

Regionspezifische Immunreaktionen werden  
maßgeblich durch Stromazellen des  
Lymphknotens beeinflusst

Kumulative Habilitationsschrift  
zur Erlangung der *Venia legendi*  
für das Fachgebiet  
Zellbiologie

an der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

vorgelegt im Juni 2022

von

Dr. rer. nat. Manuela Büttner, geb. Ahrendt

geboren am 27.07.1977 in Magdeburg



# 1. Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes und sensibles Netzwerk, das den Körper gegen fremde Substanzen und Keime schützt aber auch Toleranz gegenüber harmlosen Stoffen induziert. Lymphknoten (LN) spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie als zentrale Kontrollstationen Infektionen erkennen und eindämmen oder Toleranz induzieren. LN sind über das Lymphgefäßsystem mit einem Organsystem bzw. einem definierten anatomischen Organanteil verbunden (regionaler LN). Periphere LN (pLN) drainieren große Gebiete der Haut, wohingegen die Mesenteriallymphknoten (mLN) das Gebiet des Magen-Darm-Traktes drainieren. Alle LN weisen eine geordnete Kompartimentierung aus 3 Komponenten auf: dem Paracortex, dem Cortex und der Medulla. Das Grundgerüst des LN wird durch Stromazellen gebildet. Diese nicht wandernden, nicht hämatopoetischen Zellen unterscheiden sich in den Kompartimenten des LN. Es wurden verschiedene Hauptpopulationen identifiziert. Zu diesen gehören Blutendothelzellen (BEC) und Lymphendothelzellen (LEC) sowie Retikulumzellen (FRC: Fibroblastische Retikulumzellen, FDC: Follikuläre dendritische Zelle, MRC: marginale Retikulumzellen)

Jedes drainierende Gebiet zeigt neben diesen gleichen Merkmalen auch unterschiedliche phänotypische Merkmale innerhalb der LN. Im mLN sind IgA-produzierende Plasmazellen nachweisbar, wohingegen im pLN IgG-produzierende Zellen vorherrschen. Hochendotheliale Venolen (HEV) des mLN exprimieren das Adhäsionsmolekül MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*), im Gegensatz dazu exprimieren HEV der pLN kein MAdCAM-1. Weiterhin exprimieren Stromazellen der mLN das Enzym Retinal-Dehydrogenase 2 (RALDH2), welches bei der Wanderung von Lymphozyten in das drainierende Gebiet des mLN eine wesentliche Rolle spielt. Stromazellen des pLN produzieren kein RALDH2. Mit Hilfe eines Transplantationsmodells konnten wir zeigen, dass in Tieren mit einem pLN im drainierenden Gebiet des mLN (pLNtx: transplantiertes pLN) eben diese phänotypischen Merkmale des drainierenden Gebietes weiterhin nachweisbar blieben. Dies führt zu einer verringerten spezifischen Immunantwort gegen ein Antigen und die Induktion von oraler Toleranz entsteht unterschiedlich.

Mein Ziel war es aufzuklären, inwiefern Stromazellen die Funktionen des LN im Mausmodell beeinflussen, wie sie andere Zellen innerhalb des LN leiten und somit das drainierende Gebiet verändern.

Zunächst konnten wir Stromazellen durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung genauer identifizieren. 14 transkriptionelle Cluster konnten nachgewiesen werden, wovon nur wenige bereits als Stromazellsubpopulation bekannt waren. Naive Stromazellen des mLN und pLN zeigten Unterschiede in der Zytokinexpression und der Expression von Genen des Lipidmetabolismus. Gene werden somit abhängig vom drainierenden Gebiet im LN exprimiert.

Weiterhin haben wir innerhalb des Transplantationsmodells untersucht, inwiefern Stromazellen an der Regeneration der Lymphknotenfragmente beteiligt sind. Wir konnten zeigen, dass Stromazellen des Cortex und des Paracortex wichtige Zellpopulationen sind, um einen funktionsfähigen LN aufzubauen. Dieser Wiederaufbau der Lymphknotenstruktur geschah durch die Proliferation der Stromazellen. Weiterhin hat der VEGF-C (*vascular endothelial growth factor-C*), ein Wachstumsfaktor für LEC, einen positiven Einfluss auf die Regeneration transplanteder LN. Nach Transplantation isolierter Subpopulationen der Stromazellen (BEC, FRC, LEC) konnten keine regenerierten LN nachgewiesen werden. Werden jedoch alle Stromazellen des LN transplantiert, entwickelt sich ein LN mit ortsspezifischen Expressionsmerkmalen.

Die Mikrobiota oder Nahrungsbestandteile wie Fette haben einen Einfluss auf Stromazellen und somit auf die Funktion des LN. Das Immunsystem ist im Normalzustand im Gleichgewicht mit der Mikrobiota, die den Intestinaltrakt besiedelt. Regulatorische T-Zellen (Tregs) übernehmen dabei eine zentrale Aufgabe. Tregs werden zu einem höheren Prozentsatz im mLN im Vergleich zum pLN induziert, und dabei scheint die Mikrobiota eine wichtige Rolle für die Prägung der Stromazellen zu spielen. Weiterhin kommt es aufgrund erhöhter Lipidaufnahme zu Änderungen in der Mikroarchitektur und zur Akkumulation von Lipidtröpfchen in Stromazellen. Diese beeinflussen die immunologische Funktion der mLN. So wurde bei Mäusen unter fettreicher Diät orale Toleranz geringer induziert als in Kontrolltieren. Stromazellen des mLN wiesen in Tieren mit einer entzündlichen Darmerkrankung einen aktivierteren Zustand und eine erhöhte Expression von verschiedenen Chemokinen auf, wohingegen Stromazellen von pLN<sub>tx</sub> Tieren eine verringerte Aktivierung während einer Darmentzündung zeigten.

Stromazellen sind somit eine wichtige Komponente sowohl für den Aufbau des LN als auch für die Ausübung regionsspezifischer immunregulatorischer Funktionen.

## 2. Abstract

The immune system is a highly complex and sensitive network that protects the body against foreign substances and microorganisms but also induces tolerance to harmless antigens. Lymph nodes (LN) play an important role in this process, as they act as control stations to detect and contain infections or induce tolerance. LNs are connected to an organ system or a defined anatomical region via the lymphatic vasculature (regional LN). Peripheral LN (pLN) drain large areas of the skin, whereas mesenteric lymph nodes (mLN) drain the area of the gastrointestinal tract. All LNs are compartmentalized in three compartments: the paracortex, the cortex, and the medulla. Stromal cells form the backbone of the LN. These sessile, nonhematopoietic cells differ between compartments of the LN. Several major populations have been identified. These include blood endothelial cells (BEC), lymphatic endothelial cells (LEC), and reticulum cells.

However, each draining region also results in different phenotypic characteristics of the LN. Region-specific CD103<sup>+</sup> dendritic cells (DC) or IgA-producing plasma cells are detectable in the mLN, whereas IgG-producing cells predominate in the pLN. High endothelial venules (HEV) of the mLN express the adhesion molecule MAdCAM-1. Using a transplantation model, we demonstrated that in animals with a pLN in the draining region of the mLN, a reduced specific immune response against an antigen is elicited and that the induction of oral tolerance arises differently.

Therefore, my research goal was to elucidate the extent to which stromal cells influence the functions of the LN in a mouse model, in particular how they direct other cells within the LN, and thus alter the draining area.

First, we characterized stromal cells in more detail by single cell RNA sequencing. In total, we detected fourteen transcriptional clusters of which only few were already classified as stromal cell subpopulations. Naive stromal cells of mLN and pLN showed differences in cytokine expression and expression of genes related to the lipid metabolism. Thus, showing that the gene expression depends on the draining area in the LN.

Furthermore, to investigate the extent to which stromal cells are involved in the regeneration of lymph node fragments we applied our well-established LN transplantation model. Here we demonstrated that stromal cell populations of the

cortex and paracortex are important to establish a functional LN. This reconstruction of the lymph node structure occurred through the proliferation of stromal cells. Furthermore, vascular endothelial growth factor C, a growth factor for LEC, had a positive effect on the regeneration of transplanted LN. After transplantation of isolated subpopulations of stromal cells (BEC, FRC, LEC), no regenerated LN was detected. However, when all stromal cells of the LN were transplanted (neotx), an LN with site-specific expression characteristics developed.

The microbiota or dietary components such as lipids influence stromal cells and thus the function of the LN. In a eubiotic state, the immune system is in an equilibrium with the microbiota that colonizes the intestinal tract. Regulatory T cells (Tregs) play a central role in this process. Tregs are induced to a higher percentage in the mLN compared to the pLN and in this process the microbiota seems to be important in imprinting the stromal cells. Furthermore, changes in microarchitecture and accumulation of lipid droplets in stromal cells occurred due to increased lipid uptake, and through this affected the immunological function of the mLN. Thus, oral tolerance was induced to a lesser extent in mice on a high-fat diet than in control animals. Stromal cells of the mLN exhibited a more activated state in animals with inflammatory bowel disease and increased expression of various chemokines, whereas stromal cells from pLNtx animals showed decreased activation during intestinal inflammation.

Thus, stromal cells are an important component for both the assembly of the LN and the induction of region-specific immunoregulatory functions.

### 3. Inhalt

1. Zusammenfassung .....	1
2. Abstract .....	3
3. Inhalt .....	5
4. Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift .....	6
5. Abkürzungsverzeichnis .....	9
6. Einleitung .....	11
6.1 Lymphknoten-anatomie und -organisation .....	12
6.2 Die Funktion des Lymphknotens und seiner Stromazellen .....	14
6.2.1 Einfluss der Stromazellen bei der Homöostase .....	14
6.2.2 Einfluss von Stromazellen während einer Immunantwort .....	16
6.3 Unterschiede zwischen darmdrainierenden Mesenteriallymphknoten und Hautdrainierenden peripheren Lymphknoten .....	18
6.4 Das Transplantationsmodell .....	20
7. Ziel der Habilitation .....	22
8. Stromazellen des Lymphknotens unterscheiden sich in den drainierenden Gebieten ....	23
8.1 Ausblick „Lymphknotenstromazellen-spezifische Unterschiede“ .....	25
9. Regeneration von Lymphknoten nach Transplantation .....	26
9.1 Ausblick „Lymphknotenregeneration“ .....	31
10. Einfluss von Lymph-drainierenden Komponenten auf LN .....	33
10.1 Ausblick „drainierendes Gebiet“ .....	39
11. Schlussfolgerung .....	41
12. Literaturverzeichnis .....	42
13. Anhang .....	47
13.1 Abbildungsverzeichnis .....	47
14. Danksagung .....	48
15. Erklärung .....	49

## 4. Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift

Die in der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Studien wurden sowohl im Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Christian Mühlfeld) als auch am Institut für Versuchstierkunde (Leiter: Prof. André Bleich, PhD) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Sie stellen eine Auswahl von neun publizierten Originalarbeiten dar, die sich unter dem Thema „Stromazellen des Lymphknotens“ zusammenfassen lassen.

Die nachfolgend aufgeführten Publikationen sind der Habilitationsschrift beigelegt.

1. **Buettner M**, Dittrich-Breiholz O, Falk CS, Smoczek A, Menzel F, Bornemann M, Bode U. (2015) Stromal cells as trend-setters for cells migrating into the LN. *Mucosal Immunol.* 8:640-9  
Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vivo* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts
2. Streich K, Smoczek M, Hegermann J, Dittrich-Breiholz O, Bornemann M, Siebert A, Bleich A, **Buettner M** (2020) Accumulation of lipids in the mesenteric lymph node *J Advanced Research* 24:291-300  
Eigener Beitrag: Planung und Auswertung der *in vivo* Versuche, Auswertung der Genanalysen, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts
3. Pezoldt J, Pasztoi M, Zou M, Wiechers C, Beckstette M, Thierry GR, Vafadarnejad E, Floess S, Arampatzi P, **Buettner M**, Schweer J, Fleissner D, Vital M, Pieper DH, Basic M, Dersch P, Strowig T, Hornef M, Bleich A, Bode U, Pabst O, Bajenoff M, Saliba AE, Huehn J. (2018) Neonatally imprinted mesenteric lymph node stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells. *Nature Communication* 25;9:3903.  
Eigener Beitrag: Durchführung der Transplantationen, Korrektur des Manuskripts

4. **Buettner M**, Bode U. (2011) Stromal cells directly mediate the re-establishment of the lymph node compartments using signaling through CXCR5 and by CCL19/21. *Immunology*. 133:257-69  
Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche, Anfertigung des Manuskripts
  
5. Sommer T, **Buettner M**, Bruns F, Breves G, Hadamitzky C, Pabst R. (2012) Improved Regeneration of autologous transplanted Lymph node fragments by VEGF-C treatment. *Anat Rec*. 295:786-91  
Eigener Beitrag: Durchführung und Auswertung der immunhistologischen Färbungen, Korrektur des Manuskripts
  
6. Schindewolffs L, Breves G, **Buettner M**, Hadamitzky C, Pabst R. (2014) The avascular transplantation of autologous lymph node fragments as an animal model for the treatment of secondary lymphedema: the effects of time point, location and dosage of VEGF-C on the regeneration and reconnection of the lymphatics. *Immun Inflamm Dis*. 2:152-61  
Eigener Beitrag: Durchführung und Auswertung der immunhistologischen Färbungen, Korrektur des Manuskripts
  
7. Cording S, Wahl B, Kulkarni D, Chopra H, Petzoldt J, **Buettner M**, Dummer A, Hadis U, Heimesaat M, Bereswill S, Falk C, Bode U, Hamann A, Fleissner D, Huehn J and Pabst O. (2013) The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes. *Mucosal Immunol*. 7:359-68  
Eigener Beitrag: Durchführung der Transplantationen, Korrektur des Manuskripts
  
8. Streich K, Klein M, Siebert A, Bleich A, **Buettner M** (submitted) Diet-induced obesity results in impaired oral tolerance induction  
Eigener Beitrag: Planung und Auswertung der Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung und Korrektur des Manuskripts

9. Basic M, Peppermüller PP, Bolsega S, Bleich A, Bornemann M, Bode U, **Buettner M** (2021) Lymph node stromal cells from different draining area distinctly regulate the development of chronic intestinal inflammation. Front Immunol. 11:549473

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche, Literaturrecherche, Anfertigen und Korrektur des Manuskripts

## 5. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BAFF	B-Zell-Aktivierungsfaktor
BEC	Blutendothelzellen
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CXCL	C-X-C motif Chemokin Ligand
DC	Dendritische Zellen
DSS	Dextran Natrium Sulfat
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein
FDC	Follikulär dendritische Zelle
FRC	Fibroblastische Retikulumzellen
HEV	Hochendotheliale Venole
HFD	Fetteiche Diät (High-fat diet)
IL	Interleukin
IgA	Immunglobulin A
LEC	Lymphatische Endothelzelle
LFD	Fettreduzierte Diät (Low-fat diet)
LN	Lymphknoten
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1
MHC	Major histocompatibility complex
migDC	Migrierende Dendritische Zellen
mLN	Mesenteriallymphknoten
mLNtx	Transplantierte Mesenteriallymphknoten

MRC	Marginale Retikulumzellen
Neotx	Transplantierte artifizielle Lymphknoten
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pLN	Periphere Lymphknoten
pLNtx	Transplantierte periphere Lymphknoten
PP	Peyer'sche Platten
<i>Ptgis</i>	Prostaglandin I2 Synthase
RA	Retinsäure
RALDH2	Retinaldehyd-Dehydrogenase 2/ <i>Aldh2a1</i>
resDC	Residente Dendritische Zellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor C

---

## 6. Einleitung

Das Immunsystem stellt ein hochkomplexes System dar, das den Körper sowohl vor gefährlichen Stoffen schützen als auch gegenüber harmlosen Stoffen eine Toleranzreaktion im Körper induzieren kann. Unterschieden wird hierbei außerdem die angeborene (unspezifische) Immunität und die erworbene (spezifische) Immunität, die unterschiedliche Aufgaben während einer Immunantwort übernehmen, jedoch eng aufeinander abgestimmt sind. Aufgebaut ist das Immunsystem aus unterschiedlichen Komponenten, die ein effizientes Netzwerk bilden. Hierzu gehören Grenzbarrieren wie Haut und Schleimhaut, Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (wie Dendritische Zellen (DC) und Lymphozyten) sowie lösliche Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine. Durch ein Zusammenspiel aller Komponenten des Immunsystems kommt es zu einer sehr effizienten Abwehrreaktion oder Induktion von Toleranz gegenüber fremden Strukturen, den sogenannten Antigenen. Dies geschieht zunächst vor allem durch spezialisierte Zellen des Immunsystems, die entweder gewebständig sind und im jeweiligen Gewebe auf ein mögliches Fremdantigen warten, oder migrierende Zellen, die auf der Suche nach Fremdantigenen durch den Körper wandern <sup>1,2</sup>. Die Bildung dieser Zellen erfolgt im Knochenmark, welches ein primäres lymphatisches Organ darstellt. Neben den primären lymphatischen Organen, in denen die Reifung der T-Zellen (Thymus) und B-Zellen (Knochenmark) stattfindet <sup>3,4</sup>, gibt es sekundäre lymphatische Organe, in denen reife Lymphozyten Kontakt zu Antigenen aufnehmen. Zu diesen sekundären lymphatischen Organen gehören die Milz, die Peyer'schen Platten (PP), Tonsillen und die Lymphknoten (LN) <sup>5</sup>. Sie stellen die Infrastruktur zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase bereit und ermöglichen schnelle und effektive Immunantworten. Während Milz und PP dazu dienen, Blut bzw. aufgenommene Nahrungsmittel zu filtern, sind LN im ganzen Körper verteilt und an strategisch wichtigen Stellen in der Nähe von Verzweigungen des Lymphgefäßsystems oder Blutgefäßsystems gelegen. Ihre Aufgabe umfasst es, Antigene zu filtern und den Eintritt von Immunzellen aus umgebenden Geweben zu erleichtern. In fast allen Gewebetypen, in denen eine Entzündung entweder durch Autoimmunität, Infektion oder Krebs entsteht, entwickeln sich außerdem kleine lymphatische Strukturen, sogenannte tertiäre lymphatische Organe <sup>6</sup>.

Da Lymphknoten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen und der Induktion von Toleranz spielen, soll der Fokus der vorliegenden Habilitationsschrift auf dem

---

Aufbau von Lymphknoten liegen. Insbesondere wird in dieser Arbeit auf die Rolle der ortsständigen Bindegewebszellen, den sogenannten Stromazellen, eingegangen. Diese haben nicht nur eine wesentliche Bedeutung für die Struktur von Lymphknoten, sondern übernehmen außerdem zentrale Aufgaben in der Entstehung und Regulation von Immunantworten im Körper.

## 6.1 Lymphknotenanatomie und –organisation

Lymphknoten sind kleine, nierenförmige Organe, die im Menschen variabel positioniert im gesamten Körper vorkommen. Mäuse hingegen haben lediglich 20-30 LN, die immer an der gleichen Lokalisation im Körper entstehen und den gleichen Aufbau aufweisen <sup>7</sup>.

Alle Lymphknoten sind von einer Bindegewebskapsel umgeben, von der sich radiär verzweigende Trabekel ins Innere ziehen (Abb. 1A). Unterhalb der Bindegewebskapsel ist der Randsinus lokalisiert, in den mehrere afferente Lymphgefäße münden und der die Lymphe in den Intermediärsinus weitertransportiert. In der Medulla des LN erweitern sich diese zu dem Marksinus. Aus dem Hilus wird ein Teil der gesammelten Lymphe nun durch ein oder zwei abführende Lymphgefäße (*Vasa efferentia*) ausgeschleust, der andere Teil gelangt in das *Conduit* System und tritt dann ins Blutgefäßsystem über <sup>8,9</sup>. LN weisen eine geordnete Kompartimentierung von T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen auf, wodurch alle LN einen sehr ähnlichen morphologischen Aufbau zeigen. Sie bestehen im Wesentlichen aus 3 Komponenten: dem T-Zellbereich, auch Paracortex genannt, dem B-Zellareal (Cortex) und der Medulla (Abb. 1A).

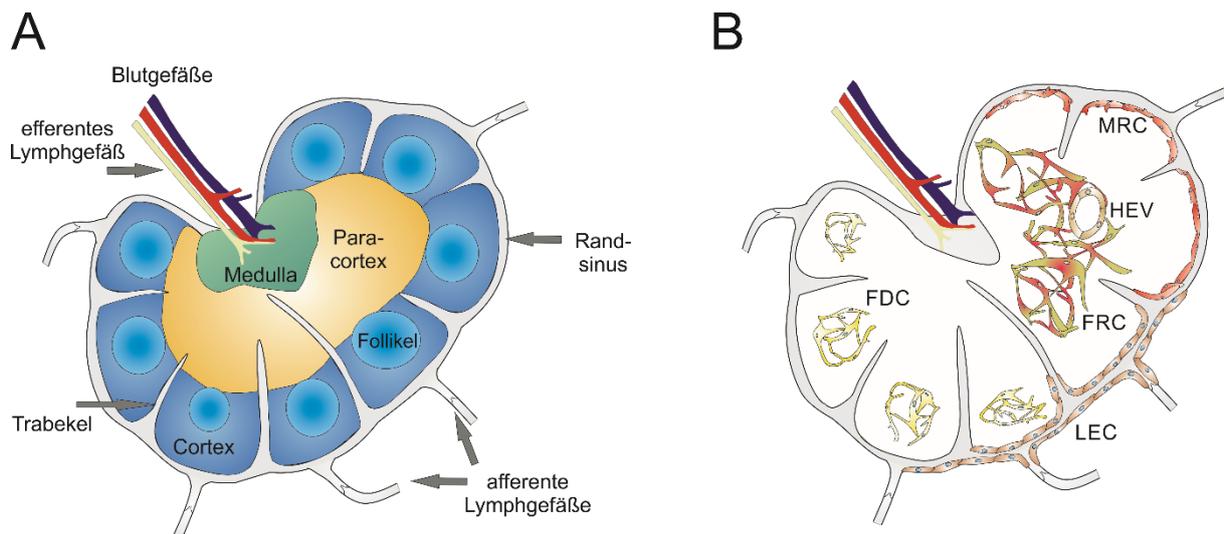


Abb. 1 Schematische Darstellung der Kompartimente und deren Hauptstromazellpopulationen des Lymphknotens.

(A) Lymphknoten bestehen aus den drei großen Kompartimenten Cortex, Paracortex und Medulla. (B) Immunzellen gelangen über die afferenten Lymphgefäße oder die Blutgefäße in den Lymphknoten und verlassen diese durch efferente Lymphgefäße oder Blutgefäße. Die Sinus des LN werden von Lymphendothelzellen (LEC) ausgekleidet. Diese stehen im direkten Kontakt zu den marginalen Retikulumzellen (MRC). Der Cortex wird von follikulär dendritischen Zellen (FDC) und der Paracortex von fibroblastischen retikulären Zellen (FRC) aufgebaut. Hochendotheliale Venulen (HEV) werden hingegen durch spezialisierte Blutendothelzellen gebildet. Modifiziert nach <sup>10</sup>.

Eine dreidimensionale Architektur aus Stromazellen bildet das Rückgrat des LN. Stromazellen sind nicht wandernde, nicht hämatopoetische Zellen, die sich in den einzelnen Kompartimenten des LN unterscheiden (Abb. 1B). Es wurden 4 Hauptpopulationen anhand der Expression der Oberflächenproteine PECAM1 (CD31) und Podoplanin (gp38) identifiziert. Zu diesen Hauptpopulationen gehören Blutendothelzellen (BEC, CD31+ gp38-) und Lymphendothelzellen (LEC, CD31+ gp38+) sowie Retikulumzellen (CD31- gp38+) und doppelt negative Zellen (CD31- gp38-) <sup>11</sup>. Retikulumzellen können in Zellen des Cortex (follikulär dendritische Zellen; FDC, CD21/35+), des Sinus (marginale Retikulumzellen; MRC, RANKL+) oder des Paracortex (fibroblastische retikuläre Zellen; FRC, Expression von extrazellulären Matrixbestandteilen) unterteilt werden <sup>8</sup>. Diese Zellen geben die Grundstruktur und somit die Kompartimentierung des LN durch die Produktion von Chemokinen vor, wodurch T-Zellen vornehmlich im Paracortex und B-Zellen im Cortex vorzufinden sind. Der Cortex lässt sich wiederum in Primär- und Sekundärfollikel unterteilen <sup>12</sup>. Primäre lymphoide Follikel bestehen aus rezirkulierenden naiven B-Zellen, die sich nach Antigenerkennung vermehren und differenzieren. Dadurch entwickelt sich ein

---

Keimzentrum, und die Primärfollikel verwandeln sich in sekundäre Lymphfollikel, die zur weiteren Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen dienen <sup>12</sup>.

Immunzellen gelangen über hochendotheliale Venulen (HEV) aus dem Blutgefäßsystem in den Paracortex des LN <sup>13</sup>. Die HEV sind über das *Conduit* System direkt mit dem Lymphgefäßsystem verbunden <sup>14</sup>. Dieses ist ein dichtes röhrenförmiges Netzwerk, welches aus extrazellulären Matrixkomponenten wie Laminin und Fibronectin besteht und von FRC gebildet wird.

## 6.2 Die Funktion des Lymphknotens und seiner Stromazellen

LN haben neben der Aufrechterhaltung eines Immunzell-Gleichgewichts (Homöostase) auch die Funktion, Lymphflüssigkeit nach Antigenen zu filtern und entweder eine adaptive Immunantwort zu induzieren bzw. zu regulieren oder aber Toleranz gegenüber dem Antigen auszulösen. Bei diesen Prozessen spielen vor allem die Stromazellen des LN eine entscheidende Rolle.

### 6.2.1 Einfluss der Stromazellen bei der Homöostase

Allen Stromazellen des LN ist gemein, dass sie das Überleben, die Migration und die Lokalisation von Immunzellen gewährleisten (Abb. 2). Je nach Lokalisation der Stromazellen innerhalb des LN weisen diese unterschiedliche Funktionen auf. LEC, die den subkapsulären Randsinus des LN auskleiden, sind die Zellen, die als erste mit der ankommenden Lymphflüssigkeit und den darin enthaltenden Zellen in Kontakt treten <sup>15</sup>. Über die Expression des atypischen Chemokin-Rezeptors ACKR4 wird durch LEC der Chemokin-Gradient für CCL19 und CCL21 aufrecht erhalten, der die Migration von CCR7+ DC oder T-Zellen aus der Lymphe in den LN ermöglicht <sup>16</sup>. Sie exprimieren zusammen mit FRCs aber auch weitere Zytokine wie z. B. IL7, welches ein Überlebenssignal für naive Lymphozyten darstellt <sup>17, 18</sup>. Des Weiteren bilden FRC ein dichtes 3-dimensionales kollagenreiches Netzwerk, das den Paracortex definiert. Sie schaffen Räume, in denen Immunzellen miteinander in Kontakt kommen können. Dazu exprimieren sie CCL19 und CCL21, wodurch CCR7+ naive T-Zellen und DC in diesen Bereich des LN migrieren <sup>18</sup>. Aber auch B-Zellen werden von FRC durch die Produktion des B-Zell-Aktivierungsfaktors (BAFF) in ihrer Reifung, dem Überleben und der Proliferation unterstützt <sup>19</sup>. In Studien, in denen eine Entfernung von FRC durch

die Gabe von Diphtheria-Toxin ausgelöst wurde, führte dies zu verkleinerten LN mit zerstörter Architektur und dem Verlust von Lymphozyten und DCs <sup>20</sup>. FRC übernehmen somit eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der Architektur und der Zellzusammensetzung des LN.

Das FRC-Netzwerk ermöglicht über die Expression von extrazellulärer Matrix den Aufbau eines *Conduit*-Systems, das beginnend am subkapsulären Sinus in den HEV endet. Durch dieses System können Partikel, die kleiner als 70 kDa sind, einschließlich Zytokine oder Antigene <sup>21, 22</sup>, aber auch Immunglobuline wie IgM (150kDa) <sup>23</sup>, in das Lumen der HEV transportiert werden, welche von BEC ausgekleidet werden. BEC rekrutieren T-Zellen aus dem Blut und helfen diesen dabei, ins Parenchym der LN zu migrieren <sup>24</sup>.

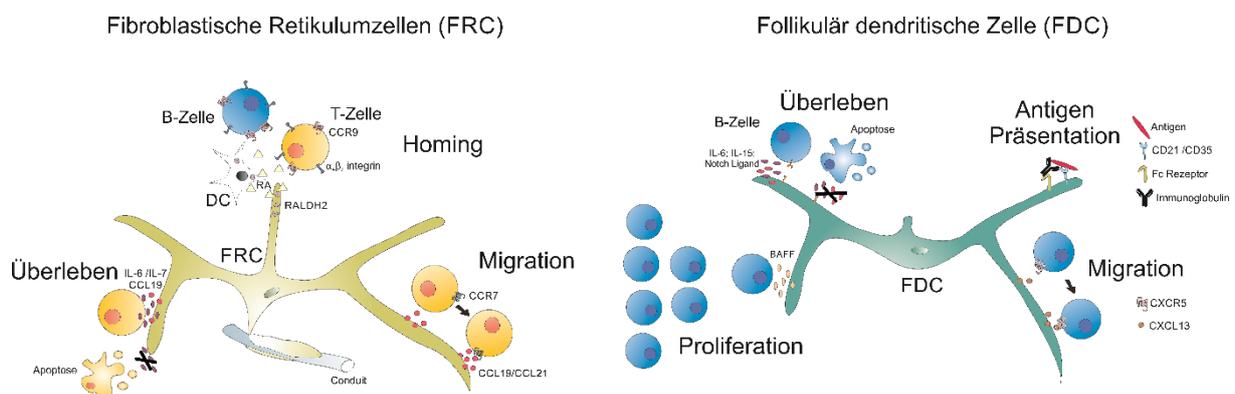


Abb. 2 Aufgaben der Fibroblastischen Retikulumzellen (FRC) und der Follikulär dendritischen Zellen (FDC).

Modifiziert nach <sup>10</sup>. FRC sind im Paracortex des Lymphknotens lokalisiert, wo sie durch ein dichtes Netzwerk das Conduit System aufbauen. FRC treten mit verschiedensten Immunzellen in Kontakt. Zum einen wandern T-Zellen an den FRC innerhalb eines Chemokingradienten entlang, um auf der Suche nach passenden Antigenen, in Kontakt mit anderen Zellen (DC) zu kommen. Werden diese durch die Präsentation eines Antigens aktiviert, werden Moleküle induziert, die die Immunzellen veranlassen in das drainierende Gebiet des Lymphknotens zu migrieren (homing). Zum anderen werden Überlebenssignale wie IL7 von FRC produziert. Auch FDC produzieren Überlebenssignale wobei diese im Cortex nachzuweisen sind. Durch die Antigenpräsentation werden B-Zellen aktiviert und zur Proliferation und späteren Migration in das drainierende Gebiet angeregt.

FDC bilden als dreidimensionales schwammartiges Netzwerk die Grundlage der primären und sekundären Lymphfollikel, die wiederum den Cortex bilden <sup>12</sup>. In primären Lymphfollikeln sind FDC zentral lokalisiert und umgeben von naiven B-Zellen, die auf der Suche nach Antigenen an den FDC durch den Follikel migrieren. FDC sind hauptsächlich an der Organisation der Follikel durch die Expression von

---

CXCL13 beteiligt <sup>25</sup>. Weiterhin sind sie die Hauptquelle für BAFF, welches wiederum für die Aufrechterhaltung der B-Zell-Homöostase verantwortlich ist <sup>26</sup>. FDC sind in der Lage, Antigene einzufangen, zurückzuhalten und/oder zu präsentieren. Auch Antigen-Antikörper-Komplexe können von ihnen präsentiert werden, die daraufhin von Fc-Rezeptoren erkannt werden können <sup>27, 28</sup>. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Koordination der B-Zellantworten.

Im Bereich der Medulla befinden sich verschiedene Immunzellen wie natürliche Killerzellen, Makrophagen und Plasmazellen <sup>29, 30</sup>. Bisher wurden die Stromazellen dieses Kompartiments schlecht charakterisiert. Erst kürzlich konnten medulläre FRC genauer beschrieben werden <sup>30</sup>. Diese analysierten Zellen scheinen in engem Kontakt mit Plasmazellen zu stehen und sind durch die Produktion von Überlebensfaktoren für Plasmazellen von entscheidender Bedeutung. Hier finden sich auch kleinere Blut- und Lymphgefäße, über die die Lymphozyten den LN verlassen <sup>31</sup>.

#### 6.2.2 Einfluss von Stromazellen während einer Immunantwort

Im Falle einer Infektion im drainierenden Gebiet des LN verändert sich dieser, damit eine schnelle und effektive, aber auch kontrollierte Immunantwort ausgelöst werden kann (Abb. 3). Ein erhöhter Einstrom von Lymphflüssigkeit bringt mehr CCR7+ DC, aber auch B- und T-Zellen in den LN <sup>32</sup>. Um diesen Zellen ausreichend Platz zu bieten, schwillt der LN an. Das Anschwellen des LN wird durch eine Zell-Zell-Interaktion von DC / B-Zellen und FRC ausgelöst, wodurch die Kontraktilität der FRC unterbunden wird und sich FRC strecken und ausbreiten <sup>19, 33, 34</sup>. Das bestehende FRC-Netzwerk wird lockerer, was zu einer Proliferation der FRC führt <sup>35</sup>.

Neben antigenpräsentierenden DC, Effektor T- und B-Zellen befinden sich auch naive T-Zellen und freie Antigene in der ankommenden Lymphe (Abb. 3 afferente Lymphgefäße). Die ankommende Lymphe wird im LN auf potentiell gefährliche Antigene gefiltert. Dieser Prozess startet im subkapsulären Randsinus, aus dem Makrophagen Antigene wie z. B. Viren aufnehmen und andere Immunzellen, vor allem B-Zellen, aus dem Lymphknotengewebe rekrutieren <sup>36, 37</sup>. LEC leiten antigentragende DC aus den Lymphgefäßen in die inneren Bereiche des LN weiter <sup>38</sup>. Dies geschieht über die Expression von CCL19/CCL21 von LEC und FRC, wodurch CCR7 positive Immunzellen in den LN und weiter ins Parenchym migrieren <sup>39</sup>. DC haben zudem

---

Zugriff auf die Partikel im *Conduit*, nehmen diese auf und präsentieren die Antigene den benachbarten T-Zellen<sup>14</sup>. T-Zellen treffen im Parakortex auf antigenpräsentierende DC, wodurch es zur Aktivierung, Induktion von Zellteilung und zur Differenzierung oder Gedächtnisbildung der T-Zellen kommt (Abb. 3 Paracortex). FRC unterstützen somit den Lymphozyten-Transport, die Migration der DC und die Organisation der verschiedenen funktionellen Bereiche<sup>40</sup>.

Nach der Aktivierung wandern T-Helferzellen unter der Hochregulation von CXCR5 in den Grenzbereich zwischen Cortex und Paracortex<sup>41</sup>. Dort treten sie in Kontakt mit B-Zellen, wodurch diese wiederum aktiviert werden und proliferieren<sup>41</sup>. Die B-Zellen migrieren aus dem Grenzbereich in den Follikel, wo sie einen Affinitätsreifungsprozess und einen Klassenwechsel durchlaufen<sup>42</sup>. Anschließend proliferieren sie in sekundären Lymphfollikeln, entwickeln dabei über somatische Hypermutation einen hochaffinen Rezeptor für das Antigen und verlassen den LN als Plasmazellen (Abb. 3 Cortex).

Aktivierte T- und B-Zellen als auch Plasmazellen verlassen den Lymphknoten über die efferenten Lymphgefäße und gelangen über den *Ductus thoracicus* ins Blutgefäßsystem des Körpers (Abb. 3 Medulla)<sup>43</sup>. Aus dem Blutgefäßsystem migrieren sie durch die Expression von „homing“ Molekülen in das jeweilige drainierende Gebiet des Lymphknotens, ins Gewebe aus.

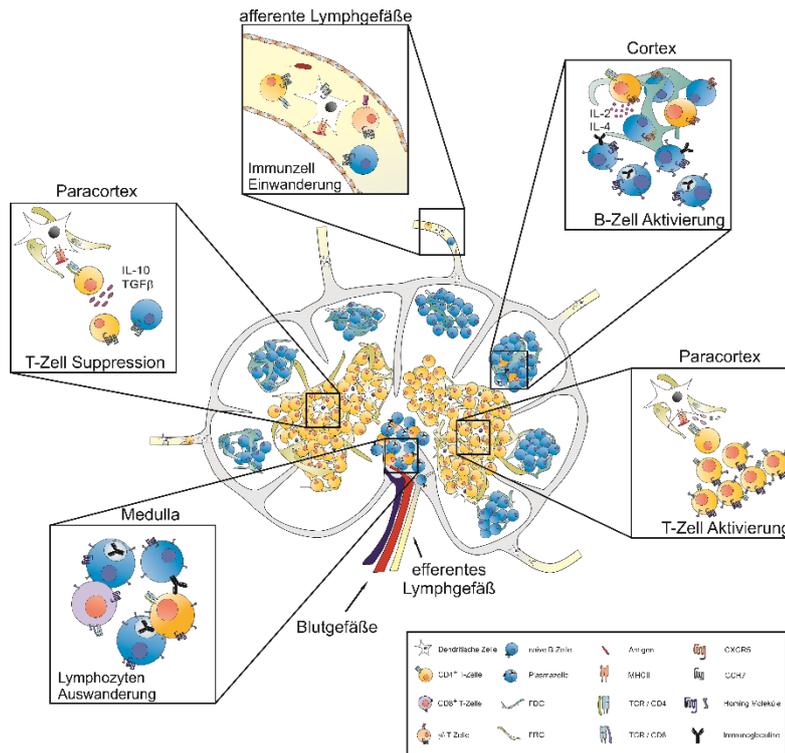


Abb. 3 Schematische Darstellung der Funktionen des Lymphknotens. Modifiziert nach <sup>44</sup>. Immunzellen wandern über die afferenten Lymphgefäße in den Lymphknoten ein. In den verschiedenen Kompartimenten werden T- oder B-Zellen im Falle einer Immunreaktion aktiviert oder aber supprimiert, wenn es sich um ein harmloses Antigen handelt. Immunzellen verlassen über die Medulla den Lymphknoten.

### 6.3 Unterschiede zwischen darmdrainierenden Mesenteriallymphknoten und Haut-drainierenden peripheren Lymphknoten

LN sind über das Lymphgefäßsystem mit einem Organsystem bzw. einem definierten anatomischen Organanteil verbunden (regionaler LN). Von dort gelangen z. B. aufgenommene Antigene aus dem Gewebe in die LN. Periphere LN (pLN; beinhaltet: axilläre, inguinale, popliteale LN) drainieren große Gebiete der Haut <sup>45</sup>, wohingegen die Mesenteriallymphknoten (mLN) das Gebiet des Magen-Darm-Traktes drainieren <sup>46</sup>. Jedes Gebiet führt zu unterschiedlichen phänotypischen Merkmalen der LN. Diese Unterschiede entstehen bereits während der Organogenese, da unterschiedliche „Lymphoid tissue organizer cells“ (LTo) in den jeweiligen LN vorkommen, wodurch ein unterschiedliches Mikromilieu im LN aufgebaut wird <sup>47</sup>.

Lymphknoten aus unterschiedlichen drainierenden Bereichen (pLN und mLN) induzieren unterschiedliche Immunantworten <sup>48-50</sup>. Sowohl im mLN als auch im pLN

---

existiert zum einen eine sehr ähnliche DC-Population, zum anderen konnten aber auch zusätzlich regionsspezifische DC mit einer durch den drainierenden Bereich geprägten organ-typischen Marker-Expression wie z. B. CD103 gefunden werden<sup>51</sup>. Die Kokultur von T-Zellen mit DC aus mLN oder pLN führte zu einer deutlichen Verschiebung der CD4- und CD8-Expression von T-Zellen und ihres Phänotyps<sup>51</sup>. Darüber hinaus unterschieden sich DC in ihrer Fähigkeit, T-Zellen in verschiedene Richtungen zu differenzieren<sup>52</sup>. Effektor T-Zellen aus dem mLN produzierten Th2 vermittelnde Zytokine, wie z.B. IL-4 oder IL-10, während Effektor T-Zellen aus dem pLN, Th1 vermittelnde Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2) sezernieren<sup>53, 54</sup>. Im mLN konnten weiterhin vermehrt IgA-produzierende Plasmazellen<sup>55</sup> nachgewiesen werden, wohingegen im pLN IgG-produzierende Zellen vorherrschen<sup>48</sup>.

Vitamin A und seine Metabolite sind eng mit der Generierung von Darm-spezifischen T- und B-Zellen verknüpft<sup>56, 57</sup>. Das Enzym Retinaldehyd-Dehydrogenase 2 (RALDH2), welches bei der Umwandlung von Vitamin A zu Retinsäure eine wesentliche Rolle spielt, konnte in FRC und DC der mLN nachgewiesen werden, fehlt jedoch in FRC und DC der pLN<sup>58, 59</sup>. Retinsäure wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von CCR9 und  $\alpha_4\beta_7$  Integrin<sup>57</sup>. Sowohl T- als auch B-Zellen regulieren im mLN den Chemokinrezeptor CCR9 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin nach deren Aktivierung herauf<sup>59, 60</sup>. Dies ermöglicht diesen Zellen bevorzugt den Eintritt in die intestinale Mukosa über CCL25 oder über das Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1)<sup>61, 62</sup>.

Auch auf Stromazellebene wurden bisher verschiedene Expressionsunterschiede abhängig vom drainierenden Gebiet beschrieben. So wird auf den HEV des mLN das Adhäsionsmolekül MAdCAM-1 exprimiert, nicht jedoch auf den HEV von pLN<sup>11, 63</sup>. Dies führt dazu, dass in den mLN  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-tragende Lymphozyten bevorzugt eintreten können. FRC des mLN produzieren RALDH2, während aus pLN isolierte FRC in höheren Konzentrationen BAFF produzieren<sup>11, 59</sup>. Wir konnten zeigen, dass die Expression von RALDH2 stromazellabhängig ist und nicht durch das drainierende Gebiet beeinflusst wird<sup>58</sup>.

Eine besondere Eigenschaft der mLN ist die Fähigkeit, eine orale Toleranz gegenüber aufgenommenen Antigenen wie Nahrungsmittelantigenen zu induzieren<sup>64</sup>. Dazu migrieren CD103+ DC aus dem Darm über die Lymphgefäße in den mLN, wo sie durch die Ausschüttung von Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) und Retinsäure

---

regulatorische T-Zellen induzieren<sup>64</sup>. Diese unterbinden so eine Immunreaktion im Darm und Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen wird hergestellt. Wird der mLN hingegen entfernt, kann keine orale Toleranzinduktion stattfinden<sup>64</sup>.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl die Zellzusammensetzung als auch das Vorhandensein von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren die einzigartige Mikroumgebung eines jeden LN bilden.

#### 6.4 Das Transplantationsmodell

Um die Funktion von LN genauer zu untersuchen, konnten wir ein Transplantationsmodell in Nagern etablieren<sup>58, 59</sup>. In diesem Modell werden LN vorsichtig entfernt, wobei nahegelegene größere Blutgefäße nicht verletzt werden dürfen<sup>65</sup>. Bei der Entfernung der LN ist es jedoch unvermeidlich, dass sowohl die afferenten als auch die efferenten Lymphgefäße zerstört werden. In das ehemalige Lymphknotenbett werden dann LN eines anderen drainierenden Gebiets (z. B. pLN, mLN oder popliteale LN) eingesetzt (Abb. 4). In unseren Studien waren bereits zwei Wochen nach Transplantation sowohl Blut- als auch Lymphgefäße mit dem Transplantat verbunden und nach acht Wochen konnten vollkommen regenerierte Lymphknoten transplantate nachgewiesen werden, die aus Spenderstromazellen und Empfängerimmunzellen bestanden<sup>58</sup>. Andere Arbeitsgruppen nutzten ebenfalls diese Technik zur Analyse von Funktion und Regeneration von LN und zeigten ebenfalls einen schnellen Wiederanschluss der HEV<sup>66, 67</sup> oder der Lymphgefäße<sup>68, 69</sup> an das Transplantat. Mit dieser Technik konnte so der Einfluss des drainierenden Gebiets auf Immunantwort und Toleranzinduktion untersucht werden<sup>70</sup>.

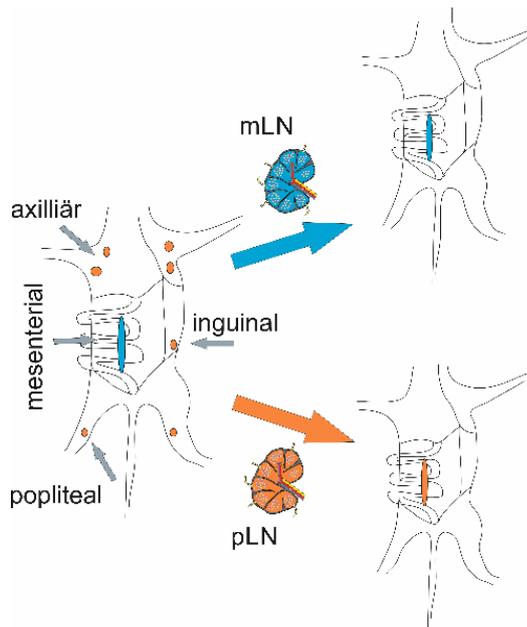


Abb. 4 Darstellung der Lymphknotentransplantation.

Periphere Lymphknoten (pLN: axillär, inguinal, popliteal) werden in das drainierende Gebiet des Mesenteriallymphknotens platziert.

Mit diesem Modell konnten wir zeigen, dass in Tieren mit einem pLN im drainierenden Gebiet des mLN eine verringerte spezifische Immunantwort gegen ein Antigen ausgelöst wird<sup>58</sup>. Dies ließ sich auf eine verringerte Expression des Gens *Aldh2a1* (Retinaldehyd-Dehydrogenase 2; RALDH2) und davon abhängig die Expression von Markern, welche spezifisch für die Rekrutierung in das drainierende Gebiet auf Effektorzellen sind, zurückführen<sup>59</sup>. Ebenfalls war die Differenzierung von B-Zellen zu antigenspezifischen IgA-positiven Plasmazellen verringert. Diese Ergebnisse konnten durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden<sup>59, 71</sup>.

Wir zeigten zudem, dass die Induktion von oraler Toleranz in LN verschiedener drainierender Bereiche unterschiedlich ausgelöst wird<sup>72</sup>. In Tieren mit einem ins Mesenterium transplantierten pLN wurde Toleranz unter Aktivierung von antigenspezifischen IgG-produzierenden B-Zellen ausgelöst, wohingegen es im mLN zur Bildung von regulatorischen T-Zellen kommt<sup>72</sup>. Wolvers et al. konnte zeigen, dass orale Toleranz im drainierenden Bereich der Nase von Mäusen nach Transplantation eines pLN nicht induzierbar war<sup>73</sup>.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht das drainierende Gebiet und hier insbesondere die migrierenden Immunzellen für die spezifische Funktion des LN ausschlaggebend ist, sondern dass die überlebenden Spenderstromazellen innerhalb des LN für eine individuelle Mikroumgebung verantwortlich sind.

---

## 7. Ziel der Habilitation

Zu Beginn meiner wissenschaftlichen Untersuchungen an Stromazellen des LN war bereits bekannt, dass sich LN unterschiedlich drainierender Bereiche voneinander unterscheiden. Während meiner Promotion konnte ich durch die Verwendung des beschriebenen Transplantationsmodells feststellen, dass Stromazellen eine wichtige Funktion innerhalb der LN wahrnehmen. Stromazellen waren zu diesem Zeitpunkt lediglich als grundgerüstbildende Zellen bekannt, jedoch wurde ihnen keine immunologische Rolle zugeschrieben.

Ein Ziel meiner Arbeiten nach Abschluss der Promotion war es deshalb aufzuklären, inwiefern Stromazellen die Funktionen des LN beeinflussen. Hier habe ich zum einen die Rolle von Stromazellen im Hinblick auf deren regenerative Eigenschaften von LN und zum anderen deren immunologische Funktion innerhalb des LN mit Auswirkung auf das umliegende drainierende Gebiet untersucht. Zusätzlich konnte ich durch Genanalysen weitere mögliche Aufgaben von Stromazellen innerhalb des Lipidstoffwechsels aufzeigen. Diese drei Themengebiete werden in den folgenden Kapiteln behandelt. In jedem Kapitel werden kurz der Hintergrund, die wesentlichen Ergebnisse und die wichtigsten Schlussfolgerungen der betrachteten Veröffentlichungen im temporären Wissenskonzext zum Zeitpunkt der Veröffentlichung zusammengefasst. Des Weiteren wird am Ende jedes Kapitels ein Ausblick für weitere Forschungsvorhaben gegeben.

---

## 8. Stromazellen des Lymphknotens unterscheiden sich in den drainierenden Gebieten

Wie bereits beschrieben, sind LN lokale Abwehrzentren des Körpers und gewährleisten die effiziente Steuerung und Organisation der Immunreaktion. Um sich auf die verschiedenen Organregionen und die daraus folgenden Anforderungen der Immunabwehr einzustellen, sind Unterschiede in der Zellzusammensetzung zwischen LN in unterschiedlichen Körperregionen erforderlich. Dass sich LN verschiedener drainierender Gebiete unterscheiden, ist schon seit längerer Zeit bekannt <sup>74, 75</sup>. Herauszufinden, welchen Einfluss diese Unterschiede auf die Funktion der LN haben, ist Teil der vorliegenden Arbeit.

Bisher ist nicht bekannt, ob und wenn ja welche weiteren immunologischen aber auch metabolischen Gen-Expressionsunterschiede Stromazellen des mLN im Gegensatz zu Stromazellen des pLN aufzeigen.

Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde zunächst ein Protokoll zur Isolierung von Stromazellen (LECs, BECs und Retikulumzellen) aus LN etabliert. Da Stromazellen nicht zu den hämatopoetischen Zellen gehören, können sie über eine negative Selektion anhand des Oberflächenmarkers CD45 isoliert werden. Sowohl über die Verwendung von magnetischer Zellseparation als auch über das durchflusszytometrische Sortieren lassen sich hohe Reinheiten von 97 +/- 2 % der CD45 negativen Zellen erreichen. Mit diesen isolierten Stromazellen des pLN und mLN haben wir mittels Gen-Array-Analyse die Genexpression untersucht (Publikation 1). Dabei konnten wir eine Mehrheit an Genen identifizieren, die eine ähnliche Expression in den verschiedenen drainierenden Gebieten aufzeigen wie z. B. *Ccl19* oder *Cxcl13*. Diese Chemokine sind sowohl essentiell für die Migration von Lymphozyten und DC aus dem Gewebe in den LN als auch innerhalb des LN zu den entsprechenden Kompartimenten, dem Paracortex und dem Cortex. Wir konnten aber auch Gene identifizieren, deren Expression in den LN stark unterschiedlich ist und die somit spezifisch für das drainierende Gebiet des LN sind. So konnten 316 Transkripte im mLN im Vergleich zum pLN vermehrt nachgewiesen werden, wohingegen im pLN 118 Transkripte identifiziert werden konnten, die vermehrt exprimiert sind. Zunächst haben wir uns auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen konzentriert. Die naiven Stromazellen zeigten bei 5 Genen dieser funktionellen Gruppe Unterschiede. Für die Gene *Ccl8*, *Ccl20* und *Cxcl15* konnten erhöhte Transkriptmengen in Stromazellen des

---

pLN nachgewiesen werden, wohingegen *Cxcl4* und *I18* im mLN vermehrt detektiert werden konnten. Weiterhin konnten wir für *I16*, *I18* und *Cxcl2* Unterschiede in der Genexpression verifizieren und ebenfalls auf Proteinebene nachweisen. Bestimmte Zytokine werden somit abhängig vom drainierenden Gebiet im LN exprimiert. Welche immunologischen Auswirkungen diese Expressionsunterschiede haben, ist bisher noch nicht bekannt.

Neben immunologischen Mechanismen können auch Unterschiede innerhalb verschiedener Stoffwechselprozesse die Funktion des LN beeinflussen. So werden für den Fettstoffwechsel Lipide aus der Nahrung durch Enterozyten aus dem Dünndarm aufgenommen, in Chylomikronen, bis zu 1 µm kleine Lipoproteinpartikel, umgewandelt und über die Lymphgefäße ins Blut und somit in die Leber transportiert. Dabei gelangen diese verpackten Lipide über die afferenten Lymphgefäße in den Darm-drainierenden mLN, wohingegen die pLN keinen direkten Kontakt aufweisen. Gene des Lipidmetabolismus wie z. B. *C1ps* (Colipase) oder *Cpa1* (Carboxypeptidase A1) konnten hochexprimiert in Stromazellen des mLN im Gen-Array detektiert werden, jedoch nicht im pLN (Publikation 2). Um dies genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Subpopulationen von Stromazellen der mLN isoliert und ebenfalls auf Gene des Lipidmetabolismus analysiert. Drei der Stromazell-Hauptpopulationen lassen sich über den Endothelzellmarker CD31 und das Glykoprotein Podoplanin (auch bekannt als gp38) isolieren. Nach einer ersten Isolation der gesamten CD45 negativen Stromazellen aus dem LN wurden die verschiedenen Subpopulationen über die durchflusszytometrische Zellsortierung anhand von CD31 und gp38 isoliert (FRC: gp38+CD31-; LEC: gp38+-CD31+; BEC: gp38-CD31+). Die Subpopulationen der Stromazellen wiesen generell starke Unterschiede durch eine hohe Anzahl an verschiedenen Gen-Transkripten untereinander auf. Fokussiert auf die Gene des Lipidmetabolismus konnten auch hier Unterschiede zwischen den Zellpopulationen nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, dass FRC und LEC mehr Gene des Lipidmetabolismus exprimieren als BEC. Das deutet darauf hin, dass Stromazellen, die direkten Kontakt mit der mit Chylomikronen angereicherten Lymphflüssigkeit haben, durch die Expression von verschiedenen Enzymen am Lipidmetabolismus beteiligt sind.

---

In Publikation 3 konnte durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung von Stromazellen des mLN und pLN gezeigt werden, dass in beiden LN die gleichen Expressionscluster bestehen. Dies deutet auf eine ähnliche Zusammensetzung der LN mit Stromazellsubpopulationen hin. Bei einer gezielten Stromazellanalyse, bei der zuvor Blut- und Lymphendothelzellen ausgeschlossen wurden, konnten 14 transkriptionelle Cluster nachgewiesen werden, wovon einige bereits bekannt waren und verschiedenen Stromazellpopulationen zugewiesen werden konnten. Um Rückschlüsse innerhalb der Einzelzell-RNA-Sequenzierung zu ziehen, wurden zusätzlich Gene verwendet, deren stabile Expression im mLN mittels Transplantationsexperimenten bekannt war. Es zeigte sich, dass von den 108 hochregulierten Genen ein Großteil von allen CD34+ Stromazellsubpopulationen, den CXCL9+ FRC und den Perizyten exprimiert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei herunterregulierten Genen, die ebenfalls von allen CD34+ Stromazellsubpopulationen, den CXCL9+ FRC und Perizyten exprimiert werden. Spezifische Gene wie *Aldh1a2* und *Aldh1a3*, die eine Rolle während der Retinsäuresynthese spielen, werden spezifisch von zwei der CD34+ Stromazellpopulationen und *Ptgis* (Prostaglandin I2 Synthase) von drei der CD34+ Stromazellpopulationen exprimiert. Die Expression dieser immunmodulatorischen Gene lässt darauf schließen, dass es sich bei den CD34+ Stromazellsubpopulationen um immunologisch relevante Zellen innerhalb des LN handelt. Diese Einzelzell-RNA-Sequenzierung deutet darauf hin, dass sich mit den bisher verwendeten Markern (CD31, gp38) nicht alle Stromazellpopulationen identifizieren lassen. Sowohl die morphologische Lage der einzelnen Stromazellpopulationen im LN als auch deren Funktion sind bisher entweder gar nicht oder nur teilweise untersucht und so werden weitere Analysen benötigt.

### 8.1 Ausblick „Lymphknotenstromazellen-spezifische Unterschiede“

Durch Methoden wie Gen-Array oder Einzelzell-RNA-Sequenzierung können Unterschiede in Stromazellen in folgenden biologischen Gruppen aufgezeigt werden: i) Gene des Lipidmetabolismus, ii) immunologisch relevante Gene wie Zytokinen oder Chemokinen, iii) drainierenden LN aus unterschiedlichen Organregionen. Durch die vorliegenden Arbeiten konnten zu den bereits bekannten LECs, BECs, FDC, FRC und MRC weitere Subpopulationen von Stromazellen identifiziert werden, deren Einfluss auf die immunologische Funktion des jeweiligen LN bisher noch unklar ist. Bekannt ist,

---

dass Stromazellen des LN sowohl bei der Entstehung von peripherer Toleranz als auch bei der Entstehung von inflammatorischen Prozessen eine zentrale Rolle spielen. Ein wichtiger Schritt zur Klärung der Funktion dieser Zellen wird es sein, alle 14 Cluster der Stromazellpopulationen morphologisch und anatomisch im LN zu detektieren und ihre Funktion innerhalb des LN zu identifizieren. Dabei wird sowohl der strukturelle Aufbau des LN als auch die immunregulatorische Aufgabe der Zellen im Fokus stehen.

## 9. Regeneration von Lymphknoten nach Transplantation

LN aus unterschiedlichen drainierenden Gebieten weisen charakteristische Zellpopulationen auf, die in der Gesamtheit eine LN-spezifische Mikroumgebung ergeben. Ein Modell zur Analyse der LN-spezifischen Eigenschaften ist die Transplantation von LN in ein anderes drainierendes Gebiet bzw. eine andere Organregion. Aus eigenen Vorarbeiten und Publikationen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die umgebungsspezifischen Eigenschaften des mLN wie z. B. die Expression von MadCAM1 der HEV oder die Expression von *Aldh1a2* von FRC und DC auch nach der Transplantation des vollständigen oder fragmentierten LN konstant bleiben<sup>58, 59, 66</sup>. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die gerüstbauenden Stromazellen des LN die Transplantation überleben und innerhalb des regenerierten LN am strukturellen Aufbau beteiligt sind<sup>58, 59</sup>.

Welche weiteren Komponenten neben den Stromazellen an der Regeneration der Lymphknotenfragmente Anteil haben und inwiefern sich die Regeneration von LN aus isolierten Stromazellen unterscheidet, konnten wir in den nächsten Publikationen genauer untersuchen.

In Publikation 4 konnten wir zeigen, dass FRC und FDC den größten Anteil an Stromazellen im LN ausmachen. Die FRC wurden durch Antikörper gegen Podoplanin (gp38) und CD31 (gp38+ und CD31-) identifiziert sowie die FDC durch die Färbung gegen anti-CD21/35. Da diese beiden Populationen den Großteil der Stromazellen des LN ausmachen, wurden diese Zellen speziell auf ihre Fähigkeit zur Regeneration untersucht. Dazu wurde der Darm-drainierende LN entfernt und an dessen Stelle ein anderer LN mit Zellen, die das grün fluoreszierende Protein (EGFP, engl.: *enhanced*

---

*green fluorescent protein*) unter dem  $\beta$ -Aktin-Promotor exprimieren, transplantiert. Diese transplantierten LN wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Präsenz von EGFP+ Zellen innerhalb der Stromazellpopulation untersucht. Immunzellen konnten ausschließlich als EGFP- Zellen und somit vom Empfänger eingewanderte Zellen identifiziert werden. Über den gesamten Zeitraum konnten fast ausschließlich EGFP+ FRC im transplantierten LN detektiert werden, wohingegen innerhalb der FDC-Population EGFP+ als auch EGFP- Zellen nachgewiesen werden konnten. Während der Regeneration konnten wir zunächst nur kleine FRC-Cluster identifizieren, die über einen längeren Zeitraum der Regeneration größere Cluster bilden und später vergleichbare Paracortex Bereiche wie im Ausgangslymphknoten entstehen. Im Vergleich dazu waren FDC kurz nach der Transplantation nur schwer immunhistologisch nachweisbar und somit konnte kein umschriebener Kortextbereich nachgewiesen werden. Erst 12 Tage nach Transplantation konnten erste FDC-Cluster detektiert werden, aus denen sich später Keimzentren bildeten. Dieser Wiederaufbau der Lymphknotenstruktur geschah unter anderem durch die Fähigkeit der Stromazellen zur Zellteilung, was durch eine immunhistologische Färbung von Ki67 nachgewiesen werden konnte.

LN aus Mäusen mit einer Deletion in den Genen *Ccl19* und *Ccl21* zeigen eine unorganisierte Kompartimentierung des Paracortex. Diese LN wurden in CCL19/21-exprimierende Tiere transplantiert und die Kompartimentierung untersucht. Es zeigte sich, dass in diesen transplantierten LN eine intermediäre Expression von *Ccl19/21* nachgewiesen werden konnte und ebenfalls eine Kompartimentierung wie sie in Wildtyp LN nachweisbar ist. Die Expression von *Ccl21* wurde auf DC zurückgeführt, die während der Regeneration aus dem Empfängertier in den LN einwanderten. *Ccl19/21* zeigte keinen Einfluss auf den Aufbau des Kortex. Allerdings ist der Aufbau des Kortex in LN, in denen die Interaktion von CXCR5-CXCL13 gestört ist, verändert. Der Einfluss dieser Interaktion wurde untersucht, indem LN aus CXCR5-exprimierenden Tieren (Wildtyp) in CXCR5-defiziente Tiere transplantiert wurden. FDC von Wildtyp LN synthetisieren den Chemokin-Liganden CXCL13, wodurch CXCR5-exprimierende B-Zellen vermehrt in den Cortex einwandern. CXCR5-defiziente B-Zellen sind hingegen nicht in der Lage, auf diese Art und Weise zu reagieren. Transplantierte LN aus WT Tieren zeigten in *Cxcr5*-defizienten Mäusen keine Kompartimentierung des Cortex. B-Zellen und ebenso FDC waren über den gesamten LN verteilt, und Keimzentren waren nicht nachweisbar. Zusammengefasst konnte

---

gezeigt werden, dass FDC und FRC wichtige Zellpopulationen sind, um einen funktionsfähigen und anatomisch kompartimentierten LN aufzubauen.

Ziel der Publikationen 5 und 6 war es, den Einfluss des Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) auf die Regeneration transplantierte LN zu untersuchen und die hierfür notwendige Dosis dieses Faktors zu ermitteln. VEGF-C ist ein Wachstumsfaktor für Lymphendothelzellen während der Lymphangiogenese. Da bei der Transplantation die Lymphgefäße durch die Entfernung des LN verletzt werden, stellte sich die Frage, ob die Gabe von VEGF-C die Wiederherstellung der Verbindung von Lymphgefäßen zum Transplantat beschleunigt und dadurch eine schnellere Regeneration der LN stattfindet. Den Ratten wurden zunächst alle LN des rechten Beines entfernt, und nach einer Woche wurde die Leiste mit 15 Gray bestrahlt. Die Entfernung der LN mit anschließender Bestrahlung wurde durchgeführt, um eine Translation dieses Tiermodells zur humanen Therapie von Krebspatienten und vor allem Patientinnen mit anschließender Strahlentherapie nachzuempfinden. Einen Tag nach der Bestrahlung wurden LN des anderen Beins entnommen und in die bestrahlte Region transplantiert. Einem Teil der Tiere wurde nun mehrmals VEGF-C in die Nähe des Transplantats injiziert und der Anschluss des LN an das Lymphgefäßsystem und die Regeneration des LN wurde untersucht. Histologische Auswertungen der LN von Tieren mit einer wiederholten Gabe von VEGF-C zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Rate an regenerierten LN. Bei diesen Tieren konnte ebenfalls durch die intradermale Injektion von Patent Blau eine Verbindung der Lymphgefäße mit dem LN nachgewiesen werden. Das Fazit der Studie war, dass bei wiederholter Gabe von VEGF-C sowohl die Verbindung von Lymphgefäßen und LN schneller geschieht als auch, dass die Regeneration des LN schneller verläuft.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Publikation 5 konnten wir in der Publikation 6 einen konzentrationsabhängigen Effekt des VEGF-C für den Anschluss der Lymphbahnen an die transplantierte LN, nicht jedoch einen Einfluss der Administrationsregion nachweisen. Dazu wurden auch hier die drainierenden LN des rechten Beines entfernt und als Fragmente anschließend wieder transplantiert. VEGF-C wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (6,67 µg oder 13,34 µg) an den nachfolgenden Tagen entweder in die Bauchdecke oder in das Drainagegebiet des LN

---

den medialen Oberschenkel des transplantierten Beins verabreicht. Eine weitere Versuchsgruppe erhielt 6,67 µg VEGF-C erst 14 Tage nach der Transplantation. Sowohl die Regeneration der LN als auch deren Wiederanschluss an das Lymphgefäßsystem wurde 28 Tage nach Transplantation untersucht. Durch die intradermale Injektion von Patent Blau konnten die Lymphgefäße sichtbar gemacht und ein deutlich positiver Effekt auf die Regeneration der Lymphbahnen nach einer Administration von 13,34 µg VEGF-C in den Oberschenkel der Ratte direkt nach Transplantation aufgezeigt werden. Diese LN wiesen auch in histologischen Färbungen anatomisch kompartimentierte LN auf. Wurde das VEGF-C erst 14 Tage nach Transplantation verabreicht, hatte dies einen geringeren Wiederanschluss der Lymphgefäße an den LN zur Folge. Keinen Einfluss auf die Regeneration hatte hingegen die Administrationsregion. Die direkte Gabe von VEGF-C nach einer LN-Transplantation scheint somit eine schnellere Regeneration der LN zu ermöglichen.

Um der Frage nachzugehen, welche Stromazellen für eine Regeneration des LN verantwortlich sind, wurden in Publikation 1 Stromazellen transplantiert und die Entstehung eines artifiziellen LN näher untersucht. Dazu wurden Stromazellen von LN isoliert, auf einen Kollagenschwamm gegeben und in das Mesenterium oder die Kniekehle von Mäusen transplantiert (Neotx). Zunächst wurden alle Stromazellsubpopulationen gemeinsam transplantiert. Acht Wochen später konnten normal-kompartimentierte und mit dem Lymphgefäßsystem verbundene LN festgestellt werden. Nach Transplantation isolierter Subpopulationen der Stromazellen (BEC, FRC, LEC) konnten wir keine vollständig regenerierten LN nachweisen, jedoch zeigten FRC- und BEC-Stromazellen lymphoide Aggregate oder artifizielle LN-ähnliche Strukturen. Dies lässt darauf schließen, dass während der Regeneration von LN ein Stromazell-Stromazell-Kontakt oder deren Expression spezifischer Botenstoffe einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Entwicklung des LN hat.

Um die Regenerationsvorgänge besser zu verstehen, wurde die Regeneration in den ersten Tagen nach Transplantation aller Stromazellpopulationen genauer untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass transplantierte Stromazellen aller Subpopulationen zu jedem Zeitpunkt nachweisbar waren und sich bereits am zweiten Tag nach Transplantation kleine T- und B-Zell-Cluster bildeten. Wir konnten ebenfalls am 2 Tag nach Transplantation einen kleinen Verbund weiterer Zellen detektieren. Diese waren

---

positiv für den mesenchymalen und Adipozyten Vorläuferzellmarker *delta homolog 1* (DLK1). DLK1<sup>+</sup> Zellen können sich bereits während der Organogenese des Lymphknotens zu Lymphknotenstromazellen differenzieren und sind zum Teil ebenfalls positiv für gp38 oder CD31<sup>76</sup>. Innerhalb der DLK1<sup>+</sup> Zellpopulation konnten wir sowohl transplantierte EGFP<sup>+</sup> als auch eingewanderte EGFP<sup>-</sup> Zellen feststellen. Darüber hinaus konnten wir auch in diesem Kontext zeigen, dass Stromazellen durch Proliferation zur Regeneration des LN beitragen, da auch hier KI67<sup>+</sup> Stromazellen nachweisbar waren. Dies zeigt, dass die Entstehung einer Lymphknotenstruktur zum einen von den jeweiligen Stromazellen innerhalb des LN abhängig ist, aber auch, dass aus dem umliegenden Fettgewebe, stammzellähnliche Zellen (DLK1 positiv) an der LN Entwicklung beteiligt sind.

In einem weiteren Schritt wurden die neugenerierten LN auf ihre Zellzusammensetzung untersucht. Dabei konnten alle hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Unter Verwendung von EGFP<sup>+</sup> Stromazellen konnten wir feststellen, dass nach Regeneration des Neotx ebenfalls Stromazellen des Empfängers (EGFP<sup>-</sup>) im LN vorhanden waren. Inwiefern sich dieses Mosaik von Empfänger- und Spenderzellen auf die regionsspezifischen Eigenschaften der LN auswirkt, sollte nach Regeneration der Neotx untersucht werden. Dazu wurden regenerierte Neotx auf verschiedene Merkmale der mLN untersucht: i) Expression von MAdCAM-1 auf HEV. Dies ermöglicht Immunzellen, die  $\alpha 4\beta 7$  Integrin exprimieren, in den LN zu migrieren. Vorherige Transplantationsversuche mit vollständigen LN zeigten, dass Stromazellen ihre ortsspezifische Expression beibehalten, auch wenn sie sich in einem neuen drainierenden Gebiet regenerieren. ii) Expression von RALDH2/*Aldh1a2* und deren Auswirkung auf die Induktion der Darm-Homing-Moleküle CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  Integrin auf Lymphozyten. Das Enzym RALDH2 wird sowohl von FRC als auch von DC im mLN exprimiert, um Darm-Homing Moleküle auf Lymphozyten oder regulatorischen T-Zellen zu induzieren. iii) Differenzierung von IgA-produzierenden Plasmazellen, die im Darmimmunsystem eine entscheidende Rolle spielen.

Die Ergebnisse zeigten folgendes: i) Alle Neotx aus beiden transplantierten Regionen (Mesenterium und Kniekehle) wiesen EGFP<sup>+</sup> HEV auf. Jedoch war allein auf HEV des mLN MAdCAM-1 nachweisbar. ii) Sowohl in der EGFP<sup>+</sup> als auch der EGFP<sup>-</sup> Stromazellpopulation der regenerierten Neotx im Mesenterium (mLN als auch pLN)

---

konnte eine starke Expression von *Aldh1a2* nachgewiesen werden. Um die Funktionalität dieser Expression genauer zu untersuchen, wurde ein T-Zelltransfermodell genutzt. Dazu wurden T-Zellen mit transgenem T-Zellrezeptor für Ovalbumin (OVA) verwendet und in Neotx-Tiere injiziert. Nach Gabe des spezifischen Antigens OVA untersuchten wir T-Zellen bezüglich ihrer Expression von Darm-Homing-Molekülen. Allein T-Zellen des Neotx im Mesenterium zeigten Expression von CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  Integrin, wohingegen T-Zellen des Neotx der Kniekehle keine Expression zeigten. iii) Ebenfalls die Induktion von antigenspezifischen Plasmazellen, welche typisch für den mLN sind, konnte in Neotx aus pLN Stromazellen im Mesenterium nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Stromazellen nach Regeneration durch ortsspezifische Expressionsmerkmale gekennzeichnet sind, wohingegen die Expression vorheriger Merkmale verloren geht.

### 9.1 Ausblick „Lymphknotenregeneration“

Während der Regeneration von LN Gewebe scheint der Zell-Zell-Kontakt der Stromazellen einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Mikroumgebung des LN zu haben. Erst wenn dieser Stromazell-Stromazell-Kontakt verloren geht, wie es bei der Transplantation von isolierten Stromazellen der Fall ist, kann ein für das drainierende Gebiet wichtiges Mikromilieu im LN aufgebaut werden. Während verschiedener Infektionsgeschehen kommt es zunächst zu einem Verlust und anschließendem Wiederaufbau des Stromazellnetzwerkes<sup>77-79</sup>. Ob dieser Prozess des Wiederaufbaus vergleichbar ist mit der Regeneration des LN nach Neotx-Transplantation ist bisher unklar. Während einer Infektion durch z. B. das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCM Virus) kommt es zu einem ausgeprägten Umbau des LN<sup>79</sup>. Dabei wird zunächst das Stromazellnetzwerk zerstört und später durch „Lymphoid Tissue Inducer“ (LTi) Zellen wiederaufgebaut<sup>79</sup>. Welche Faktoren in diesem Fall dazu führen, dass ein spezifisches Lymphknotenmilieu erneut aufgebaut wird, ist unklar. LTi Zellen spielen in Kombination mit Lymphoid Tissue Organizer Zellen eine wesentliche Rolle während der Organogenese von LN<sup>47</sup>. Diese exprimieren verschiedenste Chemokine wie z. B. CXCR5/CXCL13, die für die Entwicklung eines LN entscheidend sind<sup>80</sup>. Ob es sich bei der viralen Regeneration um die gleichen Faktoren handelt, die dazu führen, dass Stromazellen des pLN im drainierenden Gebiet des Darms einen mLN aufbauen, muss weiter untersucht

---

werden. Dazu sollte ein Augenmerk auf die Interaktion der LT<sub>i</sub> Zellen und der Lymphoid Tissue Organizer Zellen gelegt werden. Weiterhin würde das Wissen über die Regeneration des LN helfen, funktionierende *in vitro* Systeme aufzubauen. Diese sind derzeit nicht vorhanden, da das Zusammenspiel von Stromazellen und Immunzellen noch nicht abschließend geklärt wurde.

---

## 10. Einfluss von Lymph-drainierenden Komponenten auf LN

LN befinden sich im Körper an lymphatischen und vaskulären Verzweigungen, wo sie Antigene filtern und so den Immunzellen einen Raum bieten, diese zu erkennen und immunologische Reaktion auszulösen. Je nach drainierendem Gewebe gibt es unterschiedliche Populationen von antigenpräsentierenden Zellen, die über die Lymphgefäße den LN erreichen und dort ebenfalls an der Entstehung eines einzigartigen Mikromilieus im LN mitwirken <sup>51</sup>. Welchen Einfluss diese über die Lymphbahnen in den LN gelangenden Antigene auf das Mikromilieu haben, war lange Zeit unbekannt. In den folgenden Arbeiten wurde untersucht, welchen Einfluss die Mikrobiota oder Nahrungsbestandteile wie Fette auf die Stromazellen und somit auf die Funktion des LN haben.

Das Kolon ist von  $10^{14}$  Bakterien besiedelt, und mit der Lymphe gelangen neben Antigenen der Nahrung vor allem Antigene der Kommensalen oder Pathogenen in den mLN. Das Immunsystem ist im Normalzustand im Gleichgewicht mit der Mikrobiota, die den Intestinaltrakt besiedelt. Dies wird vor allem über regulatorische Mechanismen wie die Erzeugung von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren, gewährleistet. Foxp3<sup>+</sup> Tregs stellen bei der Herstellung und Aufrechterhaltung von Immuntoleranz gegenüber sich selbst und harmlosen fremden Antigenen eine Schaltstelle dar. Die Mehrheit der Foxp3<sup>+</sup> Tregs wird während der Thymusentwicklung erzeugt und durch spezielle Tregs, die gegen Kommensale und Nahrungsmittelantigene gerichtet sind, ergänzt. Diese Erweiterung des Foxp3<sup>+</sup> Treg-Pools wird durch periphere Umwandlung von herkömmlichen naiven Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Foxp3<sup>+</sup> Tregs erreicht. Tatsächlich ist diese *de novo* Induktion von Foxp3<sup>+</sup> Tregs im intestinalen Immunsystem besonders effizient. Innerhalb einer Studie (Publikation 7) wollten wir nun nachweisen, welchen Einfluss die Stromazellen der mLN auf die Induktion von Tregs haben. Zunächst konnten wir zeigen, dass regulatorische T-Zellen im mLN im Vergleich zum pLN zu einem höheren Prozentsatz induziert werden. Die Mikroumgebung innerhalb des LN hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von Immunzellen. Um nun festzustellen, welche Zellen des LN für diese erhöhte *de novo* Induktion der Tregs verantwortlich sind, wurden Lymphknotentransplantationen durchgeführt. So wurden zum einen die pLN in das drainierende Gebiet des Darmes transplantiert, aber auch

---

mLN in das drainierende Gebiet der Haut. Die Transplantationen zeigten, dass Stromazellen des mLN die Foxp3<sup>+</sup> Treg-Induktion unabhängig von der LN-Lokalisation unterstützen. Diese Aktivität war selbst Wochen nach der Operation des transplantierten LN nachweisbar, was darauf hindeutet, dass Stromazellen stabil mit einzigartigen „ortsspezifischen“ Eigenschaften ausgestattet sind.

Als mögliche Kandidaten für die Induktion von Tregs sind Gene der *Aldh* Familie bekannt. Diese Gen-Familie wird, verglichen mit pLN Zellen, stärker von DC und Stromazellen im mLN exprimiert. Für die Induktion von Tregs ist TGFβ essentiell, da es ein wichtiger Regulator der Signalwege ist, die die Expression und die suppressive Funktion von Foxp3 initiieren und aufrechterhalten <sup>81</sup>. Um nun den Einfluss von Stromazellen auf die Induktion von Tregs zu untersuchen, wurden naive T-Zellen mit Stromazellen des mLN oder pLN unter Zugabe von TGFβ und/oder Retinol kultiviert. mLN Stromazellen führten in diesem *in vitro* Assay zu einer erhöhten Induktion von Tregs, wohingegen die zusätzliche Gabe von TGFβ und/oder Retinol keine Auswirkung hatte. Dies zeigt, dass mLN Stromazellen einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen und somit auf die regulatorische Funktion des LN haben.

Allerdings war die direkte Auswirkung der Stromazellen auf die Treg-Induktion *in vitro* gering, dementsprechend sollte ein indirekter Einfluss von Stromazellen auf die T-Zell-Reaktion durch die Modulation von DC untersucht werden. Dazu stellten wir zunächst durch die Verwendung von CD11cDTR-Mäusen fest, dass DC bei der Treg-Induktion eine entscheidende Rolle spielen. Durch die DC-Depletion war die Induktion von Foxp3<sup>+</sup> Tregs fast vollständig aufgehoben. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass DC für die *in vivo* Treg-Induktion unbedingt erforderlich sind. Welche Faktoren Stromazellen dazu befähigen, bei der Treg-Induktion mitzuwirken, war bisher unklar. Um dies zu ermitteln, haben wir zunächst die Rolle des Vitamin A untersucht, da sowohl DC als auch Stromazellen des mLN das Enzym RALDH2 produzieren. Vitamin A wird zunächst reversibel zu Retinol oxidiert, und anschließend durch drei Aldehyd-Dehydrogenasen *Aldh1a1* (RALDH1), *Aldh1a2* (RALDH2) und *Aldh1a3* (RALDH3) irreversibel zu Retinsäure umgewandelt <sup>82, 83</sup>. Retinsäure wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von CCR9 und α4β7 Integrin aber auch bei der Induktion von Tregs. Nach Transplantation von mLN in das drainierende Gebiet der Haut von Tieren, die eine Vitamin A-freie Diät erhalten hatten,

---

konnten wir keine Unterschiede in der *de novo* Induktion von Tregs im Vergleich zu mLN mit einer Vitamin A-enthaltenden Diät feststellen. Vitamin A scheint somit keinen Einfluss auf die durch Stromazellen induzierte Treg-Induktion zu haben. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Kontakt zu Antigenen der Kommensalen eine Rolle bei der *de novo* Erzeugung von Foxp3<sup>+</sup> Tregs spielt. Dazu wurden mLN von keimfreien Tieren in das drainierende Gebiet der Haut transplantiert. Diese regenerierten LN waren nicht mehr in der Lage, eine vergleichbare Treg-Induktion zu bewirken im Gegensatz zu mLN aus Tieren, besiedelt mit einer endogenen Mikrobiota. Somit konnten wir die Mikrobiota als kritische Komponente für die Prägung von mLN-Stromazellen identifizieren.

In einer weiterführenden Studie (Publikation 3) sollte nun zum einen der Zusammenhang der Mikrobiota auf die Funktion der Stromazellen und hier im speziellen die Induktion von Tregs untersucht und zum anderen der Stromzelleinfluss auf DC genauer analysiert werden. Die Verbindung zwischen Stromazellen und der Mikrobiota konnten wir durch die Transplantation der mLN von Tieren unterschiedlichen Alters (neonatal, 10, 24 und 60 Tage alte Tiere) aufzeigen. Die mLN hatten unterschiedlich lange Kontakt zur Mikrobiota des Spendertieres, wodurch ein Prägeprozess der mLN Stromazellen durch Antigene der Mikrobiota stattgefunden haben könnte. Durch diese Transplantationsexperimente konnten wir zeigen, dass der Prägeprozess zur *de novo* Induktion von Tregs bereits in der Neugeborenenphase stattfindet, zu einer Zeit, in der die Kolonisierung des Darms mit Kommensalen beginnt. Diese Prägung des mLN-Stromazellkompartiments führt später im Leben zu einer Resistenz gegen entzündliche Störungen. Dies konnte über die Infektion mit dem gramnegativen Pathogen *Yersinia pseudotuberculosis*, aber auch durch die Induktion einer intestinalen Entzündung über die Gabe von Dextran Natrium Sulfat (DSS) nachgewiesen werden. Obwohl es zu hochgradigen Veränderungen des Stromazellkompartiments und dessen Aktivierung kommt, bleibt die Fähigkeit der Treg-Induktion weiterhin vorhanden. Stromazellen zeigen nach dem Kontakt zur Mikrobiota einen stabilen tolerogenen Phänotyp, der selbst inflammatorischen Störungen standhält.

Ein weiterer Schwerpunkt der Studie war die Ermittlung einer möglichen Kommunikation der Stromazellen mit DC zur Induktion von Tregs. Wie aus der

---

vorangegangenen Studie zu erkennen war, scheinen Stromazellen über DC die Treg-Induktion zu beeinflussen. Nun sollte geklärt werden, ob Stromazellen sowohl migrierende DC (migDC) als auch residente DC (resDC) verändern können. Dazu wurden mLN in das drainierende Gebiet der Haut transplantiert und sowohl migrierende DC als auch residente DC isoliert. Mittels Transkriptomanalyse durch „low input RNA-Sequencing“ konnten wir zeigen, dass mLN-Stromazellen residente DC auf molekularer Ebene verändern und so ihre immunmodulatorischen Eigenschaften beeinflussen können. Eine gemeinsame Kultur von T-Zellen mit migDC oder resDC isoliert aus nicht transplantierten mLN oder transplantierten mLN zeigte, dass beide DC Populationen direkt aus den nicht transplantierten mLN isoliert, aber auch resDC aus transplantierten mLN in der Lage waren, *de novo* Tregs zu induzieren. Durch eine „Gene Ontology“-Analyse konnte in resDC eine erhöhte Expression von *Bmp2* (knochenmorphogenetisches Protein 2) festgestellt werden. Ob und inwiefern *Bmp2* bei der Treg-Induktion durch resDC eine Rolle spielt, wurde ebenfalls *in vitro* unter Zugabe von BMP2 oder dessen Antagonisten Noggin untersucht. Die Zugabe von Noggin führte bei mLN resDC zu einer verschlechterten Kapazität, Tregs zu induzieren, wohingegen die Zugabe von BMP2 eine erhöhte Treg-Induktion hervorrief. Somit bietet die Kommunikation von mLN-Stromazellen und residenten DC einen robusten Regulationsmechanismus für die Aufrechterhaltung der Darmtoleranz und somit zur Induktion von regulatorischen T-Zellen.

Nicht nur bakterielle Antigene sondern auch Nahrungsbestandteile gelangen über das Lymphgefäßsystem vom Darm in die mLN. Nährstoffe, einschließlich Lipide, werden im Darm von Enterozyten absorbiert und in Chylomikronen umgewandelt. Chylomikronen gelangen in die Lymphgefäße und werden später ins Blut transportiert. Kommt es allerdings zu einer erhöhten und andauernden Fettaufnahme führt dies zu Beeinträchtigungen der Lymphgefäße und zur LN-Atrophie. Die spezifischen Veränderungen der Mikroarchitektur von mLN während einer andauernd hohen Lipidzufuhr waren der Gegenstand von [Publikation 2](#). In dieser Studie wurden Stromazellen des mLN von Mäusen, denen 10 Wochen lang eine fettreiche Diät verabreicht wurde, genauer analysiert. Transmissionselektronenmikroskopie ermöglichte die Identifizierung von Lipidtröpfchen verschiedener Zellen und Kompartimenten des mLN. So konnten wir sowohl im subkapsulären Sinus in Makrophagen als auch in Lymphendothelzellen und marginalen Retikulumzellen

---

vermehrt Lipidtropfen nachweisen. Jedoch zeigten Stromazellen des Kortex wie auch des Parakortex keine erhöhte Zahl an Lipidtropfen oder andere morphologische Veränderungen. Diese konnten wir allerdings in der interfollikularen Region des mLN nachweisen, dort waren vermehrt Lipidtropfen und vergrößerte interzelluläre Abstände nach 10 Wochen fettreicher Nahrung festzustellen. Ebenfalls in der paracorticomedullaren Übergangszone und der Medulla konnten wir FRC als auch sinusoidale Retikulumzellen als Lipidtropfen-tragende Zellen identifizieren. In Lymphozyten, DC oder Blutendothelzellen konnten hingegen keine Lipidtropfen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass Änderungen in der Mikroarchitektur und eine erhöhte Akkumulation von Lipidtröpfchen in Stromazellen und Makrophagen die immunologische Funktion von mLN beeinflussen könnten.

Um dieser Annahme weiter nachzugehen, wurde die immunologische Funktion der mLN nach fettreichen Diät (HFD) genauer untersucht. Mittels Hypersensitivitätsreaktionen in Mäusen wurde untersucht, ob diese Reduktion und die Einlagerung der Lipidtropfen einen Einfluss auf die immunologische Funktion des mLN bezüglich der oralen Toleranzinduktion hat (Publikation 8). Diese allergische Reaktion des verzögerten Typs (Typ IV-Allergie) wird durch sensibilisierte T-Zellen vermittelt, welche proinflammatorische Zytokine ausschütten und so über eine Makrophagenaktivierung eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Die Symptome treten verzögert nach Antigen Kontakt erst 24-48 Stunden später auf. In dieser Studie wurde diese allergische Reaktion durch eine subkutane Applikation des Nahrungsmittelantigens OVA in das eine Ohr der Mäuse ausgelöst. Zur Kontrolle und zum Ausschluss möglicher Reaktionen auf die Applikation selbst wurde PBS in das andere Mausohr appliziert. Die daraus resultierenden Ohrschwellungen der Mäuse wurden 48 Stunden nach Applikation bestimmt. Zwischen den OVA-nicht-tolerierenden und den OVA-tolerierenden Mäusen unter fettreduzierter Diät (LFD) konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die Mäuse unter HFD ließen währenddessen nur einen abgeschwächten Unterschied zwischen den behandelten Gruppen erkennen. Dies war sowohl auf eine geringere Immunreaktion der OVA-nicht-tolerierenden Tiere als auch auf eine erhöhte Immunreaktion der OVA-tolerierenden Mäusen zurückzuführen. Außerdem wiesen die OVA-nicht-tolerierenden LFD-Mäuse im Vergleich zu den OVA-nicht-tolerierenden Mäusen unter HFD eine reduzierte Hypersensitivitätsreaktion auf. Ob diese Veränderung der oralen Toleranz reversibel

---

ist, wurde untersucht, indem ein Futterwechsel von einer 10-wöchigen hochkalorischen Ernährung vor der Toleranzinduktion zu einem Standardfutter erfolgte. Unter dem Standardfutter begannen die Gewichtsverläufe der LFD- und HFD-Mäuse zu konvergieren, sodass bereits nach 4 Tagen kein signifikanter Unterschied mehr im Vergleich der Gruppen nachgewiesen werden konnte. Nach einer Toleranzinduktion wiesen beide Standardfuttergruppen einen Unterschied zwischen den OVA-nicht-tolerierenden und den OVA-tolerierenden Mäusen unabhängig davon auf, mit welcher Diät sie zuvor behandelt worden waren. Der Futterwechsel auf das Standardfutter bewirkte somit die Wiederherstellung der normalen Toleranzinduktion bei den HFD-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Veränderungen reversibel sind.

In einem letzten Schritt der Studie wurde untersucht, ob die Veränderung der Mikroumgebung des mLN einen Einfluss auf die Adipositasentwicklung hat, da im mLN Gene des Lipidmetabolismus stark exprimiert werden. Nach Transplantation des pLN oder des mLN in das Mesenterium und einer Regenerationsphase von 8 Wochen wurden auch diese Tiere einer hochkalorischen Diät ausgesetzt. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Zellpopulationszusammensetzung. Nach einer Toleranzinduktion der pLN transplantierten (pLNtx) Tiere konnte bei den pLNtx-HFD-Mäusen ein Unterschied zwischen der nicht-tolerierten und der tolerierten Gruppe in der Hypersensitivitätsreaktion ausgemacht werden, wohingegen bei mLNtx-HFD-Mäusen kein Unterschied zwischen den Tieren nachgewiesen werden konnte. Weiterhin war im Serum der pLNtx HFD Tiere ein erhöhtes antigenspezifisches IgG3 Level nachweisbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mikroumgebung einen Einfluss auf die Entwicklung der oralen Toleranz bei Adipositas hat. Dies deutet auf eine eingeschränkte Funktion der Stromazellen innerhalb des mLN aufgrund einer erhöhten Lipidaufnahme hin.

Neben der Induktion von oraler Toleranz ist eine weitere Funktion der mLN die Regulation von Immunantworten. Diese Regulation kann unter anderem durch die Induktion von Tregs stattfinden ([Publikation 7](#)). Tregs exprimieren das regulatorische Zytokin IL-10, wodurch eine proinflammatorische Immunantwort gehemmt wird. Fehlt IL-10 kann eine Immunreaktion gegen ein darmspezifisches Antigen wie z. B. Lipopolysaccharid nicht unterbunden werden und es folgt eine Darmentzündung. In

---

dieser Studie (Publikation 9) wollten wir den Einfluss von mLN Stromazellen auf die Entstehung von Darmentzündungen untersuchen. Dazu haben wir gesunde Tiere und colitogene Tiere sowohl systemisch als auch regional auf Entzündungszeichen untersucht. Colitogene Tiere zeigten im Serum und im Intestinaltrakt vermehrt Entzündungszeichen. Weiterhin wiesen Stromazellen des mLN einen aktivierteren Zustand auf; dies konnte durch die Expression von z. B. MHCII nachgewiesen werden. Nach der Isolation von Stromazellen aus den Kolon-drainierenden und den Dünndarm-drainierenden mLN von gesunden oder colitogenen Tieren, konnten wir eine erhöhte Expression von verschiedenen Chemokinen (*Ccl2*, *Ccl7* und *Cxcl16*) vor allem bei Stromazellen des Kolon-drainierenden LN von Tieren mit einer Darmentzündung detektieren. Ob diese Zytokine eine Rolle bei der Prägung von T-Zellen spielen, sollte im nächsten Schritt analysiert werden. *In vitro* Stimulationsexperimente mit isolierten T-Zellen zeigten allein bei CCL5 und CCL7 Unterschiede in der Aktivierung. Andere Studien konnten hingegen eine Rolle von CCL2 auf Plasmazellen zeigen.

Aus vorherigen Versuchen wissen wir, dass die Mikroumgebung des LN eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Immunantworten spielt. Dies führt im pLN zu einer veränderten Lymphozytenpopulation, wie z. B. eine geringere Induktion von Tregs oder eine verstärkte Differenzierung von IgG+ Plasmazellen (siehe Publikation 7 + 8) im Vergleich zum mLN. In dieser Studie wollten wir die Frage beantworten, ob Stromazellen des LN an der Entwicklung einer Darmentzündung beteiligt sind. Innerhalb dieser Transplantationsexperimente konnte im Kolon von pLN-transplantierten Tieren eine abgeschwächte Entzündungsreaktion im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. pLNtx Stromazellen zeigten eine verringerte Aktivierung im Vergleich zu Stromazellen des mLNtx während einer Darmentzündung. Diese Untersuchung gibt somit erste Hinweise darauf, dass Stromazellen des mLN und hier insbesondere die des Kolon-drainierenden mLN wesentlich zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beitragen können.

### 10.1 Ausblick „drainierendes Gebiet“

Sowohl wir als auch andere Gruppen konnten durch Einzelzellsequenzierung weitere Untergruppen zu den bereits bekannte LEC, BEC, MRC, FDC und FRC in der Stromazellzusammensetzung nachweisen. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten wir Stromazellpopulationen in unterschiedlichen Bereichen des

---

LN darstellen, allerdings konnten diese Populationen bisher nur schwer oder gar nicht morphologisch-sequenzspezifisch in Verbindung gebracht werden. Auch die Funktion der verschiedenen Populationen ist bisher unklar. Ein Problem im Mausmodell ist, dass die mLN nicht aus einem einzigen LN, sondern aus einer Kette von LN bestehen. Housten et al. und Esterházy et al. konnten zeigen, dass diese Einzel-LN unterschiedliche Bereiche des Darms drainieren und somit die Funktionen der Einzel-mLN unterschiedlich sein können <sup>46, 84</sup>.

In den nächsten Studien wollen wir uns zunächst auf die Funktion der Einzel-mLN konzentrieren und herausfinden, welche Rolle die Kolon-drainierenden mLN auf die Entstehung einer Darmentzündung ausüben. Auch hier wollen wir Einzelzellsequenzierungen vornehmen, um immunologisch wichtige Signalwege der Kolon-drainierenden im Gegensatz zu den Dünndarm-drainierenden mLN aufzuzeigen. So scheinen die Dünndarm-drainierenden mLN eine eher regulatorische Funktion auszuüben, wohingegen der Kolon-drainierende mLN eher inflammatorische Funktionen zeigt.

---

## 11. Schlussfolgerung

Die hier präsentierte Arbeit hatte zum Ziel, aufzuzeigen, welchen Einfluss Stromazellen auf die morphologischen und immunologischen Eigenschaften der LN haben. Stromazellen, die das Grundgerüst der LN aufbauen, konnten dabei ausgehend von den bereits bekannten Populationen in weitere Subpopulationen unterteilt werden. Der regenerative Charakter der Stromazellen wurde in Hinblick auf die vollständige Neubildung eines LN aus Einzelzellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Stromazell-Stromazell-Kontakt von wesentlicher Bedeutung ist, um das Mikromilieu des drainierenden Gebietes aufrecht zu erhalten. Bleibt dieser Zellkontakt erhalten, spielen verschiedenste Chemokine eine entscheidende Rolle im Wiederaufbau der Kompartimente. Stromazellen können weiterhin durch äußere Einflüsse wie z.B. eine fettreiche Ernährung beeinflusst werden, wodurch ihre immunologische Funktion, die Induktion aber auch die Unterdrückung einer Immunreaktion, gestört wird. Dies macht deutlich, wie entscheidend Stromazellen des LN nicht nur für den morphologischen Aufbau, sondern auch für die immunologische Funktion sind.

---

## 12. Literaturverzeichnis

- [1] Chaplin DD: Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125:S3-23.
- [2] Parkin J, Cohen B: An overview of the immune system. *Lancet* 2001, 357:1777-89.
- [3] Thapa P, Farber DL: The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin* 2019, 29:123-31.
- [4] Boehm T, Swann JB: Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2014, 2:259-83.
- [5] Buettner M, Lochner M: Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon. *Front Immunol* 2016, 7:342.
- [6] Ruddle NH: Basics of Inducible Lymphoid Organs. *Curr Top Microbiol Immunol* 2020, 426:1-19.
- [7] Van den Broeck W, Derore A, Simoens P: Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods* 2006, 312:12-9.
- [8] Kelch ID, Bogle G, Sands GB, Phillips ARJ, LeGrice IJ, Dunbar PR: High-resolution 3D imaging and topological mapping of the lymph node conduit system. *PLoS Biol* 2019, 17:e3000486.
- [9] Willard-Mack CL: Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 2006, 34:409-24.
- [10] Buettner M, Pabst R, Bode U: Stromal cell heterogeneity in lymphoid organs. *Trends Immunol* 2010, 31:80-6.
- [11] Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, Armant M, Turley SJ: Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol* 2011, 2:35.
- [12] Allen CD, Cyster JG: Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 2008, 20:14-25.
- [13] He Y: Scanning electron microscope studies of the rat mesenteric lymph node with special reference to high-endothelial venules and hitherto unknown lymphatic labyrinth. *Arch Histol Jpn* 1985, 48:1-15.
- [14] Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L: The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 2005, 22:19-29.
- [15] Xiang M, Grosso RA, Takeda A, Pan J, Bekkhus T, Brulois K, Dermadi D, Nordling S, Vanlandewijck M, Jalkanen S, Ulvmar MH, Butcher EC: A Single-Cell Transcriptional Roadmap of the Mouse and Human Lymph Node Lymphatic Vasculature. *Front Cardiovasc Med* 2020, 7:52.
- [16] Bovay E, Sabine A, Prat-Luri B, Kim S, Son K, Willrodt AH, Olsson C, Halin C, Kiefer F, Betsholtz C, Jeon NL, Luther SA, Petrova TV: Multiple roles of lymphatic vessels in peripheral lymph node development. *J Exp Med* 2018, 215:2760-77.
- [17] Onder L, Narang P, Scandella E, Chai Q, Iolyeva M, Hoorweg K, Halin C, Richie E, Kaye P, Westermann J, Cupedo T, Coles M, Ludewig B: IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood* 2012, 120:4675-83.
- [18] Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA: Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 2007, 8:1255-65.
- [19] Dubey LK, Karempudi P, Luther SA, Ludewig B, Harris NL: Interactions between fibroblastic reticular cells and B cells promote mesenteric lymph node lymphangiogenesis. *Nat Commun* 2017, 8:367.
- [20] Denton AE, Roberts EW, Linterman MA, Fearon DT: Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:12139-44.
- [21] Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, Proudfoot AE, Shaw S: Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J Exp Med* 2000, 192:1425-40.

- 
- [22] Reynoso GV, Weisberg AS, Shannon JP, McManus DT, Shores L, Americo JL, Stan RV, Yewdell JW, Hickman HD: Lymph node conduits transport virions for rapid T cell activation. *Nat Immunol* 2019, 20:602-12.
- [23] Thierry GR, Kuka M, De Giovanni M, Mondor I, Brouilly N, Iannacone M, Bajenoff M: The conduit system exports locally secreted IgM from lymph nodes. *J Exp Med* 2018, 215:2972-83.
- [24] Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, Haraldsen G: The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 2001, 193:1105-12.
- [25] Wang X, Cho B, Suzuki K, Xu Y, Green JA, An J, Cyster JG: Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 2011, 208:2497-510.
- [26] Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A: Isolation and characterization of naive follicular dendritic cells. *Mol Immunol* 2012, 50:172-6.
- [27] McCloskey ML, Curotto de Lafaille MA, Carroll MC, Erlebacher A: Acquisition and presentation of follicular dendritic cell-bound antigen by lymph node-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2011, 208:135-48.
- [28] El Shikh ME, El Sayed RM, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG: Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. *Trends Immunol* 2010, 31:205-11.
- [29] Bajenoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, Braud VM, Germain RN, Glaichenhaus N: Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006, 203:619-31.
- [30] Huang HY, Rivas-Caicedo A, Renevey F, Cannelle H, Peranzoni E, Scarpellino L, Hardie DL, Pommier A, Schaeuble K, Favre S, Vogt TK, Arenzana-Seisdedos F, Schneider P, Buckley CD, Donnadieu E, Luther SA: Identification of a new subset of lymph node stromal cells involved in regulating plasma cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, 115:E6826-E35.
- [31] Girard JP, Moussion C, Forster R: HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2012, 12:762-73.
- [32] MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Uguccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003, 198:615-21.
- [33] Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, Song K, Kondo Y, Woodruff MC, Gogineni A, Onder L, Ludewig B, Weimer RM, Carroll MC, Mooney DJ, Xia L, Turley SJ: The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 2015, 16:75-84.
- [34] Acton SE, Farrugia AJ, Astarita JL, Mourao-Sa D, Jenkins RP, Nye E, Hooper S, van Blijswijk J, Rogers NC, Snelgrove KJ, Rosewell I, Moita LF, Stamp G, Turley SJ, Sahai E, Reis e Sousa C: Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 2014, 514:498-502.
- [35] Chyou S, Benahmed F, Chen J, Kumar V, Tian S, Lipp M, Lu TT: Coordinated regulation of lymph node vascular-stromal growth first by CD11c<sup>+</sup> cells and then by T and B cells. *J Immunol* 2011, 187:5558-67.
- [36] Kuka M, Iannacone M: The role of lymph node sinus macrophages in host defense. *Ann N Y Acad Sci* 2014, 1319:38-46.
- [37] Mondor I, Baratin M, Lagueyrie M, Saro L, Henri S, Gentek R, Suerinck D, Kastenmuller W, Jiang JX, Bajenoff M: Lymphatic Endothelial Cells Are Essential Components of the Subcapsular Sinus Macrophage Niche. *Immunity* 2019, 50:1453-66 e4.
- [38] Kedl RM, Lindsay RS, Finlon JM, Lucas ED, Friedman RS, Tamburini BAJ: Migratory dendritic cells acquire and present lymphatic endothelial cell-archived antigens during lymph node contraction. *Nat Commun* 2017, 8:2034.
- [39] Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR: A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, 24:269-83.
- [40] Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN: Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006, 25:989-1001.

- 
- [41] Hardtke S, Ohl L, Forster R: Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 2005, 106:1924-31.
- [42] Suan D, Sundling C, Brink R: Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr Opin Immunol* 2017, 45:97-102.
- [43] Yrlid U, Macpherson G: Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. *APMIS* 2003, 111:756-65.
- [44] Buettner M, Bode U: Lymph node dissection--understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol* 2012, 169:205-12.
- [45] Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A: Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods* 2008, 332:170-4.
- [46] Esterhazy D, Canesso MCC, Mesin L, Muller PA, de Castro TBR, Lockhart A, ElJalby M, Faria AMC, Mucida D: Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature* 2019, 569:126-30.
- [47] Cupedo T, Lund FE, Ngo VN, Randall TD, Jansen W, Greuter MJ, de Waal-Malefyt R, Kraal G, Cyster JG, Mebius RE: Initiation of cellular organization in lymph nodes is regulated by non-B cell-derived signals and is not dependent on CXC chemokine ligand 13. *J Immunol* 2004, 173:4889-96.
- [48] Bjerke K, Brandtzaeg P: Terminally differentiated human intestinal B cells. J chain expression of IgA and IgG subclass-producing immunocytes in the distal ileum compared with mesenteric and peripheral lymph nodes. *Clin Exp Immunol* 1990, 82:411-5.
- [49] Griscelli C, Vassalli P, McCluskey RT: The distribution of large dividing lymph node cells in syngeneic recipient rats after intravenous injection. *J Exp Med* 1969, 130:1427-51.
- [50] Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P: The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 1974, 4:435-43.
- [51] Bode U, Lorchner M, Ahrendt M, Blessenohl M, Kalies K, Claus A, Overbeck S, Rink L, Pabst R: Dendritic cell subsets in lymph nodes are characterized by the specific draining area and influence the phenotype and fate of primed T cells. *Immunology* 2008, 123:480-90.
- [52] Bode U, Sparmann G, Westermann J: Gut-derived effector T cells circulating in the blood of the rat: preferential re-distribution by TGFbeta-1 and IL-4 maintained proliferation. *Eur J Immunol* 2001, 31:2116-25.
- [53] Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A: P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997, 385:81-3.
- [54] Iwasaki A, Kelsall BL: Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999, 190:229-39.
- [55] Yamamoto M, Rennert P, McGhee JR, Kweon MN, Yamamoto S, Dohi T, Otake S, Bluethmann H, Fujihashi K, Kiyono H: Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 2000, 164:5184-91.
- [56] Molenaar R, Knippenberg M, Goverse G, Olivier BJ, de Vos AF, O'Toole T, Mebius RE: Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A. *J Immunol* 2011, 186:1934-42.
- [57] Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY: Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004, 21:527-38.
- [58] Ahrendt M, Hammerschmidt SI, Pabst O, Pabst R, Bode U: Stromal cells confer lymph node-specific properties by shaping a unique microenvironment influencing local immune responses. *J Immunol* 2008, 181:1898-907.
- [59] Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Forster R, Pabst O: Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med* 2008, 205:2483-90.
- [60] Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, Otipoby KL, Yokota A, Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P, Rajewsky K, Adams DH, von Andrian UH: Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 2006, 314:1157-60.

- 
- [61] Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW: Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 2000, 192:761-8.
- [62] Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC: Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994, 152:3282-93.
- [63] Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC: Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993, 74:185-95.
- [64] Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O: Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006, 203:519-27.
- [65] Shaikh H, Vargas JG, Mokhtari Z, Jarick KJ, Ulbrich M, Mosca JP, Viera EA, Graf C, Le DD, Heinze KG, Buttner-Herold M, Rosenwald A, Pezoldt J, Huehn J, Beilhack A: Mesenteric Lymph Node Transplantation in Mice to Study Immune Responses of the Gastrointestinal Tract. *Front Immunol* 2021, 12:689896.
- [66] Mebius RE, Breve J, Kraal G, Streeter PR: Developmental regulation of vascular addressin expression: a possible role for site-associated environments. *Int Immunol* 1993, 5:443-9.
- [67] Sasaki K, Pabst R, Rothkotter HJ: Development of the high endothelial venule in rat lymph node autografts. *Anat Rec* 1994, 238:473-9.
- [68] Blum KS, Hadamitzky C, Gratz KF, Pabst R: Effects of autotransplanted lymph node fragments on the lymphatic system in the pig model. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 120:59-66.
- [69] Tammela T, He Y, Lyytikka J, Jeltsch M, Markkanen J, Pajusola K, Yla-Herttuala S, Alitalo K: Distinct architecture of lymphatic vessels induced by chimeric vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor heparin-binding domain fusion proteins. *Circ Res* 2007, 100:1468-75.
- [70] Buettner M, Bode U: Lymph node transplantation and its immunological significance in animal models. *Clin Dev Immunol* 2011, 2011:353510.
- [71] Molenaar R, Greuter M, van der Marel AP, Roozendaal R, Martin SF, Edele F, Huehn J, Forster R, O'Toole T, Jansen W, Eestermans IL, Kraal G, Mebius RE: Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. *J Immunol* 2009, 183:6395-402.
- [72] Buettner M, Pabst R, Bode U: Lymph node stromal cells strongly influence immune response suppression. *Eur J Immunol* 2011, 41:624-33.
- [73] Wolvers DA, Coenen-de Roo CJ, Mebius RE, van der Cammen MJ, Tirion F, Miltenburg AM, Kraal G: Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. *J Immunol* 1999, 162:1994-8.
- [74] Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K: Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:9302-7.
- [75] Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K: The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 1998, 9:59-70.
- [76] Benezech C, Mader E, Desanti G, Khan M, Nakamura K, White A, Ware CF, Anderson G, Caamano JH: Lymphotoxin-beta receptor signaling through NF-kappaB2-RelB pathway reprograms adipocyte precursors as lymph node stromal cells. *Immunity* 2012, 37:721-34.
- [77] Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K: Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2015, 15:350-61.
- [78] Pezoldt J, Pasztoi M, Zou M, Wiechers C, Beckstette M, Thierry GR, Vafadarnejad E, Floess S, Arampatzi P, Buettner M, Schweer J, Fleissner D, Vital M, Pieper DH, Basic M, Dersch P, Strowig T, Hornef M, Bleich A, Bode U, Pabst O, Bajenoff M, Saliba AE, Huehn J: Neonatally imprinted stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells in mesenteric lymph nodes. *Nat Commun* 2018, 9:3903.
- [79] Scandella E, Bolinger B, Lattmann E, Miller S, Favre S, Littman DR, Finke D, Luther SA, Junt T, Ludewig B: Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol* 2008, 9:667-75.

- 
- [80] Cupedo T, Kraal G, Mebius RE: The role of CD45+CD4+CD3- cells in lymphoid organ development. *Immunol Rev* 2002, 189:41-50.
- [81] Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS: TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 2004, 4:1614-27.
- [82] Duester G: Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000, 267:4315-24.
- [83] Duester G, Mic FA, Molotkov A: Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 2003, 143-144:201-10.
- [84] Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S: The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* 2016, 9:468-78.

---

## 13. Anhang

### 13.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Kompartimente und deren Hauptstromazellpopulationen des Lymphknotens. ....	13
Abb. 2 Aufgaben der Fibroblastischen Retikulumzellen (FRC) und der Follikulär dendritischen Zellen (FDC). ....	15
Abb. 3 Schematische Darstellung der Funktionen des Lymphknotens.....	18
Abb. 4 Darstellung der Lymphknotentransplantation. ....	21

---

## 14. Danksagung

Als erstes möchte ich meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen für die großartige Zusammenarbeit danken. Prof. Dr. Reinhard Pabst, Prof. Dr. Matthias Ochs und Prof. André Bleich möchte ich danken, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Forschungen auf dem Gebiet der Stromazellen durchzuführen.

Melanie Bornemann, Anja Siebert und Andrea Liese möchte ich sehr danken, dass sie mich mit Rat und (vor allem) Tat kräftig unterstützt haben. Sie sind der Fels in der Brandung des Labors und trotz ständiger Rückfragen der Doktoranden oder spontanen Planänderungen ruhig und besonnen.

Meine Kollegin und Freundin Dr. Marijana Basic war mir sehr oft eine gute Diskussionspartnerin, um den richtigen Weg ans Ende des Experimentes zu finden. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Mein Dank gilt auch allen Promovierenden, die durch ihre Arbeiten wesentlich zum Gelingen zahlreicher Publikationen beigetragen haben.

Allen Kollegen, die mich durch die Jahre begleitet haben und mir geholfen haben, möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern für die jahrelange Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke aus tiefstem Herzen Dr. Katrin Roth und Dr. Jutta Schade für ihre langjährige Hilfe und Freundschaft. Sie haben immer an mich geglaubt und mir Mut zugesprochen, wenn es mal nicht so gut lief und sich mit mir gefreut, wenn alles passte.

Und natürlich bin ich meiner Familie zu großem Dank verpflichtet: Mein Mann Henning hat sich mit großer Geduld oft meine Sorgen und Nöte angehört. Er hat mich immer auf meinem Weg unterstützt und hat sich um Arne und Claas fantastisch gekümmert, während ich Experimente durchgeführt oder Besprechungen und Kongresse besucht habe. Ohne ihn wäre dies nicht möglich geworden. DANKE!

Ich möchte meinen Eltern danken, die von jetzt auf gleich kamen, um auf die Kinder aufzupassen, wenn es mal eng wurde. Sie haben immer an mich geglaubt und mich unterstützt.

---

## 15. Erklärung

Ich versichere, die angefertigte Habilitationsschrift sowie die darin enthaltenen wissenschaftlichen Publikationen ohne andere als die darin angegebenen Hilfen oder Hilfsmittel verfasst zu haben. Alle wörtlich oder sinngemäß den Arbeiten anderer entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass keine anderen Habilitationsverfahren vorliegen.

---

Dr. Manuela Büttner

Juni 2022