten der Emission des Fluorochroms zu erreichen. Gleichzeitig konnte so auch das Fading des Fluorochroms minimiert werden.

Durch das selektive Scannen der einzelnen Tracks entstehen bis zu vier Einzelbilder die von der Software entsprechend übereinandergelegt werden. Liegt in den Einzelbildern jeweils an der selben Stelle (X/Y Position) ein detektierter Pixelpunkt, so werden im zusammengefügtten Bild die korrelierenden Pixelpunkte nach dem RGB-Farbschema gemischt (=Kokalisation). Bei dem definierten grünen und roten Farbton entsteht rechnerisch ein gelber Farbton, der sich deutlich von den verwendeten Grundfarben abhebt. In der Praxis bedeutet das, die Bereiche im Gewebe, die von beiden verwendeten Antikörpern markiert werden deutlicher hervorgehoben werden, als bei der Lichtmikroskopie.

2.6.8 Besonderheit von PE (Phycoerythrin)

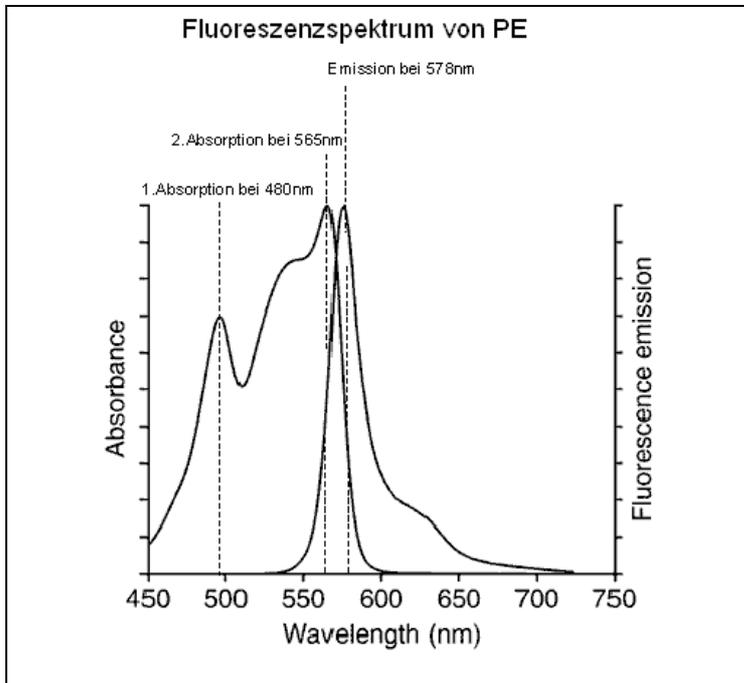


Abb. 7: Fluoreszenzspektrum von PE

Die in der Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind PE (R-Phycoerythrin), FITC und Alexa488TM und Alexa546TM. Aus Abb. 7 ist erkennbar, dass PE zwei Absorptionsmaxima besitzt. Ein Absorptionsmaximum liegt bei 565 nm und entspricht in etwa der Wellenlänge des HeNe-Lasers (543 nm). So angeregt emittiert PE Licht einer Wellenlänge von 576 nm. Das andere Absorptionsmaximum liegt im Bereich der Anregungswellenlänge, die auch für FITC und Alexa488 verwendet wird, nämlich bei 480 nm. In diesem Fall emittiert PE Licht mit einer Wellenlänge von 546 nm. Das heißt, dass beim Scannen des FITC oder Alexa488TM Farbstoffes grundsätzlich auch der PE Farbstoff angeregt wird und dieser mit einer Wellenlänge von 578 nm strahlt. Da für FITC und Alexa488TM Filter mit einer maximalen Wellenlänge von 520 nm verwendet werden, kann physikalisch das emittierte Signal des PE Fluorochroms nicht detektiert werden.

2.7 Durchflußzytometrie

Ein Durchflußzytometer ist ein effizientes Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in den meisten Fällen mit einem zu-

sätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflußzytometer im allgemeinen als FACS (Fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet. Zellen, die zuvor mit einem Fluoreszenzkonjugierten Antikörper oder andersartigen spezifischen Reagenzien markiert wurden, werden hierbei in einem Überschuß an physiologischer Salzlösung durch eine Düse fokussiert, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen einzeln und durch Intervalle getrennt vorliegen (= heterodynamische Fokussierung). Die Zellen passieren einen Laserstrahl. Dabei absorbieren die Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Zellen gebunden sind, das Laserlicht und emittieren wiederum Licht einer bestimmten, für sie charakteristischen Wellenlänge.

Wie beim oben erwähnten Lasermikroskop detektieren Photomultiplier sowohl die Lichtstreuung, die Aufschluß über die Größe und Granularität der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenz-Emissionen. Die Kombination von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf der Oberfläche von Zellen. Voraussetzung ist hierbei wiederum dass Farbstoffe verwendet werden, die getrennt messbar sind. Fluoreszenzfarbstoffe die bei der Durchflußzytometrie verwendet werden sind FITC, PE, PerCP, Cy5. Für die FACS-Analyse im Rahmen dieser Arbeit wurde bis auf PerCP nur direktmarkierte Antikörper benutzt. Für die PerCP-Färbung wurden biotinylierte Primärantikörper mit Streptavidin-PerCP markiert. Die Analysen der Immunfluoreszenz erfolgte am FACScalibur Durchflußzytometer mit CellQuest-Software (Becton&Dickinson, Heidelberg).

Zum Nachweis der Expression von Zelloberflächenantigenen wurden die zu testenden Zellen gewaschen und in FACS Färbepuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie bei 5 min Vorinkubation mit 10 µl Fc-Block 20 min mit 30 µl Primär-AK bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte gegebenenfalls die Inkubation mit einem Sekundärreagenz für weitere 20 min bei 4°C. Nach wiederum zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200µl FACS Färbepuffer resuspendiert und wurden anschließend analysiert.

3 Vergleich der Phänotypen der TNF/LT Knockout Mäuse

3.1 Entwicklung von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques in der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Maus

Den Einfluß der TNF/LT-Familie auf die Entwicklung der Lymphknoten und Peyer'schen Plaques ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt worden. Durch die komplette Abwesenheit von LK und PP in der $LT\beta-R^{-/-}$ Maus wird diesem Rezeptor die Schlüsselfunktion in der Übermittlung von Signalen der Organogenese der LK und PP zugeschrieben (Futterer et al., 1998). Der Einfluß des wichtigsten Liganden für den $LT\beta-R$, $LT\alpha_1\beta_2$, wurde bisher durch Experimente mit $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta^{-/-}$ Mäusen untersucht. Diese Phänotypen besitzen allerdings nicht die selben ausgeprägten Defekte wie die $LT\beta-R^{-/-}$ Maus. Findet man bei der $LT\beta^{-/-}$ Maus immer mucosale LK (Alimanzhanov et al, 1997; Koni et al., 1997), so treten bei der $LT\alpha^{-/-}$ Maus nur in 5% der Fälle mesenteriale LK auf (De Togni et al., 1994; Banks et al., 1995). Ebenso ist immer noch fraglich, ob der Phänotyp der $LT\alpha^{-/-}$ Maus nicht durch eine Reduzierung der TNF Expression (2) verursacht oder moduliert wird.

Um den Hauptliganden für den $LT\beta-R$ komplett zu eliminieren und damit eine evtl. Reststimulation auszuschließen, mußte eine Knockout Maus geschaffen werden, die sowohl für $LT\alpha$ als auch $LT\beta$ defizient ist. Generiert wurde daher eine $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus (Alimanzhanov, Pfeffer, Nedospasov, unpubliziert). Diese Maus kann ebenso wie die $LT\alpha^{-/-}$ Maus weder membrangebundenes $LT\alpha_1\beta_2$ noch lösliches $LT\alpha_3$ bilden. In der $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus bei der die Gene nicht durch eine Neomycin-Resistenz Kasette ausgetauscht, sondern durch CRE-loxP vermittelte Deletion eliminiert wurden, konnte keine Reduzierung der TNF Expression gemessen werden. Eine Beeinflussung des Phänotyps durch eine alterierte TNF Expression, wie er bei den bisherigen Knockoutmäusstämmen diskutiert wurde, ist somit auszuschließen (Alimanzhanov, Pfeffer, unpubliziert).

Für den Einfluß auf die Entwicklung von Lymphknoten und Peyer'sche Plaques wurden diese Mäuse auf das Vorhandensein von mesenterialen, paraaortalen, axillären und inguinalen Lymphknoten und Peyer'sche Plaques hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass von 95 untersuchten $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Mäusen keine einzige Lymphknoten oder PP aufwies.

Tab. 3.1: Lymphknoten und Peyer'sche Plaques in TNF/LT defizienten Mäusen

Genotyp	Lymphknoten	Peyer'sche Plaques
$LT\alpha^{-/-}$	in 5%	keine
$LT\beta^{-/-}$	mucosale LK	keine
$TNF^{-/-}$	alle LK	vorhanden
$LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$	keine vorhanden	keine vorhanden
$LIGHT^{-/-}$	alle vorhanden	vorhanden
$LIGHT/LT\beta^{-/-}$	reduziertes auftreten von mesenterialen LK	keine vorhanden

3.2 Vergleich der Milzarchitektur der TNF/LT defizienten Mäuse

3.2.2 T/B Segregation

Wie bereits erwähnt, scheint der Mechanismus für die T/B Segregation und damit die regelhafte Migration der Zellpopulationen der Milz in ihre vorbestimmten Kompartimente, durch die Interaktionen von ortständigen Stromazellen mit $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierenden Zellen hervorgerufen zu werden (3,15,17,32).

Zur Darstellung der T/B Segregation wurden B-Zellen mit B220 (Fite) und T-Zellen mit CD3 (PE) gefärbt. Betrachtet man die T/B Segregation (Abb. 9) in den $TNF/TNF-Rp55^{-/-}$ Mäusen erkennt man zwar noch eine Trennung von B und T Zellearealen, allerdings finden sich keine Follikel mit Keimzentren mehr. Somit liegen die B-Zellen wie ein Ring um die T-Zellen. Bei allen LT Knockoutmäusen ist diese Trennung komplett aufgehoben. B- und T-Zellen liegen gemischt um die Zentralarteriole. Vergleicht man die $LT\alpha^{-/-}$, $LT\beta^{-/-}$ und $LT\beta R^{-/-}$ Maus untereinander, so lässt sich aber feststellen, dass der Defekt bei der $LT\beta$ defizienten Maus am geringsten und die $LT\beta$ -R am gravierensten ausfällt. Die $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ zeigt den selben Phänotyp wie die $LT\alpha^{-/-}$ - und $LT\beta R^{-/-}$ Maus. Da somit bereits bei der $LT\alpha^{-/-}$ Maus der maximale Defekt der T/B Segregation beobachtet werden kann, reicht die Analyse der T/B Segregation nicht aus, um diese Mäuse nochmals von einander abzugrenzen. Die $LIGHT^{-/-}$ Maus entspricht dem Wildtyp und die $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ Maus zeigt den selben Phänotyp wie die $LT\beta^{-/-}$ Tiere. Ein Einfluß von $LIGHT$ auf die T/B Segregation konnte auch mit diesen Daten nicht gezeigt wer-

den. Dies gilt auch für einen eventuellen Synergieeffekt von LIGHT und $LT\beta$ zusammen, den man bei den mesenterialen LK findet (Scheu et al. 2002).

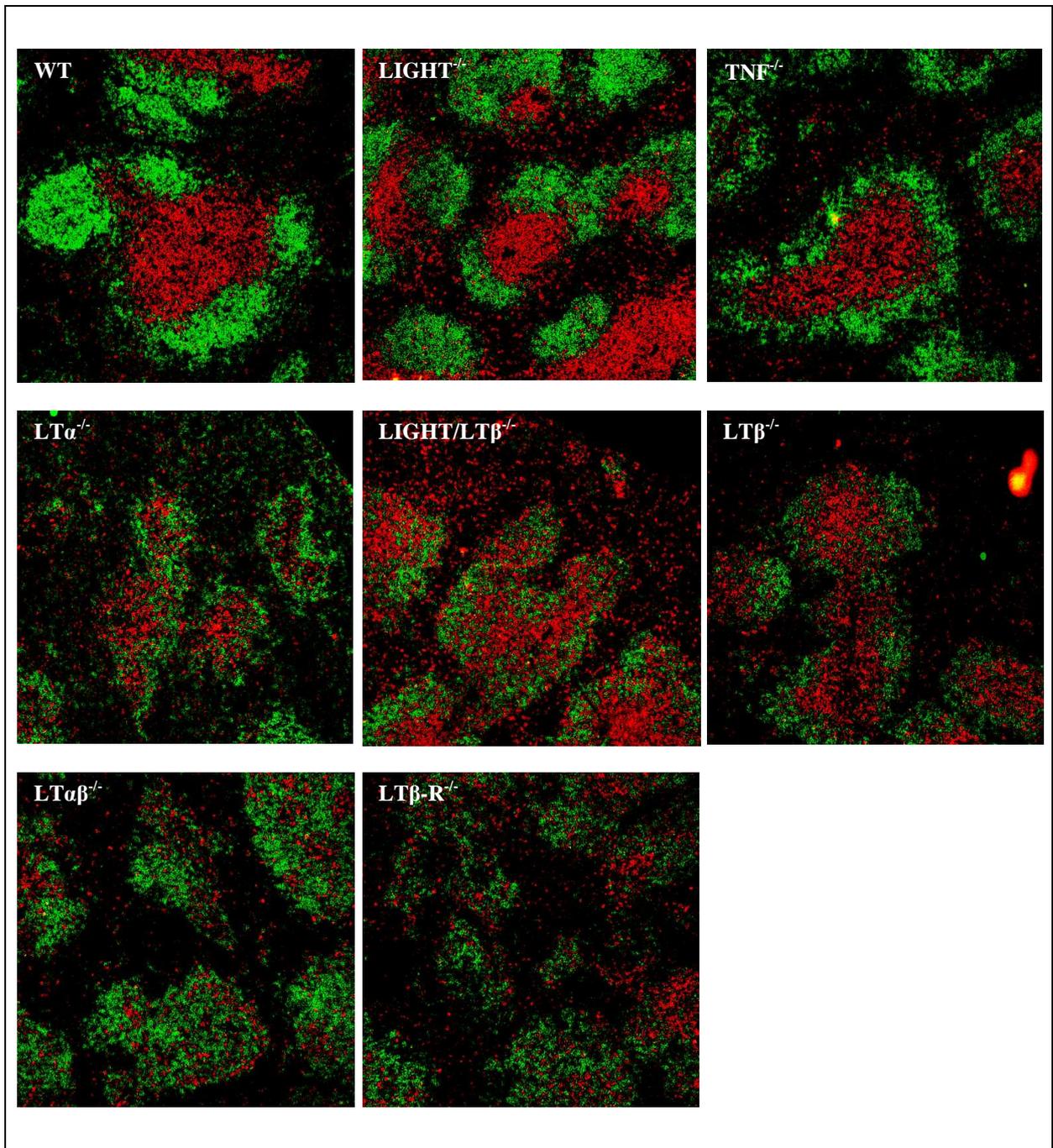


Abb. 8: T/B Segregation. B-Zell Bereiche grün (Anti-B220), T Zell Bereiche rot (Anti-CD3)

3.2.3 B-Lymphozyten

In der weißen Pulpa der Milz findet man vier Populationen von B-Zellen (Tab. 3.2). Transitional 1-, Transitional 2-, reife und Marginalzonen B-Zellen (MZ). Unreife B-Zellen wandern aus dem Knochenmark in die Milz und durchlaufen hier die Entwicklung zur reifen rezirkulierenden folliculären B-Zellen bzw. reifen nichtrezirkulierenden Marginalzonen B-Zellen (23).

Tab. 3.2: Oberflächenmarker der B-Zellen in der Milz

Oberflächenmarker	unreife B-Zellen	T1 B-Zelle	T2 B-Zelle	reife B-Zelle	MZ B-Zelle
IgM	+	+++	+++	+	+++
IgD	-	-	+++	+++	-
CD21	-	-	+++	++	+++
CD23	-	-	++	++	-
Lokalisation	KM	KM, B, M	M	KM, B, M, LK	M

Vergleich der Oberflächenmarker die verschiedenen B-Zellen. Als Maß für die Expressionsdichte wurde (-) für negativ, (+) für positiv, (++) stark positiv und (+++) am stärksten positiv verwendet. Als Abkürzungen für die Lokalisation wurden verwendet. (KM) für Knochenmark, (B) für Blut, (M) für Milz und (LK) für Lymphknoten. (nach Loder et al., 1999).

Zur Differenzierung kann man die B-Zellen anhand ihrer IgD / IgM Expression in unterschiedliche Fraktionen einteilen. Fraktion I (reife rezirkulierende B-Zellen) zeigen IgD^{hi}/IgM^{lo}, Fraktion II (Transitional 2 B-Zellen) IgD^{hi}/IgM^{hi} und Fraktion III (Marginalzonen B-Zellen, Transitional 1B-Zellen, B-Zellen der Keimzentren und Memory B-Zellen) zeigen IgD^{lo}/IgM^{hi} als Expressionsmuster (9,23).

Histologie

Beim Wildtyp läßt sich das Färbemuster klar definieren (Abb. 10). Außen liegen die IgM positiven MZ B-Zellen (rot). In den Follikeln erkennt man folliculäre B-Zellen die hauptsächlich IgM/IgD positiv (grün) sind. Die B-Zellen im Keimzentren sind IgM^{hi}/IgD^{lo} und imponieren daher rötlich. Die Bereiche der PALS ist ungefärbt. In der roten Pulpa findet man reichlich

stark IgM positive Zellen, welche rezirkulierende naive B-Zellen oder auch IgM positive Memory B Zellen sein können.

Die TNF^{-/-} Maus hat zwar MZ B-Zellen, aber man erkennt keine Keimzentren mehr. Bei der LTβ^{-/-} Maus läßt sich die ursprüngliche Architektur mit einer angedeuteten Marginalzone und Follikeln noch erkennen. In der LTα^{-/-}, LTβ^{-/-}, LTαβ^{-/-} und in der LTβR^{-/-} Maus ist die folliculäre Anordnung ähnlich zerstört. Die scharfe Trennung der Marginalzone und die IgD ausgesparten Keimzentren sind nicht zu differenzieren. Wiederum zeigt die LTβ-R^{-/-} Maus den deutlichsten Defekt. Hier sind nur noch einzelne Zellkonglomerate zu erkennen. Die Binnenstruktur erscheint föllig diffus. Vergleicht man bei dieser Färbung die LTα^{-/-} und die LTαβ^{-/-} Maus so erscheint diesmal eine Abgrenzung möglich. Die Zerstörung der folliculären Strukturen bei der LTαβ^{Δ/Δ} Maus imponiert noch gravierender. Vergleicht man die LIGHT^{-/-} Maus mit dem Wildtyp so ist eine intakte Marginalzone sowie eine Keimzentrenbildung festzustellen. Die LIGHT/LTβ^{-/-} Maus spiegelt den Phänotyp der LTβ^{-/-} wieder. Ein Einfluß von LIGHT auf die folliculären B-Zellmorphologien konnte nicht gefunden werden.

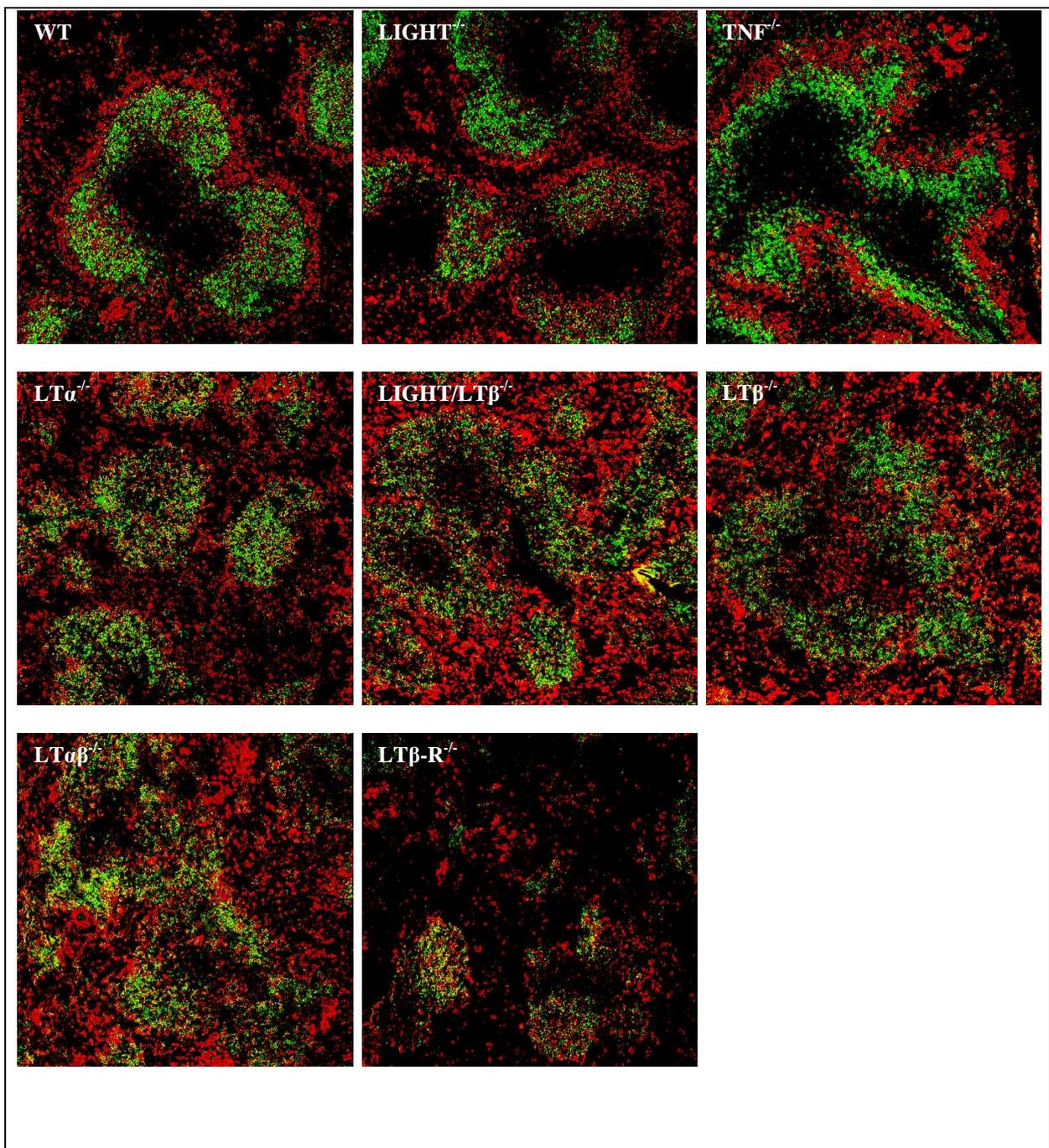


Abb. 9: B-Lymphozyten. Anti-IgD (grün) und Anti-IgM (rot)

Quantifizierung der B und T Zell Population

Von bisherigen Untersuchungen weiß man, dass die TNF/LT^{-/-} Mäuse keinen Defekt in der Entwicklung der T- und B-Lymphozyten haben und somit die Zahl der Zellen, die aus dem Thymus und dem Knochenmark, ins Blut gelangen nicht reduziert sind. Darüberhinaus ist die Wanderung der Lymphozyten in die Milz nicht gestört (9). Bei Analysen der Zahl der B- Zellen-

len (B220 positiv) und der T Zellen (CD3 positiv) findet man daher keine Abweichung vom WT, mit Ausnahme der $LT\beta-R^{-/-}$ Maus, bei der die Zahl der zirkulierenden T-Zellen erhöht ist (Futterer et al., 1998)

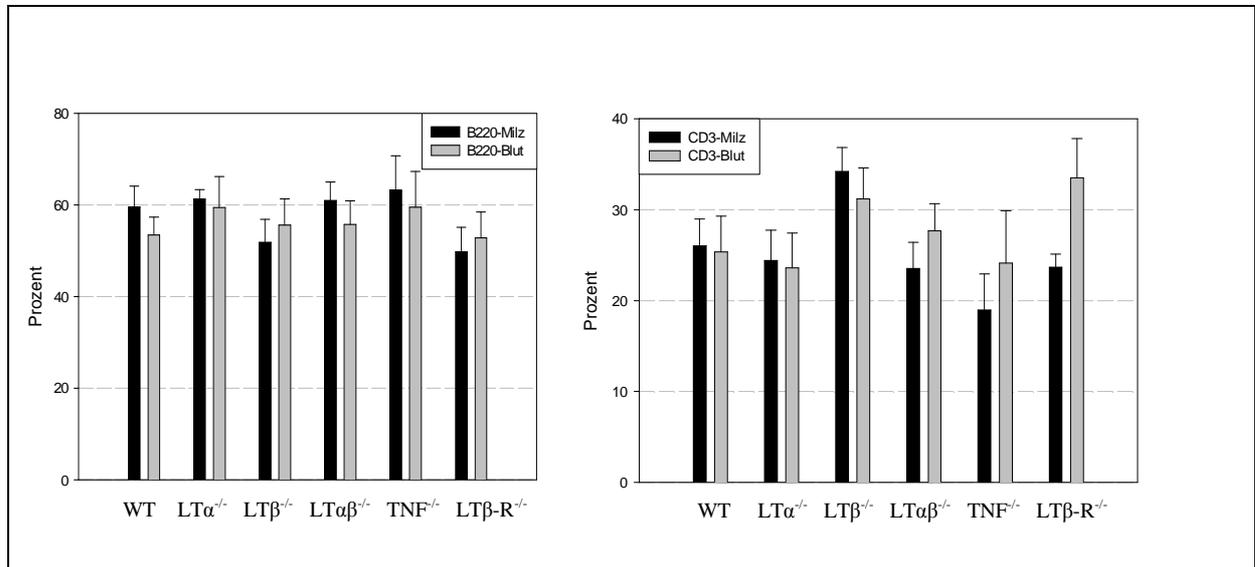


Abb. 10: Facs-Analyse der Lymphozyten in Blut und Milz. B-Lymphozyten (mit Anti-B220 gefärbt) und T Lymphozyten (mit Anti-CD3 gefärbt) in Blut und Milz

Wichtigstes Hauptmerkmal der $LT\alpha^{-/-}$, $LT\beta^{-/-}$, $LT\alpha\beta^{-/-}$, $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ und $LT\beta R^{-/-}$ -Mausmilzen und Unterscheidungsmerkmal zu der $TNF^{-/-}$ Milz ist das Fehlen der MZ-B-Zellen. MZ-B-Zellen liegen innerhalb der Fraktion III (IgD^{lo}/IgM^{hi}), die in allen KO-Milzen reduziert sind. Die MZ-B-Zellen lassen sich durch die Expression von $CD21^{hi}$ und $CD23^{lo}$ innerhalb dieser Fraktion identifizieren. Dabei zeigen die FACS-Analysen (Abb. 12), dass die Anzahl der $CD21^{hi} / CD23^{lo}$ positiven MZ-B-Zellen in allen LT-Knockoutmäusen signifikant reduziert sind. Es lässt sich somit kein signifikanter Unterschiede zwischen den LT-KO-Mäusen ausmachen. Die $TNF^{-/-}$ Maus zeigt hingegen eine normale Anzahl an MZ-B-Zellen.

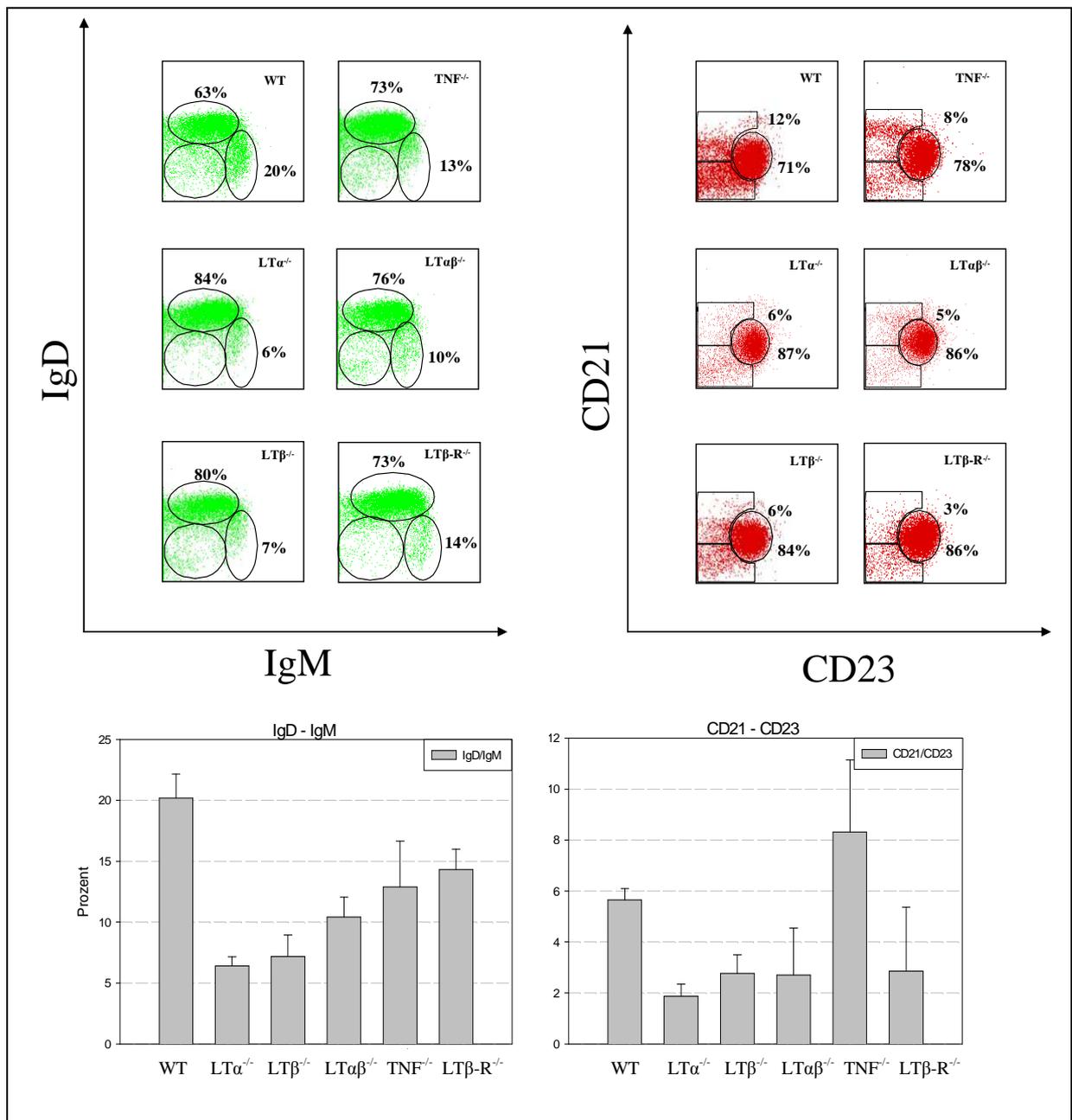


Abb. 11: FACS-Analyse der B-Zellen in der Milz. Die Zellen wurden auf CD19 gateged. **Links:** Gezeigt ist die Verteilung nach IgD/IgM Expressionsmuster. R1 entspricht der Population an Fraktion I Zellen (rezirkulierenden B Zellen), R2 entspricht der Population an Fraktion III Zellen (z.B. Memory B Zellen, MZ B-Zellen). Alle Knockouts zeigen eine reduzierte Zahl an Fraktion III Zellen. **Rechts:** Gezeigt ist die Verteilung nach CD21/CD23 Expressionsmuster. Speziell die Population der CD21^{lo}/CD23^{hi} Marginalzonen B Zellen ist in allen LT Knockoutmäusen reduziert, in der TNF^{-/-} Maus hingegen normal. **Unten:** Säulendiagrammzusammenstellung der FACS-Analysen.

3.2.4 Follikuläre dendritische Zellen (FDC)

FDC können durch ihre Fc-Rezeptoren Antigen/Antikörperkomplexe binden und immunkompetenten B-Zellen präsentieren. In den Follikeln findet man Netzwerke von FDCs, die mit B-Zellen Keimzentren ausbilden. Die Produktion von hochaffinen IgG Antikörpern gegen Antigene im Rahmen der humoralen Immunantwort findet dabei in den Keimzentren statt. Über die Herkunft und Entwicklung von FDCs ist nur wenig bekannt (Szakal et al., 1983). Diskutiert wird ob sich FDCs aus follikuläre mesenchymale Zellen, retikulären Stromazellen, oder aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entwickeln. Man vermutet aber, dass sog. Antigentransportierende Zellen (ATC) Antigen aus dem Lymphsystem binden und mit Antikörper beladen in die Follikelbereiche der Milz wandern. In der Marginalzone von TNF/TNFR-p55 KO-Mäusen, die im Vergleich zu den LT-Knockout Mäusen noch teilweise erhalten ist, kann man vermehrt Zellen finden, die positiv für einige FDC Marker sind (36). Wodurch man zu dem Schluß kommt, dass in diesen Mäusen die Marginalzone derart defekt ist, dass eine Lokalisation von Zellen in der Marginalzone zwar möglich, eine Einwanderung in die Follikel aber unmöglich ist. Das korreliert auch mit der Erkenntnis, dass in TNF / TNFRp55^{-/-} Mäusen Adhäsionsmoleküle wie MAdCAM-1 reduziert exprimiert werden, welche nachweislich für Bildung von Keimzentren benötigt werden (Chaplin and FU, 1999; Neumann and Holzmann, 1996). Interessanterweise ist der Phänotyp der CXCR5^{-/-} defizienten Maus identisch mit der TNF / TNFRp55 defizienten Maus (36).

Histologie

Für die Untersuchung (Abb. 13) wurden FDCs mittels CD21,35 (FITC) gefärbt. Dieser Antikörper erkennt Komplementrezeptor 1 (CD35) und Komplementrezeptor 2 (CD21). Diese Rezeptoren findet man neben Makrophagen und B-Lymphozyten auch auf follikulären dendritischen Zellen. Die im Bereich der Follikel und des Marginalsinus lokalisierten B-Zellen und Makrophagen werden nur schwach angefärbt, wohingegen die FDC's mit ihrer starken Antikörperbindung (grün) deutlich hervortreten. Typischerweise sind sie innerhalb des Follikels in den Keimzentren lokalisiert. Um die Struktur der Milz besser hervorzuheben wodurch die Lokalisation der FDCs besser bewertet werden kann, wurde zusätzlich mit PNA (rot) gefärbt. PNA ist ein pflanzliches Lektin welches die Zentroblasten und Zentrozyten in den Keimzentren bindet, in denen auch FDCs lokalisiert sind. Überlagern sich dabei PNA und Anti-CD21,35 gefärbte Bereiche kommt es zur partiellen Kolokalisation, die an der Gelbfärbung im Wildtyp gut zu erkennen ist.

Während in der WT Milz FDCs im Bereich der Keimzentren liegen, besitzt die TNF^{-/-} lediglich in der MZ FDCs, aber nicht in den Follikeln. Die Phänotypen aller anderen LT- KO-Mäuse weisen alle keine FDCs mehr auf. Ebenso ist keine PNA-Bindung für Zentroblasten und Zentrozyten zu detektieren.

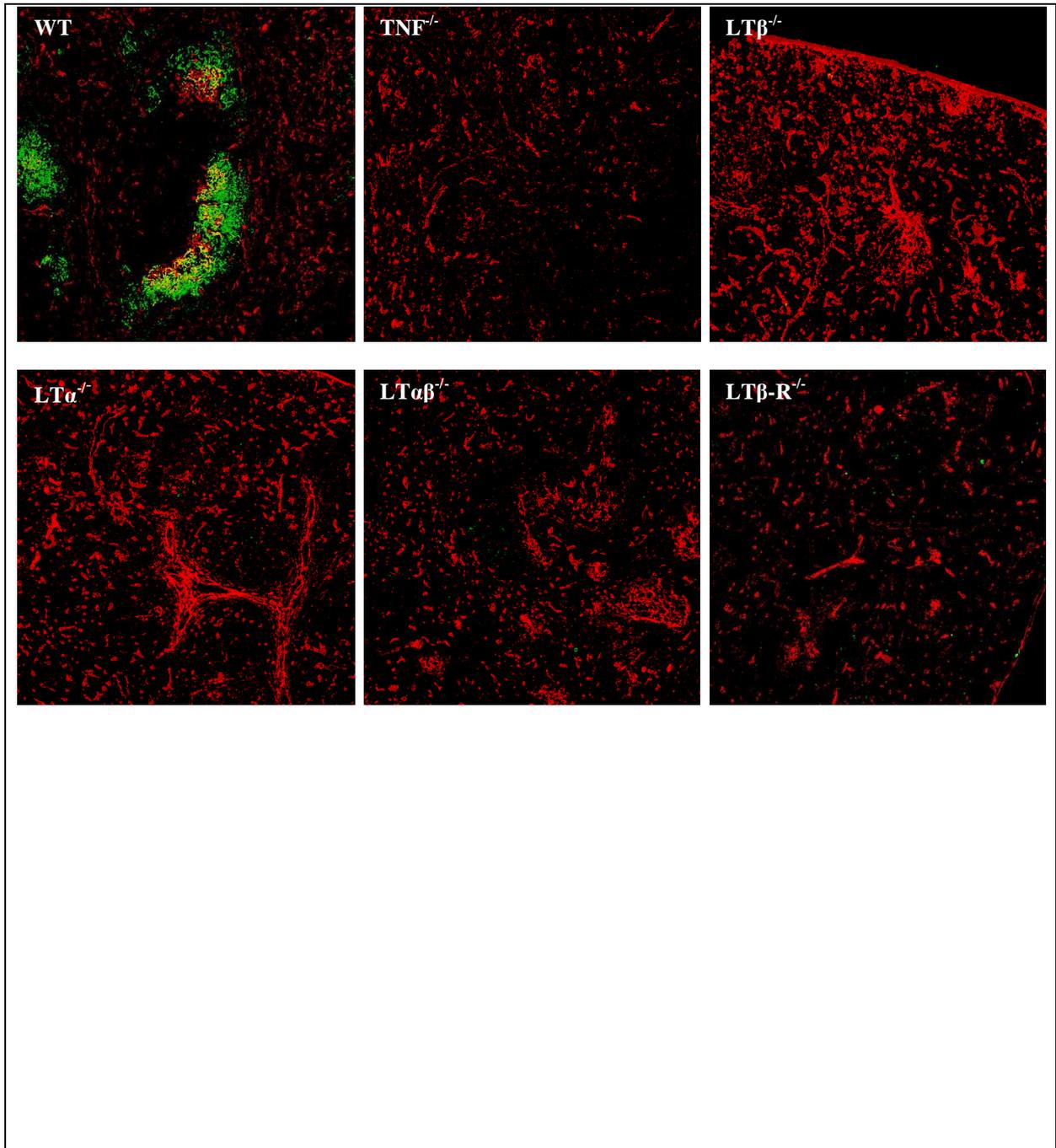


Abb. 12: FDC-Netzwerke. Anti-CD21/35 (Fitc), PNA (PE)

In der Färbung der $LIGHT^{-/-}$ - und $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ Mäuse (Abb. 14) wurde ein direktmarkierter CD21/35 Antikörper verwendet. Dieser färbt die FDC-Netzwerke im Vergleich zu den B-Zellen und Makrophagen stärker, welche ebenso durch diesen Antikörper detektiert werden. Die B-Zellen und Makrophagen werden so stark angefärbt das man die typische Follikelstruktur erkennen kann. Die FDCs sind als vernetzte fluoreszierende Konglomerate (durch Kreise in der Abb. 14 markiert) sehr gut von den anderen Zellen unterscheiden.

Die $LIGHT^{-/-}$ Maus zeigt wie der WT eine intakte Milzstruktur mit FDC-Netzwerken. In den Milzschnitten von $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ Tieren zeigt sich wiederum der Phäntyp der Milzen der $LT\beta^{-/-}$ Mäuse, in denen keine FDC-Netzwerke vorhanden sind.

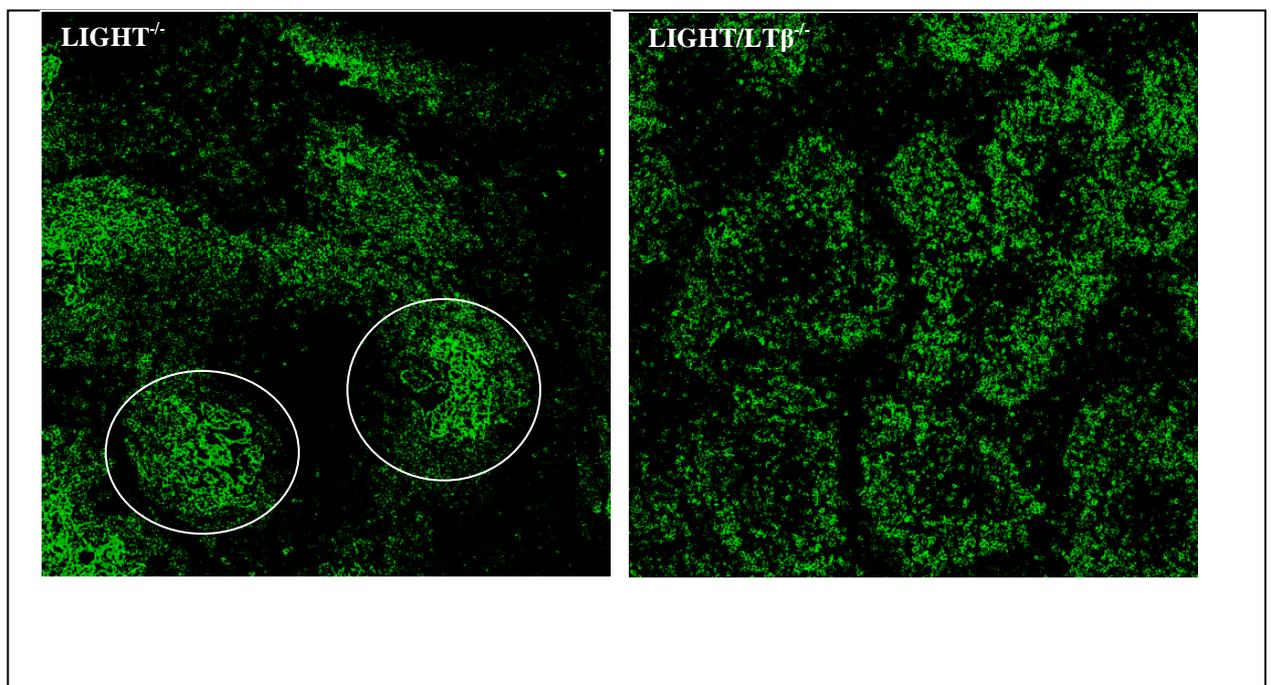


Abb. 13: FDC-Netzwerke in der Milz von $LIGHT^{-/-}$ und $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ Mäusen gefärbt mit Anti-CD21,35 (FITC)

3.2.5 Marginalzonen Makrophagen

Die Marginalzone der Milz besteht aus einem Netzwerk von retikulären Zellen, die eine Art Rahmenkonstruktion für dendritische Zellen, spezialisierte Makrophagen und Lymphozyten darstellen, (Kraal et al., 1992).

Histologie

Die dort lokalisierten Makrophagenpopulationen sind Metallophile Makrophagen (MM) und Marginalzonen Makrophagen (MZM). MM findet man eher innerhalb des Marginalsinus und

lassen sich durch MOMA1 und 3D6 (Anti-MOMA1 und Anti-3D6 = grün) nachweisen.

MZM liegen außerhalb des Marginalsinus und sind ERTR9 positiv (Anti-ERTR9 = grün).

Als zweiter Antikörper wurde wiederum PNA verwendet, der die Sinusepithelzellen markiert (PNA = rot).

Übereinstimmend kann festgestellt werden das die Makrophagenpopulationen in den Marginalzonen der Lymphotoxin Knockouts fehlen (siehe Abb. 15-17). Im Gegensatz dazu sind die MM und MZM in der TNF Knockout reduziert vorhanden. Die LIGHT^{-/-} zeigt eine vollkommen intakte Marginalzone mit den Makrophagenpopulationen.

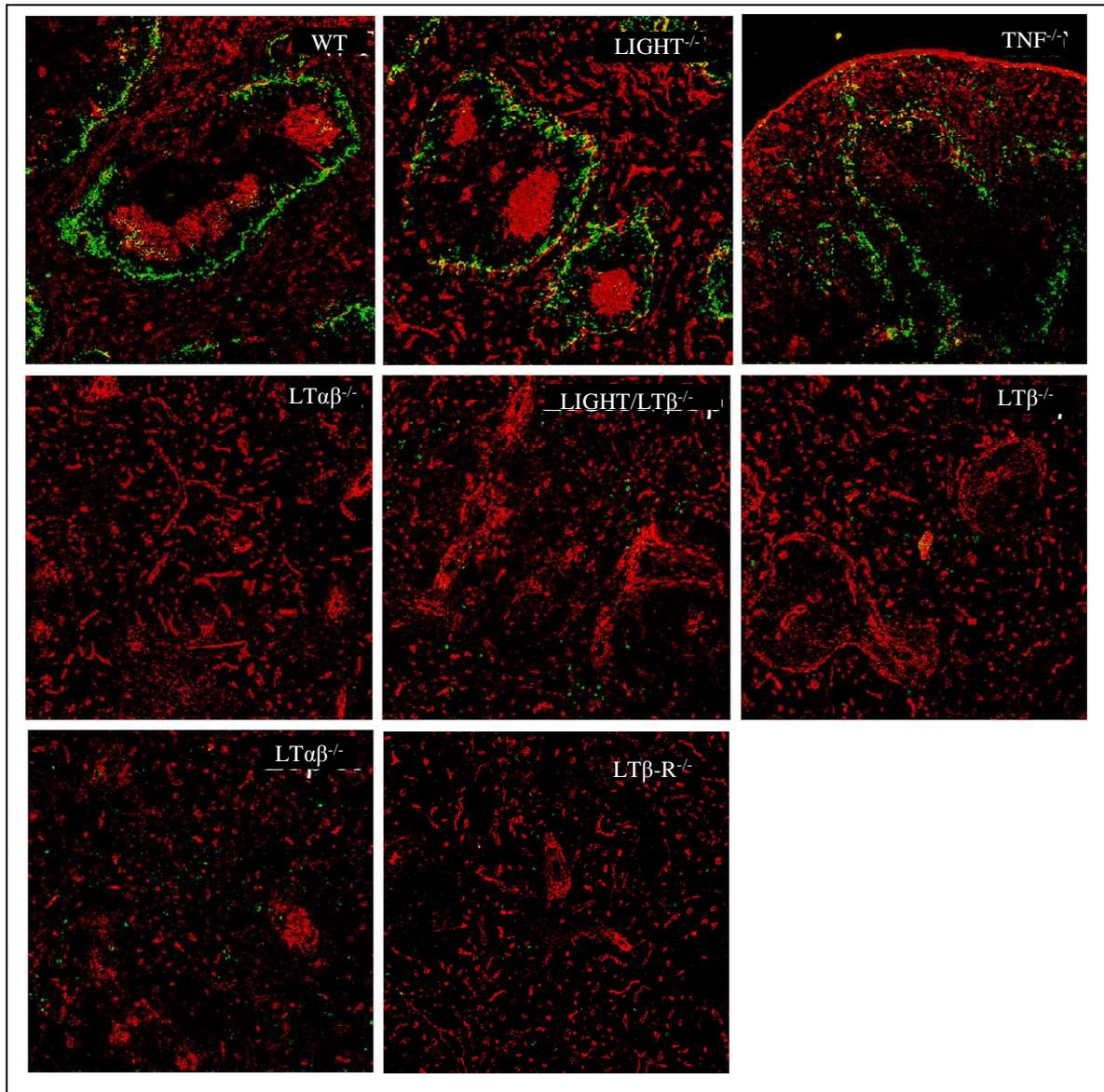
Metallophile Makrophagen (MOMA-1)

Abb. 14: Metallophile Makrophagen (MOMA1). Anti-MOMA-1 (grün) und PNA (rot). Der WT und die $LIGHT^{-/-}$ zeigen beide MM in der Marginalzone. In der $TNF^{-/-}$ hingegen ist die Anzahl der MM schon reduziert. $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\alpha\beta$ und $LT\beta R$ defiziente Mäuse besitzen keine MM.

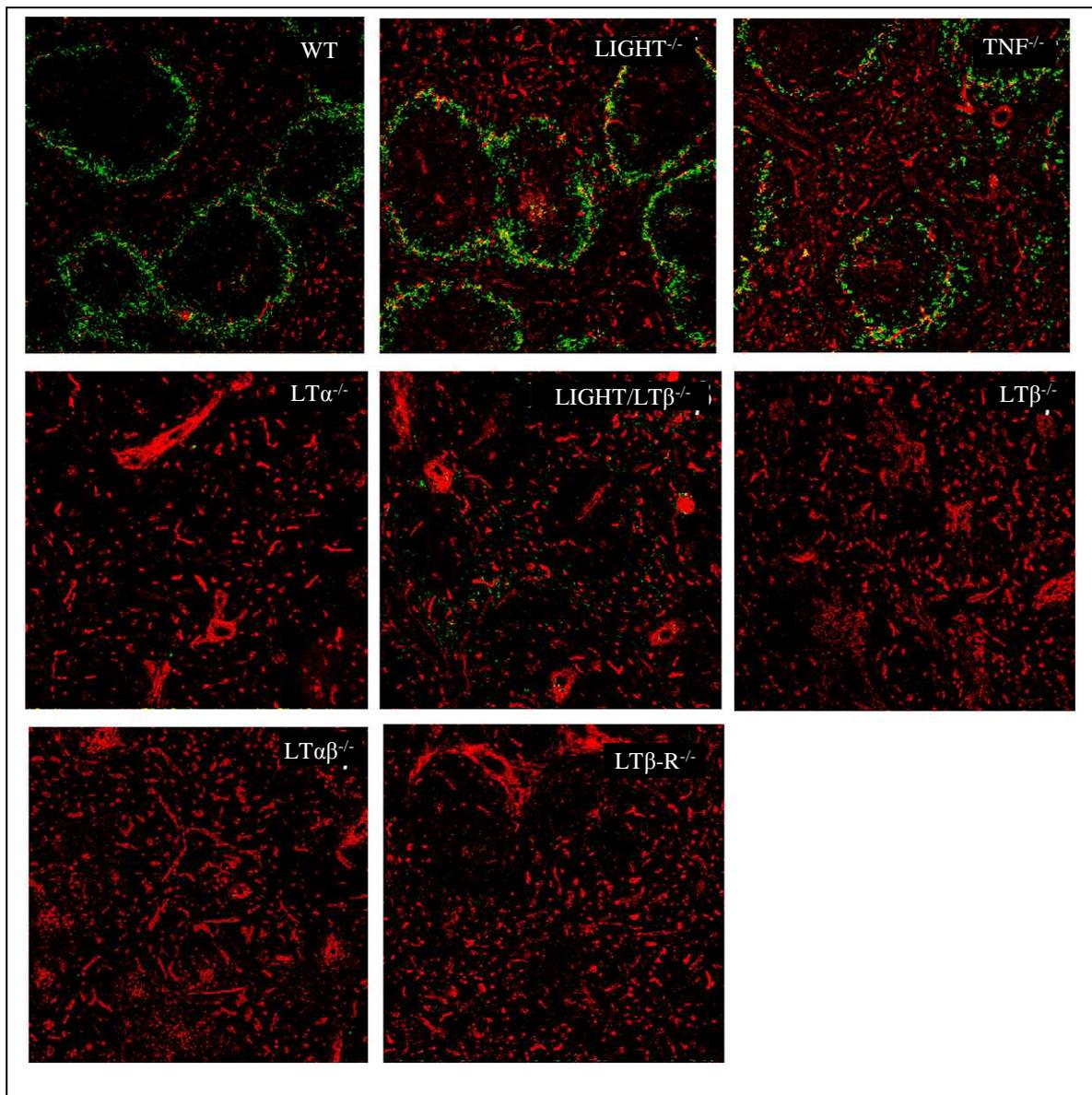
Metallophile Makrophagen (3D6)

Abb. 15: Metallophile Makrophagen (3d6=Sialoadhesin). Anti-3d6 (grün) und PNA (rot).

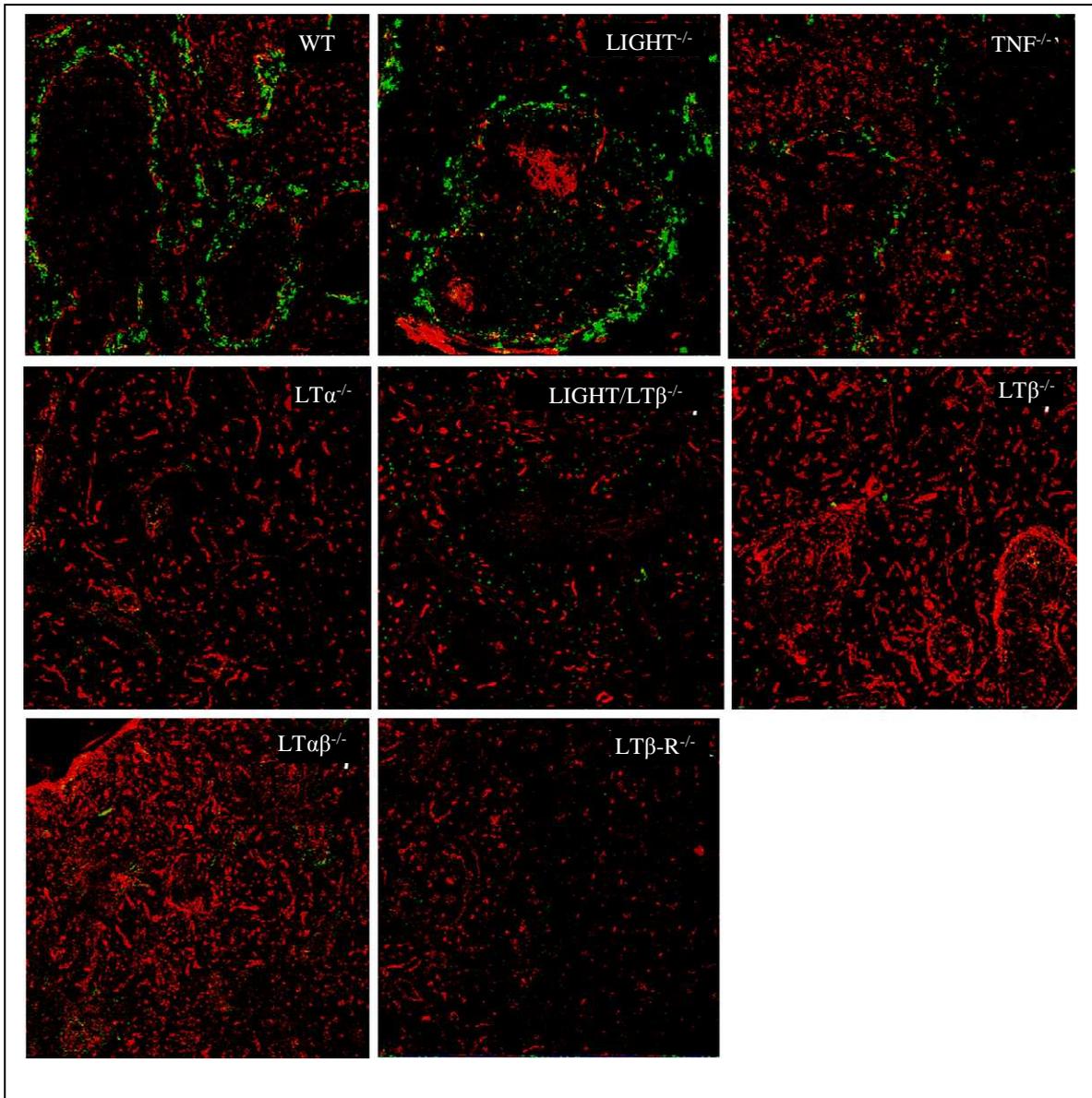
Marginalzonen Makrophagen (ER-TR9)

Abb. 16: Marginalzonen Makrophagen (ERTR9). Anti-ER-TR9 (grün) und PNA (rot).

Die Histologien der Makrophagenpopulationen in $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Tieren entspricht den der $LT\alpha^{-/-}$ Tiere. Neue Hinweise bzgl. weiterer Unterscheidungsmerkmale zwischen diesen Mäusen ergeben sich somit nicht. Auch bei den LIGHT-Mäusen zeigt sich das erwartete Bild. Die $LIGHT^{-/-}$ Mäuse besitzen alle Makrophagenpopulationen, die $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ Mäuse zeigen den Phänotyp der $LT\beta^{-/-}$ Maus.

3.2.6 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind Zellen welche Antigen hocheffizient transportieren, prozessieren und T-Zellen präsentieren können.

Unreife DCs befinden sich im Bereich der peripheren (7). Die Fähigkeit von unreifen DCs zur Antigenpräsentation durch MHC Komplex und Kostimulation ist nur sehr schwach ausgeprägt. Im Falle eines Antigenkontaktes kommt es zur weiteren Reifung der DCs, welche mit einem Funktionswechsel einhergeht. Die Fähigkeit zur T Zell Stimulation durch Antigenpräsentation und Kostimulation verbessert sich und gleichzeitig erlangen sie auch die Fähigkeit in die Lymphknoten und anderen sekundärenlymphatischen Organen (Grouard et al., 1995) zu wandern. In den sekundärenlymphatischen Organen primen die DCs naive T Zellen, welche im weiteren Verlauf wiederum B Zellen aktivieren können. Für die Funktion der DCs ist also grundsätzlich die Reifung im Entzündungsgebiet, sowie ein chemotaktischer Gradient aus den sekundärenlymphatischen Organen nötig. Somit ist eine ungestörte Architektur der sekundärenlymphatischen Organen wichtig für die DC Funktion (Steinmann et al., 1991).

Heute unterscheidet man nach Oberflächenmarkern mehrere Typen von DCs. Myeloide DCs ($CD11b^+/CD8^-/CD4^-$), lymphoide DCs ($CD11b^-/CD8^+/CD4^-$) und die $B220^+$ plasmazytoiden DCs (Shortman and Liu, 2002; Vremec et al., 2000). Die DCs findet man hauptsächlich in den T Cell Zonen der lymphatischen Organe, wohingegen die $CD8^-$ zunächst hauptsächlich im Bereich der Marginalzone zu finden sind. Allerdings nach Antigenkontakt können diese DCs ebenso in die T Zell Zonen wandern (Banchereau et al., 2000).

Betrachtet man den Einfluß von TNF und LT auf die Entwicklung und Funktion von DC so sieht man das interessante Bild, das Signale über den TNF/TNFRp55 Weg die Entwicklung und Reifung der DCs im Knochenmark zwar beeinflussen, aber nicht das Wanderverhalten in die sekundärenlymphatische Organe (32). Das LT-System hingegen beeinflusst die Reifung im Knochenmark nicht. Bei fehlenden Signalen durch das LT-System können die Zellen aber nicht in die vorgesehen Kompartimente von Milz und LK wandern (32).

Histologie

Untersucht wurde die Lokalisation von dendritischen Zellen (DC) innerhalb der Milz. Gefärbt wurde mit Anti-CD11c (grün) und Anti-MHCII (rot). Lediglich DCs exprimieren sowohl CD11c, als auch MHCII gleichzeitig und können daher, durch die im konfokalen Mikroskop auftretende Kolo-kalisation, detektiert werden.

Im Wildtyp (Abb. 18) erkennt man eine Häufung von DCs in der PALS, sowie um die B Zell Follikel, vornehmlich im Bereich der sog. „bridging channels“.

Die $TNF^{-/-}$ defizienten Mäuse zeigen genau wie die WT-Mäuse diesen Phänotyp. Also keine Störung in der Migration des Dcs. Bei den $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\alpha\beta$ defizienten Mäusen sind die DCs zwar vorhanden, aber diffus im Follikel verteilt. Bei der $LT\beta^{-/-}$ Maus ist auffällig, dass man die Follikel noch am besten abgrenzen kann. In der $LT\beta R^{-/-}$ Maus lassen sich überhaupt keine DCs nachweisen. Somit weist die $LT\beta R^{-/-}$ erneut einen ausgeprägteren Defekt als die $LT\alpha^{-/-}$ und die $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Mäuse auf. Die $LIGHT^{-/-}$ Tiere zeigen keine Veränderung gegenüber dem WT. Die $LIGHT/LT\beta^{-/-}$ zeigt eine vergleichbare Veränderung wie bei der $LT\beta^{-/-}$ Maus. Somit ist auch bei der Darstellung der dendritischen Zellen in der Milz kein Einfluß von $LIGHT$ erkennbar. Das Fehlen von MHCII-Komplex und $CD11c^{+}$ DCs in der $LT\beta$ -R Ko ist überraschend und konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

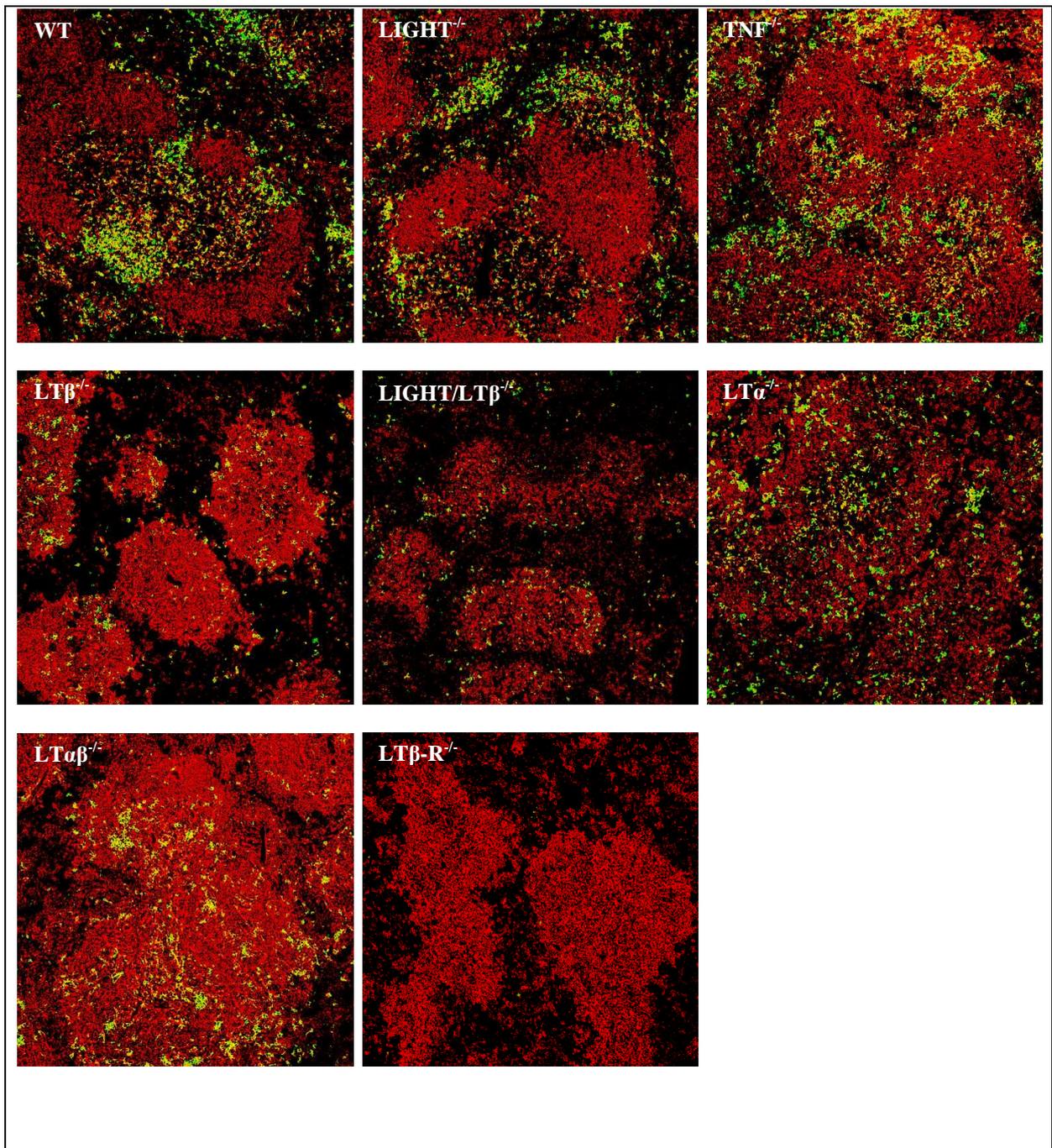


Abb. 17: DC-Färbung. Anti-MHC-Klasse II (rot), Anti-CD11c (grün)

3.2.7 Natural Killer Zellen (NK Zellen) und NK-T-Zellen

Bei NK und NK T Zellen handelt es sich um Zellpopulationen die sich aus den haematopoietischen Vorläuferzellen entwickelt haben und für die Entwicklung von Lymphknoten und Peyer'sche Plaques wichtig sind (29).

Es wurden sowohl NK Zellen (Abb. 19) als auch NK-T-Zellen (Abb. 20) in der Milz und Blut untersucht. NK Zellen wurden durch die gleichzeitige Expression der Oberflächenmarker NK1.1 und DX5 identifiziert, NK T Zellen durch die Expression von NK1.1 und CD3.

Die $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\alpha\beta$ und die $LT\beta R$ Knockoutmäuse weisen alle eine signifikante Reduzierung der NK1.1/DX5 positiven Zellen, sowohl in der Milz als auch im Blut, auf. Ein anderes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der NK1.1/CD3 positiven Zellen. In der Milz ist keine Veränderung zu beobachten, aber im Blut ist die Zahl der NK T Zellen in der $TNF\alpha$, $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\alpha\beta$ und $LT\beta R$ Knockoutmaus signifikant i. vgl. zum Wildtyp reduziert.

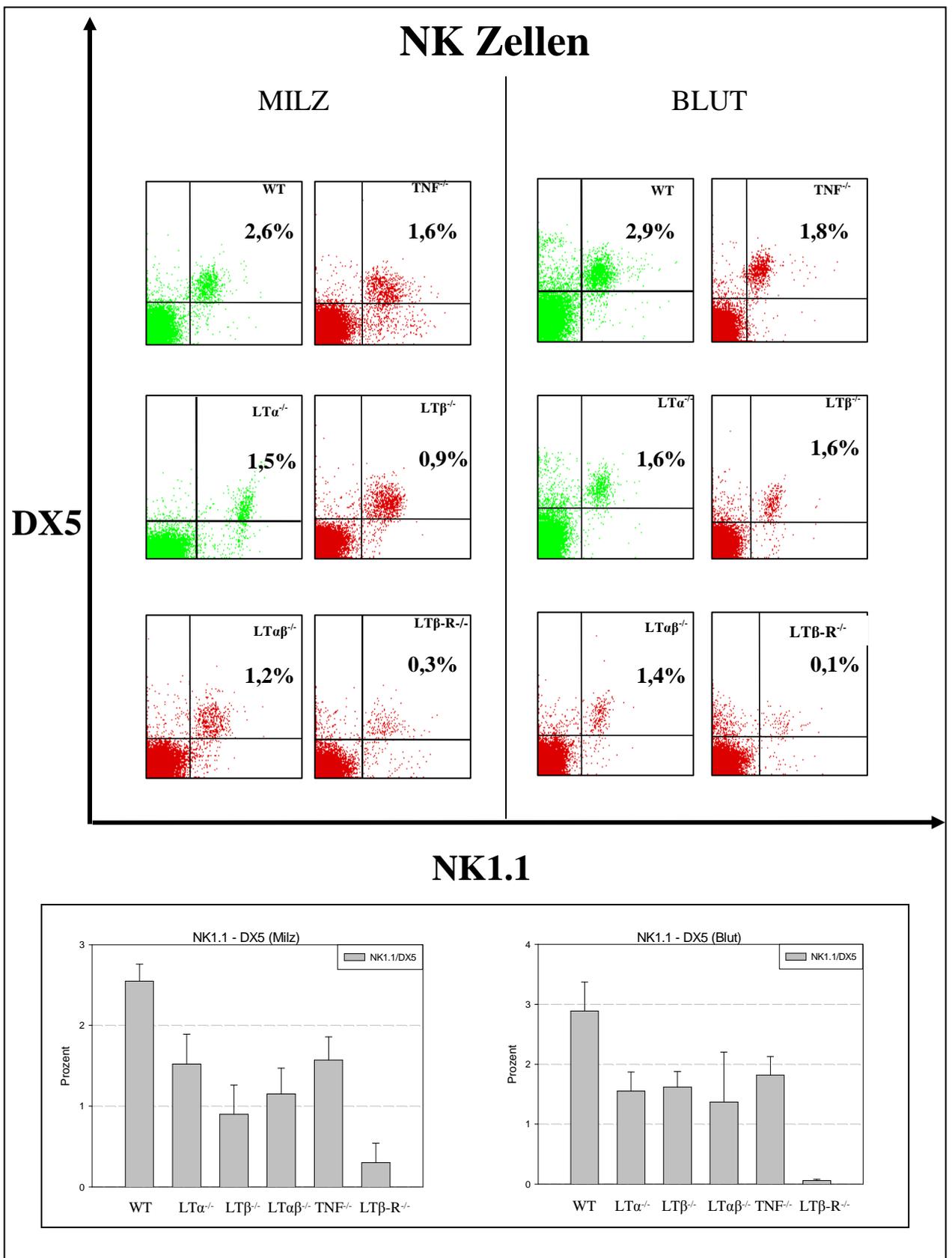


Abb. 18: Darstellung der NK Zellen in Milz und Blut. Anti-NK1.1 (PE) und Anti-DX5 (Fitc).

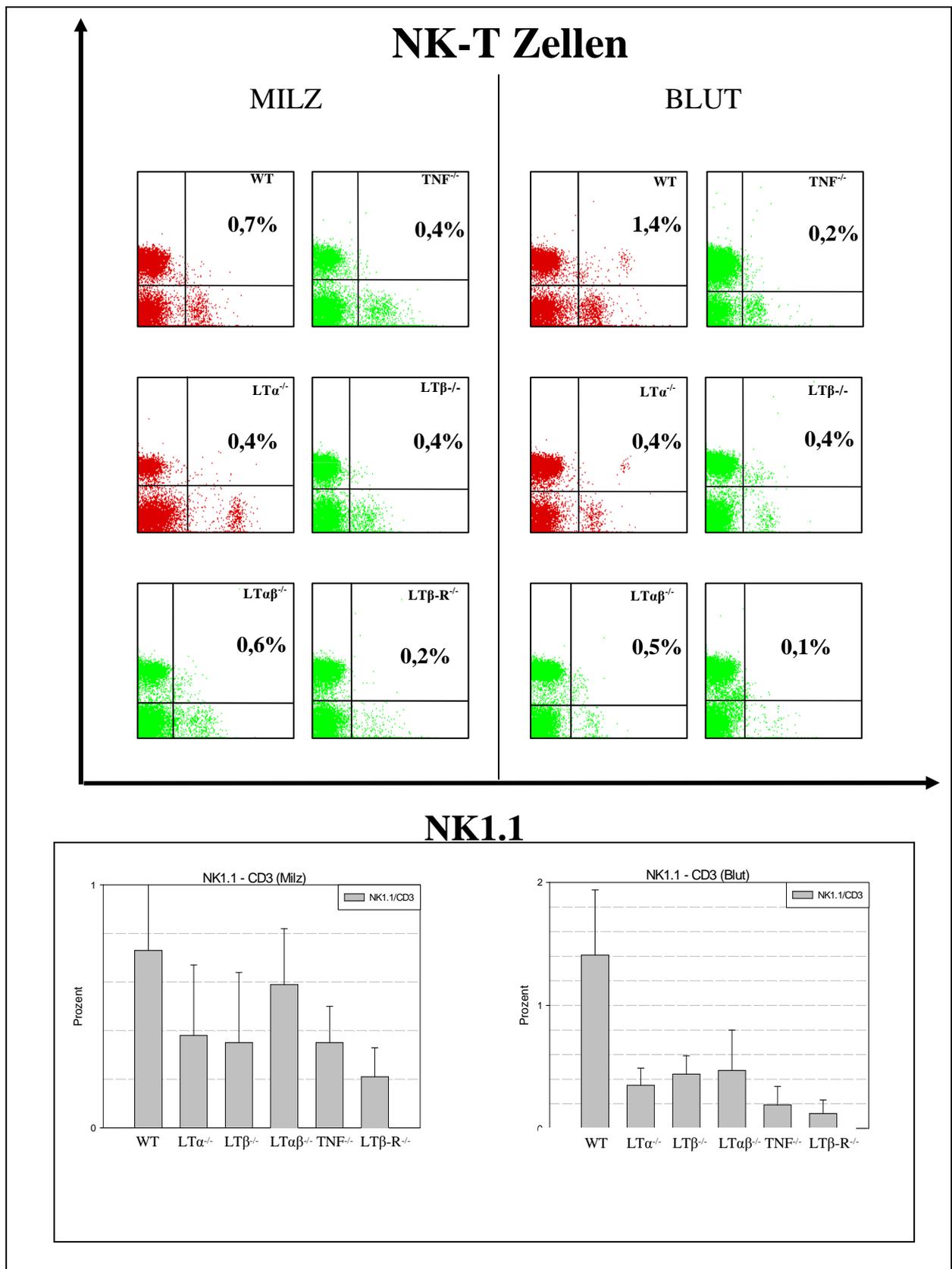


Abb. 19: Darstellung der NK-T Zellen in Milz und Blut. Anti-NK1.1 (Fitc), Anti-CD3 (PE).

4 Diskussion

4.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Ziel der Arbeit war die detaillierte Analyse von Geweben und Zellpopulationen von Knockout Mäusen mit inaktivierten Genen der TNF/LT Superfamilie. Nach der Analyse von über 100 Gewebeschnitten mit dem konfokalen Lasermikroskop lässt sich auf jeden Fall sagen, dass diese Technik in der molekularbiologischen Routine sicher und valide angewendet werden kann. Desweiteren zeigen sich mehrere Vorteile gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie. Ein deutlicher Vorteil liegt in der Zeitersparnis. So lässt sich durch die kürzeren Färbeschritte und die automatische Digitalisierung der Bilddaten deutlich Arbeitszeit einsparen. Das Photographieren der Schnitte, das Entwickeln der Fotos und die dann zusätzlich evtl. nötige Digitalisierung fallen nun weg. Die Daten sind bereits am Tag der Färbung beliebig einsetzbar.

In der konfokalen Lasermikroskopie wird, ähnlich wie in der Durchflußzytometrie, ein fluoreszierender Stoff (=Fluorochrom) durch einen Laser angeregt und anschließend die emittierte Lichtmenge jedes einzelnen Fluorochroms selektiv erfaßt. Man benötigt also keine chemische Färbereaktion mehr, bei der u.a. auch cancerogene Stoffe wie Etidiumbromid eingesetzt werden. Bei der Lasermikroskopie benötigt man keine chemische Farbreaktion des Zweitreagenz, die natürlich genau wie die Bindung von Primärantikörper und Zweitreagenz spezifisch ablaufen muß. Sondern man verwendet Laser mit Wellenlängen die nur von einem Fluorochromen absorbiert werden können. Nebenbei können mit einem Fluorochrom direkt-markierte Antikörper eingesetzt werden. Mögliche Kreuzreaktionen zwischen gleichzeitig eingesetzten Primärantikörpern und den Zweitreagenzien fallen nun zusätzlich weg. Die Verwendung von Primärantikörper und einem mit einem Fluorochrom gekoppelten Zweitreagenz hat aber qualitativ bessere Ergebnisse gebracht. Somit muß weiterhin bei der Zusammenstellung von Primärantikörpern für eine Färbung akribisch auf die unabhängige Bindungsverhalten von Antikörper und Zweitreagenz geachtet werden.

Als Verbesserung zur normalen Lichtmikroskopie hat sich auch die Möglichkeit der besseren Darstellung der Kolokalisation von mehreren Antikörpern auf derselben Zelle gezeigt (siehe Material und Methoden). Zellsubpopulationen wie zum Beispiel verschiedene Typen von DCs können nun besser identifiziert werden.

Wurde bei der Lasermikroskopie die sichtbare Farbreaktion nach makroskopischer Beurteilung gestoppt ohne das tatsächliche Färbeergebnis mikroskopisch beurteilen zu können, bietet das Laser-Scanning Mikroskop nun die Möglichkeit durch Anpassen der Laserstärke und Detektorempfindlichkeit während des Scan-Vorgangs die eigentliche Färbung zu steuern. Hierdurch kann eine optimale Bildqualität sicher und leicht reproduziert werden. Darüberhinaus ist auch ein mehrfaches Wiederholen des Scannens möglich ist. Leider entsteht durch die Möglichkeit Laser und Detektoren verstellen zu können auch die Gefahr das durch zu hohen Laserenergien oder zu empfindlich eingestellte Detektoren falsch positive Ergebnisse entstehen.

Konfokale Bilder zeigen normalerweise nur die detektierten Farben. Der Hintergrund ist daher grundsätzlich schwarz und bietet so einen deutlichen Kontrast. Die eigentliche Färbung kann so sehr detailliert analysiert werden. Will man allerdings die räumliche Verteilung in einem Organ, z.B. in innerhalb weißen Pulpa in der Milz beurteilen, so muß man geeignete Strukturen zusätzlich anfärben. Zum Beispiel durch Anfärbung von Zentralarteriole und Marginalsinus mit PNA (peanut agglutinin) kann die weißen Pulpa von der roten Pulpa abgegrenzt werden. (Abb. 21).

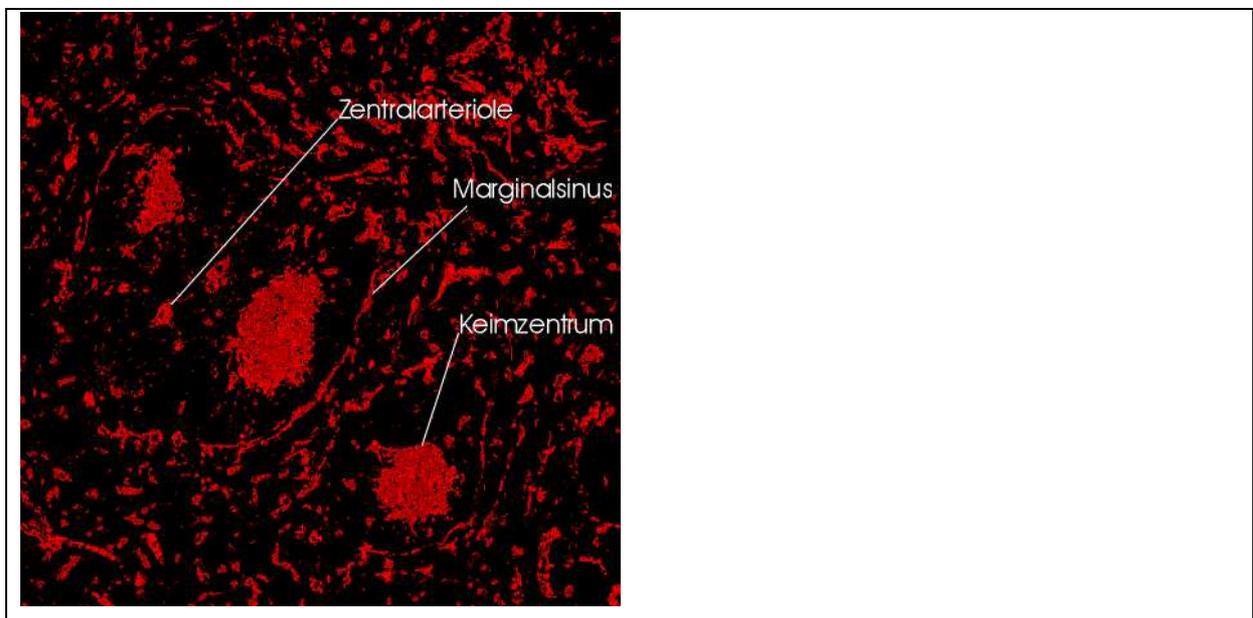


Abb. 20: Darstellung der Milzstruktur mit PNA (rot) zur besseren räumlichen Darstellung.

4.2 Phänotypischer Vergleich von TNF/LT defizienten Mäuse

Neue Daten verbessern das Verständnis über die Mechanismen, die die Funktion der Liganden und Rezeptoren der TNF/LT-Familie bei der Entwicklung sekundärenlymphatischen Or-

ganen ausüben. Betrachtet man den Aufbau von sekundärenlymphatischen Geweben, so muß man feststellen, dass alle eine ähnliche Grundstruktur aufweisen. T Lymphozyten und dendritische Zellen werden von B Lymphozyten umgeben, die gemeinsam mit follikulär dendritischen Zellen in den B Zell-Arealen sekundäre Follikel mit Keimzentren ausbilden. Die Vermutung, dass ähnliche Mechanismen die Entwicklung und Funktion dieser Organe steuern, liegt daher sehr nahe. Einer der wichtigsten Mechanismen liegt sicherlich in der Interaktion von $LT\beta$ -R positiven Stromazellen mit einwandernden $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierenden LITC-Zellen (Mebius et al; Tumanov et al.2003). Ein deutliches Indiz für diese These zeigt die $LT\beta$ -R defiziente Maus. Keine Lymphknoten, keine Peyer'schen Plaques und die am deutlich zerstörteste Milzarchitektur (Futterer et al. 1998). Bisher konnte kein weiterer einzelner Rezeptor oder Ligand gefunden werden, der einen vergleichbaren massiven Einfluß auf die Entwicklung von sekundärenlymphatischen Gewebe hat.

Als wichtigster Ligand fand man das membrangebundene $LT\alpha_1\beta_2$ (Browning et al., 1993; Browning et al., 1995; Ware et al., 1995), welches von ruhenden und aktivierten Leukozyten exprimiert wird. Knockout Mäuse, bei denen die Gene für die Liganden, $LT\alpha$ (Banks et al., 1998., 1995 ; De Togni et al., 1994) oder $LT\beta$ (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997, Alexopoulou et al.,1998), eliminiert wurden, sollten eigentlich einen vergleichbaren Defekt aufweisen wie die $LT\beta$ -R defiziente Maus. Die Phänotypen dieser Mäuse zeigen aber anderes Bild. Die $LT\beta^{-/-}$ Maus zeigt neben der Ausbildung von mukosalen LK (mesenteriale und cervikale) auch einen, relativ zur $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta R^{-/-}$, geringeren Defekt in der Milzarchitektur (Abb. 22). Die $LT\alpha^{-/-}$ hat zwar bereits eine zerstörte Milzarchitektur ähnlich der $LT\beta R^{-/-}$, aber immer noch entwickeln sich bei ihr in 5% der Fälle mesenteriale LK. Man sollte daher annehmen, dass am $LT\beta$ -R entweder noch weitere Liganden binden können, oder aber, dass es neben dem $LT\beta R$ noch andere Rezeptoren gibt die durch die Liganden $LT\alpha$ und $LT\beta$ aktiviert werden und Einfluß auf die Entwicklung der sekundärenlymphatischen Geweben ausüben können.

Betrachtet man zunächst die Frage nach weiteren Rezeptoren für die LT Liganden muß man die bisher bekannten Daten der Analyse der $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse betrachten. $LT\alpha$ kann nicht nur am $LT\beta R$ binden sondern auch an den Rezeptoren TNFRp55, TNFRp75 und HVEM (Paul an Ruddle, 1988; Lewis et al., 1991; Loetscher et al., 1990; Smith et al., 1990; More et al., 2000 ; Salio et al., 1999 ; Harrop et al.,1998.). Der Phänotyp der $LT\alpha$ defizienten Maus darf also nicht auf die Interaktion mit dem $LT\beta$ -R minimiert werden, sondern bedarf einer umfangrei-

chen phänotypischen Analyse der weiteren mit $LT\alpha$ interagierenden Rezeptoren. Eine der möglichen Rezeptoren ist HVEM. Allerdings zeigt die $HVEM^{-/-}$ Maus bei der Analyse der Milzarchitektur keinen Unterschied zum Wildtyp. Es entwickelt sich eine normale Marginalzone, B Zell Follikel und Keimzentren. T Zell- und B Zellbereiche liegen getrennt.

Als weitere Rezeptoren kommen TNFRp55 und TNFRp75 in Frage (Pasparkis et al., 1996; Marino et al., 1997 ; Pasparkiset al., 2000 ; Komer et al., 1997). Aus den Analysen der jeweiligen Knockout Mäuse weiß man, dass der Einfluß dieser Rezeptoren nur die Entwicklung der Marginalzone und die Entwicklung, Reifung und Migration der FDCs betrifft. Darüberhinaus findet man in der $TNF^{-/-}$ und der $TNFRp55^{-/-}$ Maus Defekte in der Entwicklung der Pey-er'schen Plaques. Hier kommt es zur Durchmischung von T/B Zellbereichen und zum Fehlen von FDCs (31,35).

Zusammengefaßt lässt sich sagen dass $LT\alpha$ durch Interaktion mit den Rezeptoren HVEM, den TNFRp55 und TNFRp75 nicht für die starke Zerstörung der T/B Segregation und der Marginalzone verantwortlich gemacht werden kann. Ein zusätzlicher, indirekter Beweis für die geringen Einfluß der TNF-Rezeptoren ist auch der Vergleich von $TNF^{-/-}$ Maus mit $TNFRp55^{-/-}$ und $TNFRp75^{-/-}$ Mäusen. Würden nämlich Signale durch $LT\alpha$ vermittelt werden, müssten die $TNFRp55^{-/-}$ und $TNFRp75^{-/-}$ Mäuse einen Phänotyp mit ausgeprägteren Defekten als die TNF KO Maus aufweisen. Allerdings sind alle diese Mäuse phänotypisch ähnlich, bzw die $TNFRp55$ Maus kann keine weitreichendere Defekte aufweisen.

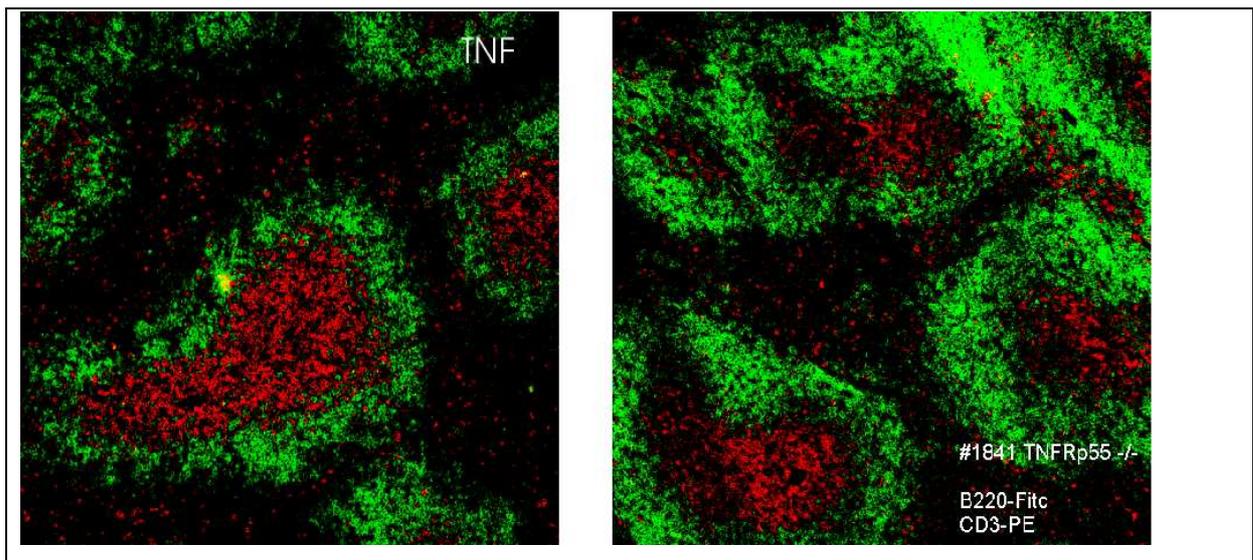


Abb. 21: Vergleich der $TNFRp55^{-/-}$ Maus mit der $TNF^{-/-}$. Beide zeigen in der T/B Segregation das gleiche Bild. Ringförmig um die T Zellen (CD3, rot) angeordnete B Zellen (B220, grün). Die Trennung von T und B Zellbereiche ist somit in beiden Mäusen noch vorhanden.

Bleiben die Vermutungen das entweder eine restliche Aktivierungsfähigkeit des LT β -R in den LT $\alpha^{-/-}$ bzw. LT $\beta^{-/-}$ Mäuse erhalten blieb, bzw. das doch noch weitere unbekannte Liganden am LT β -R binden können.

Um der Vermutung nach Restaktivierung des LT β -R in den LT α oder LT β Knockouts nachzugehen, wurde eine LT $\alpha\beta$ doppelt defiziente Maus hergestellt. In der LT $\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus bei der die Gene nicht durch eine Neomycin-Resistenz Kassetten ausgetauscht, sondern durch CRE-loxP vermittelte Deletion eliminiert wurden. Interessanterweise ist in der LT $\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus keine alterierte TNF Expression gemessen worden, wie es für die LT $\alpha^{-/-}$ Maus beschrieben ist. Betrachtet man den Phänotyp der LT $\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus so zeigt sich zum Einen, dass sind keine LK mehr nachweisbar sind. Das heißt, eliminiert man alle LT Liganden so scheint der Signalweg über den LT β -R so stark eingeschränkt zu sein, dass keine LK mehr gebildet werden können. Betrachtet man nun weiter die Milzarchitektur, so lässt sich feststellen dass die LT $\alpha^{-/-}$ Maus und LT $\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ Maus identische Phänotypen besitzen. Betrachtet man zusätzlich die Histologien der LT β -R Maus so kommt man allerdings zu dem Eindruck, dass die weiße Pulpa im Vergleich zur roten Pulpa noch in der LT β -R noch stärker zurückgedrängt und zerklüftet ist (Abb. 4.3). Eine eindeutige Aussage liefert lediglich die Färbung der dendritischen Zellen in der Milz. In der LT β -R Maus sind keine DC mehr nachweisbar gewesen, in der LT $\alpha^{-/-}$ und LT $\alpha\beta^{-/-}$ Maus allerdings schon. Leider ließ sich diese Beobachtung noch nicht durch ein anderes geeignete Verfahren nachweisen. Auch nach quantitativen Untersuchungen durch Facs-Analysen konnte bisher noch kein eindeutiger Unterschied bei den DC-Populationen der Milz festgestellt werden. So zeigen LT $\alpha^{-/-}$, LT $\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ und LT β -R $^{-/-}$ alle eine ähnliche Anzahl an B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK, bzw NK-T Zellen. Eine parallele Untersuchung aller Knockout Tiere sollte zukünftig durchgeführt werden.

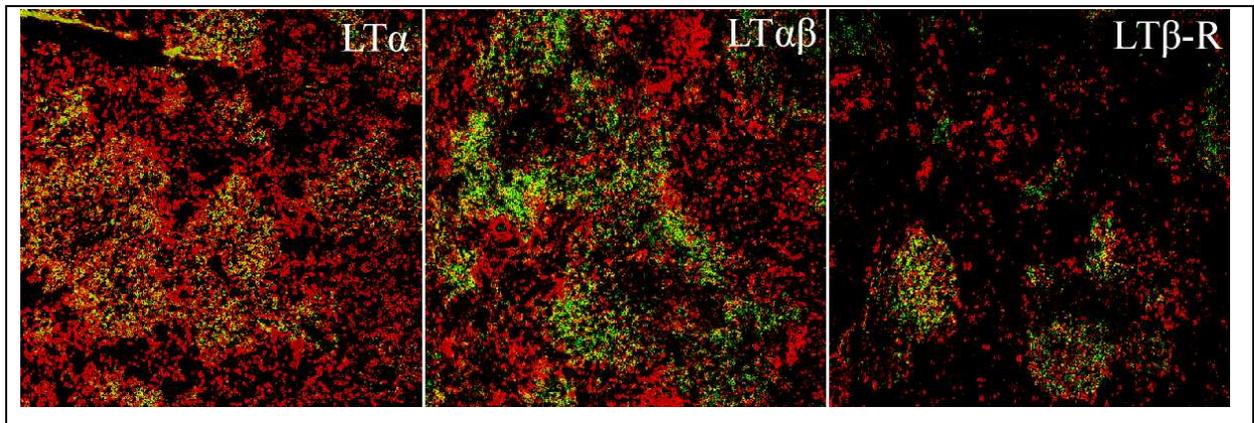


Abb. 22: Vergleich der Milzen von $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha\beta^{\Delta\Delta}$ und $LT\beta-R^{-/-}$ Mäusen. Anti-IgM (rot) und Anti-IgD (grün) Färbung. Zeigen $LT\alpha$ und $LT\alpha\beta$ eine ähnlichen Phänotyp mit Verlust der Marginalzonen B Zellen, Follikeln, Keimzentren, so wirkt die Milzarchitektur der $LT\beta-R$ noch deutlich massiver beeinträchtigt.

4.3 Ausblick

Betrachtet man also den $LT\beta$ -Rezeptor, wie in der Literatur beschrieben, das Schlüsselglied in der Übermittlung von Signalen dar, die zur Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen wichtig sind. Inzwischen wurde der Mechanismus der Zell-Zellinteraktion von $LT\beta-R$ positiven Stromazelle und $LT\alpha_1\beta_2$ produzierender LITC-Zelle weiter erforscht (19,27,33,42).

Mehrere Einzelprozesse sind notwendig, um eine regelhafte Stimulation des $LR\beta R$ zu gewährleisten. Zum einen Bedarf es der Migration von $LT\alpha_1\beta_2$ exprimierenden Zellen, welche durch Chemokine gesteuert wird (6). In den T Zellbereichen produzieren die Stromazellen in Abhängigkeit von $LT\alpha_1\beta_2$ die Chemokine CCL19 und CCL21 und ermöglichen so die Migration von DCs und T Lymphozyten, welche den CCR7 Rezeptor für genau diese Chemokine exprimieren. Im B Zellbereich ist es das Chemokin CXCL13, das CXCR5 positive B Zellen und FDCs einwandern lässt. Die Beeinflussung der Interaktion von unterschiedlichen Zellpopulationen durch Chemokine und ihre Rezeptoren läuft dabei nicht komplett getrennt zwischen T- und B Zellen ab. Es konnte gezeigt werden, dass T Helfer-Zellen nach Expressierung des CXCR5 Rezeptors in B Zell Follikel einwandern und so Einfluß auf die Immunglobulinproduktion nehmen (6,10).

Ein weiterer wichtiger Prozeß ist die Interaktion von Adhäsionsmolekülen und Integrinen. In den Lymphknoten und Peyer'schen Plaques zeigen Untersuchungen, das sowohl für die Aus-

bildung der ersten Lymphknotenanlagen die Stromazellen VCAM1 exprimieren, genauso wie die LITC mit dem Integrin $\alpha 4\beta 1$ an VCAM1 der Stromazellen binden können und so die Zellinteraktion verbessern (30). Leider gibt es bisher keine ähnliche Daten für die Milz. Interessant dabei ist, dass der Zelltyp welcher $LT\alpha_1\beta_2$ exprimiert und so die $LT\beta R$ Stromazelle stimuliert, gleichzeitig von dem Produkt der Stimulation, den Chemokinen und Adhäsionsmolekülen der Stromazelle, angelockt wird. Somit kommt ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang, der in einer Akkumulation von $LT\alpha_1\beta_2$ produzierenden Zellen um die Stromazelle endet.

Kommt es zur Störung von Migration, Adhesion und Stimulation so läuft dieser Kreislauf nur suboptimal ab. So zeigen sowohl die $CXCR5^{-/-}$ als auch die $TNF^{-/-}$ Maus eine ähnliche T- und B Zellverteilung in der Milz (19). Die B Zellen liegen zwar um die PALS, die Migration in die Milz ist also in beiden Tieren nicht eingeschränkt, aber es fehlen FDCs in der weißen Pulpa, wodurch sich keine Follikel ausbilden können (11,15). Die B Zellen liegen in beiden gendefizienten Tieren wie ein „Ring“ um die T Zellen. In der $TNF^{-/-}$ Maus ist dabei entweder die Marginalzone und/oder die Entwicklung der FDCs defekt wodurch die Migration der FDCs gestört ist (34,35). In der $CXCR5^{-/-}$ Maus ist zwar die Marginalzone intakt und die FDCs können sich normal entwickeln, aber es fehlt der geeignete Rezeptor damit die FDCs migrieren können.

Bei der Entstehung von Lymphknoten, Peyer'schen Plaques und der weißen Pulpa der Milz ist die primäre Induktion zur Stimulation der Stromazellen der entscheidende Moment. Dabei sind zur Zeit nur Daten aus den LK und PP verfügbar. In diesen Organen kommt es durch IL-7, bzw. bei den LK zusätzlich durch TRANCE zur initialen Stimulation der $CD3^+CD4^+CD45^+IL-7R^+$ haematopoietischen Zellen (LITC). Hierdurch gelangt der oben beschriebene Ablauf in Gang, der in der komplette Ausbildung von LK und PP resultiert (30). In diesem Zusammenhang weisen die $IL-7R^{-/-}$ und die $CXCR5^{-/-}/CXCL13^{-/-}$ Mäuse ein Fehlen von fast allen Lymphknoten bis auf den mesenterialen LK, auf. Als doppelt defiziente $IL-7^{-/-}/CXCR5^{-/-}$ Maus hingegen fehlen alle LK (29). Somit kann man durch Einschränkung der Induktion als auch der Migration der LITC, den selben Defekt erreichen, den auch ein Ausfall des $LT\beta R$ hätte. Die Signale, die in den LK und PP die initiale $LT\alpha_1\beta_2$ Produktion auslösen sind bekannt, in der Milz aber noch ungeklärt. Allerdings wurde bereits geklärt, dass in der Milz der adulten Maus der Hauptteil des $LT\alpha_1\beta_2$ von B- und der kleinere Teil von T Lymphozyten gebildet wird. T und B Lymphozyten selbst spielen bei der Entwicklung von

LK und PP keine Rolle (42). So bleibt festzuhalten, dass die Zelltypen, die an der Interaktion mit den Stromazellen beteiligt sind, in den verschiedenen sekundären lymphatischen Organen noch nicht vollständig identifiziert wurden. So werden Versuche, in denen die Produktion von TNF/LT – Liganden und Rezeptoren selektiv in verschiedenen Zellpopulationen blockiert werden, neue Aufschlüsse darüber bringen, welche Zellpopulationen an der Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen beteiligt sind (Tumanov et al. 2003)

Einer der wohl interessantesten Punkte bei der Betrachtung der Entwicklung von sekundären lymphatischen Gewebe sind die Unterschiede bei der Entwicklung des mesenterialen und des cervicalen Lymphknoten. Warum gerade der mesenteriale und auch der cervikale Lymphknoten sich in einigen Knockout Mäusen entwickeln kann, in denen ansonsten keine andere Lymphknoten entstehen, bleibt nach wie vor Spekulation. Vielleicht liegt hier das Grundniveau der Stimulation der Stromazellen höher als in den restlichen LK (???). Allerdings sollten in diesem Zusammenhang nochmals die Darm-assoziierten $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R^+$ haematopoietischen Vorläuferzellen (LITC) in Betracht gezogen werden. Diese LITC, die nachweislich für die Ausbildung und Entwicklung von LK und PP wichtig sind, stellen gleichzeitig eine Vorläuferstufe für NK Zellen dar. Bei der $LT\alpha^{-/-}$ Maus, welche weder Mucosa-assoziierte LK, noch eine normale Anzahl und Funktion von NK Zellen besitzt (13,39), wurde eine geringere Anzahl an haematopoietischen Vorläuferzellen festgestellt (21). Es stellt sich die Frage, ob diese Zellen, die sich im Bereich des Darms entwickeln, für das Auftreten von mesenterialen Lymphknoten in der $LT\beta^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ Maus verantwortlich sind. Leider wurde die $LT\beta^{-/-}$ Maus noch nicht bzgl. der Zahl der LITC untersucht. Vielleicht könnte ein Vergleich der Anzahl an LITC in der $LT\beta^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ Maus eine Erklärung für das Auftreten der mesenterialen und cervicalen LK liefern.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde systematisch eine vergleichende Analyse der Rolle von Tumor Nekrose Faktor und Lymphotoxinen sowie dem Lymphotoxin β Rezeptor bei der Aufrechterhaltung der dynamischen Architektur von lymphatischen Organen durchgeführt. Hierzu wurden Mauslinien herangezogen, die einen genetischen Defekt eines oder mehrerer dieser Moleküle aufweisen. Dabei stellte sich nach eingehenden Analysen heraus, dass der $LT\beta R$ die Schlüsselfunktion bei der Ontogenese von Lymphknoten und Peyer'schen Plaques einnimmt, sowie für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der dynamisch organisierten Milzstruktur essentiell ist. Durch Untersuchungen der $LT\alpha\beta^{\Delta/\Delta}$ defizienten Mauslinie konnte gezeigt werden, dass sowohl im Hinblick auf die Entwicklung der Lymphknoten und Peyer'schen Plaques, als auch der Milzarchitektur, die Eliminierung von $LT\alpha$ und $LT\beta$ zusammen ausreicht, um einen Phänotyp zu erhalten, der größere Defekte aufweist als die Eliminierung von $LT\alpha$ oder $LT\beta$ alleine. Die Analyse der Defektsituation in Liganden ($LT\alpha\beta$) und Rezeptor ($LT\beta R$) defizienten Mauslinien weist keine vollständige Kongruenz der Phänotypen auf, da in $LT\alpha\beta$ -defizienten Tieren, im Gegensatz zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren noch mesenteriale Lymphknoten nachweisbar sind. In der $LT\beta R$ -defizienten Maus ist ebenfalls eine größere Defektausprägung in der Milz gegenüber den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Tieren zu erkennen. Möglicherweise spielen hierbei fehlende Dendritische Zell-Subpopulationen innerhalb der Milz von $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden konnten eine wichtige Rolle. Die Analyse von $LIGHT^{-/-}$ Tieren und die Kreuzung von $LT\beta$ - mit $LIGHT$ -defizienten Tieren zeigte, dass $LIGHT$ keine essentiellen Funktionen bei der Organisation der Milzarchitektur hat.

Im technischen Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die histologische Analyse von Gewebeschnitten mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ein zeitsparendes und qualitativ überlegenes Verfahren ist, das zum einen unter dem Gesichtspunkt der Nachbearbeitung und Archivierung, zum anderen bei der detaillierten Analyse von Zellpopulationen, z.B. in Milz und Lymphknoten, deutliche Vorteile gegenüber der konventionellen Fluoreszenz-Lichtmikroskopie bringt. Nicht zuletzt aus diesen Gründen ist die konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur Analyse von Zellen und Geweben das Standardverfahren in internationalen Publikationen geworden.

Literaturverzeichnis

1. Fu, YX., Chaplin, DD.
Development and maturation of secondary lymphoid tissues.
Annu. Rev. Immunol. 17 (1999) 399-433
2. Loes, A., Borst, G., Borst, J.
Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system.
Immunology 10 (1998) 423-434
3. Scheu, S.
Generierung und Analyse einer LIGHT defizienten Mausmutante.
Dissertation an der TU München, Fakultät für Chemie, 2002
4. Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M.
A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen
Cell (1996) 87 1037-1047.
5. Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Cyster, R.
A chemokine driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.
Nature (2000) 406 309-314
6. Bazin, H., Platteau, B., MacLennan, I.C., Stuart, N.S., Khan, M., Johnson, G.D.
B cell production in adult rats.
Adv Exp. Med. Biol. (1985) 186 65-71.
7. Fu, Y.X., Huang, G., Wang, Y., Chaplin, D.D.
B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion.
J. Exp. Med. (1998) 187 1009-1018.
8. Gonzalez, M., Mackay, F., Browning, J.L., Kosco-Vilbios, M.H., Noelle, R.J.
The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles.
J. Exp. Med. (1998) 187 997-1007
9. Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., Cyster, J.G.
Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of ELC gene in the *plt/plt* mouse.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2000) 97 12694-12699.

-
10. Ngo, V.H., Corner, M.D., Gunn, K.N., Schmidt, D.S., Riminton, M.D., Cooper, J.L., Browning, J.D., Sedgwick, Cyster, J.G.
Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen.
J. Exp. Med. (1999) 189 403-412.
 11. De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N.H., Streeter, P.R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S.C., Carlson, R., Shornick, L.P., Strauss-Schoenberger, J.
Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin.
Science (1994) 264 703-707.
 12. Alimanzhanov, M.B., Kuprash, D.V., Kosco-Vilbois, M.H., Luz, A., Turetskaya, R.L., Tarakhovsky, A., Rajewsky, K., Nedospasov, S.A., Pfeffer K.
Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) 94 9203-9207.
 13. Ngo, V.N., Cornall, R.J., Cyster, J.G.
Splenic T zone development is B cell dependent.
J. Exp. Med. (2001) 11 1649-1660.
 14. Abe, K., Yarovinsky F.O., Murakami, T., Shakhov, A.N., Tumanov, A.V., Ito D., Drutskaya, L.N., Pfeffer, K., Kuprash, D.V., Kornschlies, K.L., Nedospasov, S.A.
Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo.
Blood. 101 (2003) 1477-1483.
 15. Mebius, R.E., Rennert, P., Weismann, I.L.
Developing lymphnode collect $CD4^+CD3^-LT\alpha1\beta2^+$ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T and B cells.
Immunity (1997) 7 493-504
 16. Smyth, M.J., Johnstone, R.W., Cretney, E., Haynes, N.M., Sedgwick, J.D., Korner, H., Poulton, L.D., Baxter, A.G.
Multiple deficiencies underlie NK cell inactivity in lymphotoxin- α gene targeted mice.
Journal of Immunology (1999) 163 1350-1353.

-
17. Alexopoulou, L., Pasparakis, M., Kollias, G.
Complementaion of lymphotoxin- α knockout mice with tumor necrosis factor-expressing transgenes rectifies defective splenic structure and function.
J. Exp. Med. (1998) 188 745-754.
18. Loder, F., Mutschler, B., Robert, J.R., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., Carsettim, R.
B cell Development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals.
J. Exp. Med. (1999) 190 75-89
19. Bowman, E.P., Campbell, J.J., Soler, D., Dong, Z., Manlongat, N., Picarella, D., Hardy, R.R., Butcher, E.C.
Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. J. Exp. Med. (2000) 191 1303-1317.
20. Pasparakis, M., Kousteni, S., Peschon, J., Kollias, G.
Tumor necrosis factor and the p55TNF Receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors.
Cell. Immunology (2000) 201 33-41
21. Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O. Förster, R.
Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs.
J. Exp. Med. (2003) 197 1199-1204.
22. Yoshida, H., Naito A., Inoue J., Satoh M., Santee-Cooper SM., Ware CF., Togawa A., Nishikawa S.
Different cytokines induce surface lymphotoxin- $\alpha\beta$ on IL-7 receptor- α cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches.
Immunity (2002) 17 823-833.
23. Mebius, R.E., Miyamoto T., Christensen J., Domen J., Cupdeo T., Weissma IL., Akashi K.
The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages.
J. Immunology (2001) 166 6593-6601.

-
24. Sun, Z., Unutmaz D., Zou YR., Sunshine NJ., Pierani A., Brenner-Mortens S., Littman DR.
Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development.
Science (2000) 288 2369-2373.
25. Yokota, Y., Mansouri A., Mori S., Sugawara S., Adachi S., Nishikawa S., Gruss P.
Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on helix-
loop-helix inhibitor Id2.
Nature (1999) 397 702-706.
26. Finke, D., Acha-Orbea, H., Mattis, A., Lipp, M., Kraehenbuhl, J.
CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development. Role of $\alpha 4\beta 1$ integrin activation
by CXCR5.
Immunity (2002) 17 363-373.
27. Kim, D., Mebius RE., MacMicking JD., Jung S., Cupedo T., Castellanos Y., Rho J.,
Wong BR., Josien R., Kim N., Rennert PD., Choi Y.
Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis family member
TRANCE.
J. Exp. Med. (2000) 192 1467-1478.
28. Ansel, K.M., Ngo VN., Hyman PL., Luther SA., Forster R., Sedgwick JD., Browning
JL., Lipp M., Cyster JG.
A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.
Nature (2000) 406 309-314.
29. Mebius, R.E., Rennert P., Weissmann I.L.
Developing lymphnode collect CD4+CD3-LT β + cells that can differentiate to APC,
NK cells, and follicular cells but not to B or T cells.
Immunity (1997) 7 493-504.
30. Korner, H. Cook M., Riminton DS., Lemckert FA., Hoek RM., Lederman B., Köntgen
F., Fazekas de St Groth B., Sedgwick JD.
Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in organogenesis and spa-
tial organization of lymphoid tissue.
Eur. J. Immunology (2001) 27 2600-2609.

-
31. Bancheraeu, J., Steinmann, R.M.
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature (1998) 392 245-247.
 32. Roberts, CW., Shutter, JR., Korsmeyer, SJ.
Hox11 controls the genesis of the spleen.
Nature (1994) 368 747-749.
 33. Luther, S.A., Bidgol A., Hargreaves DC., Schmidt A., Xu Y., Paniyadi J., Matloubian M., Cyster JG.
Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis.
J Immunol. (2002) 169 424-433.
 34. Tumanov, AV., Grivennikov, SI., Shakhov, AN., Rybtsov, SA., Koroleva, EP., Takeda, J., Nedospasov, SA., and Kuprash, DV.
Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting.
Immunological reviews (2003) 195 106-116.
 35. Honda, K., Nakano, H., Yoshida, H., Nishikawa, S., Rennert, P., Ikuta, K., Tamechika, M., Yamaguchi, K., Fukumoto, T., Chiba, T.
Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis.
J. Exp. Med. (2001) 193 621-630.
 36. Breitfeld, D., Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M., Forster R.
Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.
J. Exp. Med.(2000) 192 1545-1552.
 37. Luther, SA., Ansel, KM., Cyster, JG.
Overlapping roles of CXCL13, Interleukin 7 Receptor α , and CCR7 ligand in lymph node development.
J. Exp. Med. (2003) 9 1191-1198.
 38. Loes, A., Borst, G., Borst, J.
Tumor necrosis receptor family members in the immune system.
Seminars in Immunology (1998) 10 423-434.

-
39. Ansel, KM., McHeyzer-Williams, LJ., Ngo, VN., McHeyzer-Williams, MG.
In vivo activated CD4 T cells upregulated CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines.
J. Exp. Med. (1999) 190 1123-1134.
40. Breitfeld, D., Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M., Forster R.
Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.
J. Exp. Med. (2000) 190 1545-1552.
41. Cyster, JG., Ansel KM., Reif K., Ekland EH., Hyman PL., Tang HL., Luther SA., Ngo VN.
Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles.
Immunol. Review. (2000) 176 181-193.
42. Neumann, B., Luz, A., Pfeffer, K., Holzmann, B.
Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kd receptor for tumor necrosis factor.
J. Exp. Med. (1996) 184 259-264.
43. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmair, K., Bluethmann, H., Kollias, G.
Peyer's Patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) 94 6319-6323.
44. Mebius, RE.
Organogenesis of lymphoid tissues.
Nature Reviews in Immunology (2003) 3 292-303.
45. Elewaut D., Brossay L., Santee SM., Naidenko OV., Burdin N., Winter HD., Matsuda J., Ware CF., Cheroutre, H., Kronenberg, M.
Membrane Lymphotoxin is required for the Development of different subpopulations of NK T cells.
J. Immunology (2000) 165 671-679.
46. Yoshimoto, T., Paul, WE.,
CD4, NK1.1 T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge

-
- with anti-CD3
. J. Exp. Med. (1994) 179:1285-1290
47. Tertilt, C.M.,
Untersuchung zur Funktion von Zellen mit NK-Rezeptoren bei der Abstoßung allogener Herztransplantate durch CD28-defiziente Mäuse.
Dissertation TU München, Fakultät für Medizin (2002)
48. Ito, D., Back, T.C., Shakhov, A.N., Wiltrott, R.H., Nedospasov, S.A.
Mice with a targeted mutation in lymphotoxin- α exhibit enhanced tumor growth and metastasis, impaired NK cell development and recruitment.
J. Immunology (1999) 163 2809-2815
49. Wu, Q., Sun, Y., Wang, J., Lin, X., Wang, Y., Pegg, L.E., Fütterer, A., Pfeffer, K., Fu, YX.
Signal via lymphotoxin β receptor on bone marrow stromal cells is required for an early checkpoint of NK cell development.
J. Immunology (2001) 166 1684-1689