

Aus der Medizinischen Klinik I-Gastroenterologie,
Rheumatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Isolation und phänotypische Charakterisierung von
Immunzellen aus humanen mukosalen Lymphfollikeln

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Yvonne Junker

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Zeitz
2. Prof. Dr. med. M. Fromm
3. Prof. Dr. Dr. D. Schuppan

Datum der Promotion: 23.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Phänotypische Differenzierung der Leukozyten des Immunsystems	3
1.2	Das darmassoziierte lymphatische Gewebe	4
1.3	Induktion der Immunantwort in mukosalen Lymphfollikeln	7
1.3.1	Orale Toleranz	9
1.3.2	Kenntnisse aus dem humanen System	10
1.4	Zielstellung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Materialien	13
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Antikörper	14
2.1.4	Puffer und Medien	15
2.1.5	Software	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Patienten und Biopsieentnahme	16
2.2.2	Präparation der Peyer'schen Plaques/Lymphfollikel	16
2.2.2.1	Biopsien	16
2.2.2.2	Resektate	17
2.2.3	Isolation und Aufarbeitung der mononukleären Zellen	18
2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse	19
2.2.4.1	Einleitung	19
2.2.4.2	LSR II	24
2.2.4.3	Kompensation und Instrumentenkonfiguration	26
2.2.4.4	Färbung und Messung	27
2.2.4.5	Positivkontrollen	28
2.2.4.6	Auswertung	29
2.2.5	Gefrierschnitte	31
2.2.5.1	Fixierung und Schnittverfahren	31
2.2.5.2	Hämalaun-Eosin-Färbung	31
2.2.6	Immunhistochemie	32

2.2.7	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Identifizierung und Präparation	33
3.1.1	Biopsien aus dem terminalen Ileum	36
3.1.2	Resektate aus Kolon/Rektum	39
3.2	Zusammensetzung der mononukleären Zellpopulation	42
3.2.1	Unterschiede in der Zusammensetzung der LFL und LPL	43
3.2.2	Vergleich der mononukleären Zellen aus Ileum und Kolon/Rektum	46
3.3	T-Lymphozyten	48
3.3.1	Vergleich der T-Lymphozyten aus Lymphfollikeln und Lamina propria	49
3.3.2	Vergleich der T-Lymphozyten aus Ileum und Kolon/Rektum	57
3.3.2.1	Lymphfollikel-Lymphozyten	57
3.3.2.2	Lamina-propria-Lymphozyten	60
4	Diskussion	63
4.1	Identifizierung der Peyer'schen Plaques/Lymphfollikel und Zellisolation	63
4.2	Zellpopulation	65
4.2.1	Isolierte mononukleäre Zellen	65
4.2.2	Unterschiede zwischen LFL und LPL	66
4.3	Phänotyp der T-Lymphozyten	68
4.3.1	T-Zell-Rezeptor und Ko-Rezeptoren	68
4.3.2	Reife- und Aktivierungsmarker	68
4.3.3	Integrine	71
4.3.4	Schlussfolgerungen für die funktionellen Analysen	72
4.4	Vergleich der Leukozyten aus Ileum und Kolon/Rektum	72
5	Zusammenfassung	75
6	Abkürzungsverzeichnis	77
7	Literaturverzeichnis	78

6 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allo-Phyco-Cyanin
BP	Bandpass
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
HE	Hämalaun-Eosin
HLA	Human Leucocyte Antigen
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
LFL	Lymphfollikel-Leukozyten
LP	Longpass
LPL	Lamina propria-Leukozyten
MAdCAM-1	mucosal cell adhesion molecule
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
TCR	T Cell Receptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Treg	T regulatory cell

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. M. Zeitz für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. R. Ullrich aus der Medizinischen Klinik I (Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie) für die hervorragende Betreuung und für die ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. rer. nat. H. Bode aus der Medizinischen Klinik I danke ich ebenfalls ganz besonders für die exzellente Betreuung und permanente Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. A. Scheffold, Frau K. Raba und Herrn T. Kaiser, sowie allen Mitarbeitern des Deutschen Rheumaforschungszentrums Berlin für die ständige Unterstützung und die vielen konstruktiven Ideen, welche die Arbeit bedeutend erleichtert haben.

Mein herzlicher Dank gilt Frau U. Dethlefs, Frau S. Münchow, Frau U. Schreiber und Frau K. Pittasch für die ständige Unterstützung und Hilfe.

Ich danke allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik I für die überaus freundliche Aufnahme in ihren Laboren und die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen.

Mein Dank gilt Frau S. Spiekermann für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung danken.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Yvonne Junker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Isolation und phänotypische Charakterisierung von Immunzellen aus humanen mukosalen Lymphfollikeln“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.06.2006

Yvonne Junker