

## 1 Einleitung

### 1.1 Phänotypische Differenzierung der Leukozyten des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen dient der Abwehr von potenziell schädigenden exogenen Erregern oder Substanzen, sowie dem Schutz vor endogenen Angriffen zum Beispiel durch entartete oder autoreaktive Zellen. Die Komplexität dieser Immunabwehr spiegelt sich in einer Vielzahl verschiedenster Leukozyten-Subpopulationen als Bestandteile des Immunsystems wieder. Hierzu zählen T- und B-Lymphozyten, Monozyten oder Makrophagen, dendritische Zellen und Plasmazellen. Deren Differenzierung kann anhand phänotypischer Merkmale, wie zum Beispiel der Expression von Oberflächenmarkern oder funktioneller Kriterien, zum Beispiel der Sekretion von Zytokinen, erfolgen. So exprimieren B-Lymphozyten unter anderem ein Plasmamembran-Phosphoprotein, welches eine Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Zellen spielt (1). Dieses Oberflächenantigen wird nach der CD-Nomenklatur dem „cluster of differentiation“ CD20 zugeordnet. Nach Antigenkontakt differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen, deren Detektion über die ADP-Ribosyl-Cyclase CD38 (2) erfolgen kann, und die im Rahmen der humoralen Immunantwort Antikörper synthetisieren (3).

Im Gegensatz dazu sind T-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. Ihr phänotypisches Merkmal ist der T-Zell-Rezeptor-Komplex. Dieser besteht aus Antigen-erkennenden und signalvermittelnden Proteinen. Bei den Antigen-bindenden Strukturen handelt es sich entweder um  $\alpha\beta$ - oder um  $\gamma\delta$ -Heterodimere, die mit einem Komplex aus vier Signalketten assoziiert sind, der im allgemeinen als CD3 bezeichnet wird (4).  $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen eine separate Linie von T-Lymphozyten dar, die sich durch Phänotyp, Funktion und Gewebelokalisation von den konventionellen  $\alpha\beta$ -T-Zellen unterscheiden (5).  $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen Antigene als prozessierte Peptide in Verbindung mit major histocompatibility complex-(MHC)I- oder MHCII-Molekülen.  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren hingegen folgen nicht diesem klassischen Weg, sondern binden das freie Antigen wie Immunglobuline oder nach Präsentation von MHC-ähnlichen Proteinen (6, 7). Sie scheinen auf bestimmte Arten von Liganden spezialisiert zu sein, darunter Hitzeschockproteine und Nichtpeptidliganden wie Lipidantigen von Mycobakterien (8). Im Darm findet man  $\gamma\delta$ -Zellen hauptsächlich unter den intraepithelialen Lymphozyten.

Weiterhin lassen sich T-Lymphozyten aufgrund der Expression der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen untergliedern. Diese beiden Arten von T-Zellen differieren bezüglich ihrer Bindung an MHC-Moleküle. So erkennt der CD4-Rezeptor MHCII-Komplexe, während der CD8-Rezeptor an MHCI-Komplexe bindet. Die zwei Klassen von MHC-Molekülen unterscheiden sich in der Quelle der von ihnen präsentierten Peptide. MHCI-Komplexe binden Peptide, die im Zytosol der Zellen synthetisiert wurden. MHCII-Moleküle hingegen präsentieren durch Antigen-präsentierende Zellen phagozytierte und prozessierte Antigene.

Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zählen zu den antigenpräsentierenden Zellen. Klassische Monozyten-Marker sind CD14, ein Lipopolysaccharid-Rezeptor, und CD16, ein Fc $\gamma$ III-Rezeptor. Diese Strukturen und der Makrophagen-Oberflächenmarker CD11b (Komplement-Rezeptor 3) finden sich jedoch nur in geringem Prozentsatz auf intestinalen Makrophagen (9, 10). Als spezifischer Oberflächenmarker für intestinale Makrophagen wurde daher CD33, ein Mitglied der Sialoadhesin-Familie etabliert (11). Des weiteren exprimieren Makrophagen und Monozyten, sowie B-Zellen, aktivierte T-Zellen und dendritische Zellen MHCII-Komplexe (human leucocyte antigen(HLA)-DR), die für die Präsentation von Antigenen an CD4-positive T-Zellen notwendig sind (12). Darüber hinaus können dendritische Zellen unter anderem über CD1a, ein atypisches MHC I-Molekül (13), selektiert werden.

## **1.2 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe**

Innerhalb des Immunsystems gibt es anatomisch unterschiedliche Kompartimente, von denen jedes einzelne eine gezielte Reaktion gegen Pathogene hervorrufen kann. Diese Bereiche werden aufgrund von zwei wesentlichen Merkmalen definiert: Zum einen bleiben Immunantworten, die in einem dieser Kompartimente ausgelöst werden, weitgehend darauf begrenzt. Zum anderen sind Lymphozyten aufgrund von speziellen Oberflächenrezeptoren auf bestimmte Kompartimente beschränkt. Eines dieser hochspezialisierten Kompartimente ist das darmassoziierte lymphatische Gewebe, auch als gut associated lymphoid tissue (GALT) bezeichnet.

Der Gastrointestinaltrakt ist ein Organ, welches von Geburt an kontinuierlichem Antigenkontakt in Form von Nahrungsmitteln, ortständiger bakterieller Flora und

Pathogenen ausgesetzt ist. Das intestinale Immunsystem stellt daher den größten und komplexesten Teil des menschlichen Immunsystems dar (14). Es besteht aus einem efferenten und einem induktiven Schenkel, was bedeutet, dass Immunreaktionen im induktiven Schenkel ausgelöst werden, die Ausführung der Immunantwort aber im efferenten Schenkel erfolgt. In jüngerer Zeit gibt es jedoch einige Daten, die zeigen, dass diese Differenzierung nicht als absolut zu betrachten ist (15).

Zu den induktiven Anteilen zählen organisierte lymphoide Aggregate in der Wand von Dün- und Dickdarm. Histologisch sind diese Aggregate beim Menschen gut charakterisiert, sie werden als Mukosa-assoziierte Lymphfollikel bezeichnet. Die sogenannten Peyer'schen Plaques des Dünndarmes, zuerst beschrieben vom Schweizer Anatom Johannes Conrad Peyer (1653-1712), bestehen aus Ansammlungen solcher Lymphfollikel. In der Regel befinden sich im gesamten Dünndarm 20-30 dieser Plaques, die auf der antimesenterialen Seite des Darmes liegen. Ihre Häufigkeit ist nach distal zunehmend, so dass sich die meisten und auch größten Peyer'schen Plaques im Bereich des terminalen Ileums befinden. Die Plaques sind meist oval, 1-4 cm lang, 1-2 cm breit und umfassen 10-60 Follikel, wobei es im humanen terminalen Ileum auch einige hundert sein können (16). Im gesunden Kolon findet man solitäre Follikel, durchschnittlich einen Lymphfollikel pro 3 cm Dickdarmlänge, wobei auch hier die Häufigkeit nach distal zunimmt. Die Follikel liegen in der Lamina propria und Submukosa von Ileum und Kolon und können hier ein größeres Volumen einnehmen, als ihre Oberfläche zum Lumen hin vermuten lassen würde (Abbildung 1, Seite 18). Sie durchdringen jedoch nie die Muscularis propria des Darmes. Im Rektum liegt ein Großteil der Follikel nur in der Lamina propria, mit wenig oder keinem Anteil in der Submukosa (17).

Morphologisch sind die Follikel des Kolons und der Peyer'schen Plaques weitgehend ähnlich aufgebaut. Nach luminal werden die Lymphfollikel durch das sogenannte Follikel-assoziierte Epithel begrenzt, ein spezialisiertes Epithel ohne Krypten und Zotten, welches nur wenige Becherzellen und keine Paneth-Körnerzellen enthält (18). Innerhalb des Follikel-assoziierten Epithels findet man spezialisierte Zellen, sogenannte M(microfold oder membrane)-Zellen, die keine oder nur verkürzte und irreguläre Mikrovilli tragen, sowie verminderte enzymatische Aktivität und eine reduzierte Glykokalix aufweisen. Diese M-Zellen nehmen Proteine und Keime aus

dem Lumen auf und reichen diese an direkt darunter liegende Immunzellen weiter. Ihre Bedeutung als Antigen-präsentierende Zellen ist unklar. Im Vergleich zu den direkt darunter liegenden dendritischen Zellen ist ihre Anzahl und ihr Kontakt zu follikulären T-Zellen gering, allerdings könnten sie mit Immunzellen, die sie in basale Einstülpungen aufnehmen, interagieren (19).

Unterhalb des Follikel-assoziierten Epithels liegt das subepitheliale Domareal. Es enthält CD4-Zellen, Plasmazellen, unreife dendritische Zellen und wenige Makrophagen. Man nimmt an, dass zirkulierende Lymphozyten diesen Bereich über retikuläre Fasern, die sich in Migrationsrichtung ausrichten, erreichen (20). Hieran schließt sich der eigentliche Follikel an. Dieser besteht aus einer äußeren Mantelzone, die reich an B-Zellen, CD4-T-Zellen und reifen dendritischen Zellen ist. Viele Follikel, vor allem im Dünndarm, besitzen ein germinales Zentrum, welches hauptsächlich B-Lymphozyten in einem Netzwerk zahlreicher dendritischer Zellen, sowie vereinzelter CD4-T-Zellen und Makrophagen enthält. Die B-Zellen exprimieren hier im Gegensatz zu peripheren Lymphknoten häufiger IgA als IgG (21, 22). Die Interfollikularregionen wiederum zeichnen sich durch den Reichtum an T-Lymphozyten, sowie die Anwesenheit von reifen dendritischen Zellen und Makrophagen aus. Beim Großteil der T-Zellen handelt es sich um CD4-positive Zellen, die sich normalerweise um die hochendothelialen Venolen der Follikel verteilen. Die meisten der im Follikel vorhandenen CD8-Zellen halten sich ebenfalls in den interfollikulären Bereichen auf, B-Zellen sind hier eher selten zu finden. In Bereichen, in denen sich die B-Zell-reichen Mantelregionen und T-Zell-reichen Interfollikularregionen überlappen, finden wichtige B-T-Zellinteraktionen statt (23).

Intestinale Lymphfollikel und Peyer'sche Plaques unterscheiden sich von anderen Lymphfollikeln im humanen Immunsystem dahingehend, dass sie keine afferenten Lymphbahnen besitzen, über die Lymphozyten das Gewebe erreichen könnten. Die Zellen wandern daher über den Blutstrom in die Follikel ein. Sie verlassen die Blutbahn in den hochendothelialen Venolen der Interfollikularregionen. Die Adhäsion der Leukozyten an die Gefäße ist ein Schlüsselaspekt dieser Zirkulation. Sie wird über die Bindung von spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten, den sogenannten „Homing-Rezeptoren“, an Liganden auf dem Gefäßendothel vermittelt. Einige wichtige Gruppen von Adhäsionsmolekülen sind Selektine und Integrine: Die Lymphozyten binden zunächst über L-Selektin (CD62L) an den Liganden mucosal

cell-adhesion molecule-1 (MAdCAM-1), der sich auf dem Endothel der hochendothelialen Venolen in mesenterialen Lymphknoten und Peyer'schen Plaques befindet, um danach über Bindung des Integrins  $\alpha_4\beta_7$  an MAdCAM-1 in das mukosale Gewebe auszuwandern (24, 25). L-Selektin, welches hauptsächlich von naiven Zellen exprimiert wird, und  $\alpha_4\beta_7$  dienen somit dem „Homing“ der T-Lymphozyten in den Darm (26). Andere Integrine, wie  $\alpha E\beta 7$ , verfügen nicht über Liganden auf dem Endothel, sondern auf Epithelzellen. Eine Rolle im Homing ist für  $\alpha E\beta 7$  daher unwahrscheinlich, denkbar wäre eher ein Zurückhalten der T-Zellen in epithelialen Kompartimenten.  $\alpha E\beta 7$  wird hauptsächlich von intraepithelialen Lymphozyten exprimiert, aber auch auf einem Teil der Lymphozyten der Lamina propria gefunden (27).

Lymphozyten, die unter verschiedenartigen Bedingungen in den Peyer'schen Plaques und Lymphfollikeln stimuliert wurden, erfahren eine Veränderung ihrer Oberflächenstruktur. So erfolgt die Umwandlung von CD45RA, einer Isoform des Pan-Leukozytenmarkers CD45, in CD45RO (28, 29). Des Weiteren kommt es zu einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 (30) und CD25 (31).

Die aktivierten Lymphozyten verlassen die induktiven Kompartimente um nach Wanderung durch das Lymph- und Blutssystem in das efferente Kompartiment, die intestinale Lamina propria auszuwandern. Diese Wanderung ist wiederum geleitet und abhängig von komplexen Interaktionen zwischen Selektinen und Integrinen auf der Zelloberfläche der Lymphozyten und deren Liganden auf endothelialen Oberflächen. Auf diese Weise führt die lokale Selektion einer Antigen-spezifischen T-Zelle nach klonaler Expansion zur Entstehung einer lokalen oder systemischen Immunität. Die Lamina propria besteht aus einem Stützgerüst aus glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Bindegewebsfasern, in dem sich sowohl Blut- als auch Lymphgefäße befinden. Infiltriert wird das Gewebe von einer Vielzahl intestinaler Lymphozyten, die nach Rückkehr aus dem Blutssystem als Effektorzellen gemeinsam mit Makrophagen, dendritischen Zellen und Plasmazellen in der Lamina propria verbleiben (18).

### **1.3 Induktion der Immunantwort in mukosalen Lymphfollikeln**

Wie bereits erwähnt, werden Antigene aus dem Darmlumen über das Follikel-assoziierte Epithel, besonders die M-Zellen aufgenommen und an tiefergelegene

Antigen-präsentierende Zellen weitergereicht. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass abhängig vom induzierenden Agens vermutlich unter dem Einfluss verschieden differenzierter Antigen-präsentierender Zellen und des lokalen Zytokinmilieus spezifische T-Zellantworten in den Peyer'schen Plaques induziert werden (32, 33). Die Differenzierung der CD4-T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Zellen und T-Effektor-Zellen ist Grundlage für die Ausbildung einer protektiven, inflammatorischen oder tolerogenen Immunreaktion. So können Krankheitserreger unterschiedlich mit dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killer (NK)-Zellen interagieren, was das Gleichgewicht der Zytokine und dementsprechend die Differenzierung der CD4-T-Zellen in  $T_H1$ -Zellen oder  $T_H2$ -Zellen beeinflusst. (34).  $T_H1$ -Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und sind ausschlaggebend für die Makrophagenaktivierung im Rahmen der zellulären Immunantwort. Die Stimulation von B-Lymphozyten zur Antikörper-Produktion ist hingegen Aufgabe der  $T_H2$ -Zellen, welche hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren. Die beiden Untergruppen können sich gegenseitig beeinflussen, wird eine von ihnen dominant, so ist es häufig schwierig, die Immunantwort zum anderen Typ hin zu verlagern. Dies liegt unter anderem daran, dass die von dem einen CD4-T-Zelltyp sezernierten Zytokine die Entwicklung des anderen unterdrücken. In vivo gibt es dennoch oft Situationen, in denen Mischformen auftreten (33, 35, 36).

Auch CD8-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle beim Immunschutz. Dies gilt besonders dann, wenn der Wirt vor Infektionen mit Viren oder anderen intrazellulären Erregern bewahrt werden soll. CD8-Zellen binden an über MHC I-Komplexe präsentierte Antigene und führen zur Zerstörung der befallenen Zellen (37).

Die aktivierten CD4- und CD8-T-Lymphozyten gelangen über efferente Lymphgefäße in die mesenterialen Lymphknoten und anschließend über den Blutstrom in die Lamina propria. Im Idealfall beseitigt die adaptive Immunantwort die Erreger und verleiht dem Wirt durch die Ausbildung von Gedächtniszellen einen Immunschutz, mit dem er bei der nächsten Infektion durch denselben Erreger in der Lage ist, schneller und effektiver zu reagieren.

### 1.3.1 Orale Toleranz

Eine parenterale Gabe eines vorher oral zugeführten Antigens löst bei Mäusen keine systemische Reaktion aus. Dieses Phänomen, bei dem das Immunsystem auf eine spezifische aktive Weise nicht reagiert, wird als orale Toleranz bezeichnet (32). Als wesentliche Mechanismen konnten in Tiermodellen drei verschiedene Reaktionen von T-Zellen verantwortlich gemacht werden. Die erste Reaktion ist die Deletion antigenspezifischer T-Zellen durch Auslösung des programmierten Zelltodes. Dies beobachtete man bei Tierexperimenten als Antwort auf die orale Aufnahme von wahrscheinlich unphysiologisch hohen Mengen an Antigenen (38). Es handelt sich hierbei vermutlich nicht um den wichtigsten Mechanismus der oralen Toleranz, er könnte aber daran beteiligt sein. Als zweite Möglichkeit reagieren T-Zellen, nachdem ihnen ein Peptid ohne zusätzliche kostimulierende Signale präsentiert wurde, nicht mehr auf weitere Stimulation durch dieses Antigen. Es kommt zur Anergie (39). Eine Alternative zur klonalen Deletion und Anergie ist die Entwicklung regulatorischer T-Zellen. Diese Zellen können nach einer erneuten Begegnung mit dem Antigen aktiv antigenspezifische Reaktionen unterdrücken. Eine Reihe von Studien hat Untergruppen von CD4-T-Zellen als regulatorische Populationen herausgearbeitet. Es handelt sich hierbei um  $T_H3$ -Zellen und sogenannte T regulatory cells (Tregs), die nach Stimulation Interleukin-10 und TGF $\beta$  sezernieren und damit  $T_H1$ -Reaktionen supprimieren können (32). Die Tregs wurden zunächst als CD4-positive, CD25-positive T-Lymphozyten definiert (40, 41). Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass lediglich die CD25<sup>high</sup>-positive Population regulatorische Funktionen besitzt (42, 43).

Allgemein wird angenommen, dass die systemische orale Toleranz auf einer Induktion in den Peyer'schen Plaques beruht (44). Eine andere Studie zeigte jedoch, dass die Induktion oraler Toleranz bei der Maus auch möglich ist, nachdem die embryonale Entwicklung der Peyer'schen Plaques unter Erhalt der mesenterialen Lymphknoten unterdrückt wurde. Dies weist auf eine eventuelle Beteiligung der mesenterialen Lymphknoten hin (45). Auch ist die Rolle der Lymphfollikel im Kolon bislang nicht untersucht. Es werden daher noch weiterführende Studien notwendig sein, um das Phänomen der oralen Toleranz genauer charakterisieren zu können.

### 1.3.2 Kenntnisse aus dem humanen System

Alle bisher formulierten Ergebnisse und Vermutungen beruhen auf Erkenntnissen aus Mausmodellen. Andere Spezies betreffend ist die Datenlage sehr heterogen. Einerseits gibt es für Schweine und Hunde ebenfalls Beschreibungen über induzierbare orale Toleranz. Demgegenüber gestaltete sich die Induktion oraler Toleranz bei Hasen und Meerschweinchen jedoch schwierig, wohingegen Wiederkäuer und Hühner keine Toleranz gegenüber oral applizierten Antigenen entwickelten (46). Es erscheint daher offensichtlich, dass die Übertragbarkeit der beschriebenen Daten auf den Menschen nur unter Vorbehalt geschehen kann. Zusätzlich existieren bekanntermaßen fundamentale Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen. So sind die Peyer'schen Plaques von Mäusen rund, beinhalten weniger als zehn Follikel und verteilen sich über den gesamten Dünndarm, wohingegen menschliche Plaques mehrere Zentimeter lang sein können, einige Dutzend Follikel beinhalten und ihre größte Dichte im Ileum haben (16, 47). Die Entwicklung der Peyer'schen Plaques erfolgt bei der Maus postnatal unterstützt durch die Anwesenheit von luminalen Mikroorganismen, während humane Peyer'sche Plaques bereits pränatal vollständig entwickelt sind (48, 49). Beim Menschen gibt es zusätzlich zu den Peyer'schen Plaques solitäre Lymphfollikel im Kolon, in der Maus findet man an deren Stelle Kryptopatches, das heißt Ansammlungen nicht-lymphozytärer Zellen (50). Des Weiteren ist die intestinale Flora bei Mäusen auf 6-10 Spezies limitiert, die Flora des Menschen beinhaltet über 400 Spezies (18). Auch die Ernährung und die Lebensumstände zwischen in Laboratorien aufgezogenen Zuchtmäusen und dem menschlichen Geschlecht könnten nicht unterschiedlicher sein.

Trotzdem gibt es bislang nur sehr wenige Studien, welche die Funktion der Zellen aus humanen mukosalen Lymphfollikeln untersucht haben. Einige davon beziehen sich auf Peyer'sche Plaques bei Kindern (51-53). Sie nutzen die Tatsache, dass bei Kindern die Peyer'schen Plaques im terminalen Ileum makroskopisch sichtbar sind, während sie im adulten Darm nur schwer zu identifizieren sind. Auf diese Weise können bei Kindern Lymphfollikel aus den Peyer'schen Plaques endoskopisch gewonnen werden, was bei Erwachsenen nicht effektiv möglich ist. In der ersten 1987 publizierten Studie wurden erstmals humane Zellen aus den Peyer'schen Plaques isoliert, phänotypisch charakterisiert und für funktionelle Untersuchungen

zugänglich gemacht (51). Die isolierten Zellen konnten in folgenden Untersuchungen mit  $\beta$ -Laktoglobulin aus Kuhmilch inkubiert, also mit einem dem Immunsystem bekannten Nahrungsantigen restimuliert werden. Die Zellen zeigten eine deutliche Proliferationsantwort, sowie ein inflammatorisches  $T_H1$ -Zytokin-Profil mit Sekretion von Interferon- $\gamma$ . Dies steht in deutlichem Gegensatz zu Mausmodellen, in denen wie oben erwähnt regulatorische Antworten vorherrschen (52, 53). Die nachfolgenden Arbeiten erschienen 13 Jahre nach der ersten, was zeigt, wie schwierig es ist, Untersuchungen mit ausreichend Gewebe aus dem Ileum von Kindern durchzuführen. Auch wenn es in anderen Studien schon gelungen ist, humane Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques beim Erwachsenen zu isolieren, so handelte es sich hierbei um keine systematischen Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv. Des Weiteren war es nie möglich, die Methoden wiederholbar zu machen und funktionelle Analysen durchzuführen (54, 55).

Insgesamt ist also trotz des erheblichen Interesses an der Möglichkeit, durch mukosale Vakzinierung und Induktion einer „oralen Toleranz“ unerwünschte Immunreaktionen zu unterdrücken, das hierfür vermutlich entscheidende Kompartiment beim Menschen funktionell kaum untersucht. Weitergehende Aufschlüsse über die humanen mukosalen Immunantworten sind letztendlich nur zu erwarten, wenn es gelingt, Methoden zur Gewinnung von Zellen aus den sekundären lymphatischen Geweben zu entwickeln. Denn nur, wenn man in der Lage ist, die normale Immunantwort der lymphoiden Follikel beim Menschen zu verstehen, sind auch Fragen nach aberranten Immunreaktionen, wie beispielsweise bei einheimischer Sprue oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu beantworten.

Hierbei sollte die Tatsache der solitären Lymphfollikel im Dickdarm nicht außer Acht gelassen werden. Bisher wurden alle funktionellen Modelle an den Peyer'schen Plaques erarbeitet. Doch kann aus dem Geschehen im Dünndarm nicht zwingend auf das im Dickdarm geschlossen werden, da es sowohl im Aufbau, als auch in der Funktion große Unterschiede zwischen beiden Darmanteilen gibt. Der Dünndarm ist der Hauptort für Verdauung und Absorption von Nahrungsstoffen, Vitaminen, anorganischen Salzen und Wasser. Seine Oberfläche ist durch Ringfalten, Darmzotten, Darmkrypten und Mikrovilli auf den Enterozyten enorm vergrößert. Der Dickdarm dient hauptsächlich dem Transport und der Speicherung des Fäzes, sowie

der Wasserresorption. Man findet hier keine oberflächenvergrößernden Zotten mehr. Im Gegensatz zum sterilen Dünndarm ist der Dickdarm durch eine stabile mikrobielle Flora besiedelt, die mit ihrem Wirt eine Symbiose eingeht. Diese Mikroorganismen sind in vieler Hinsicht nützlich. Sie bieten Schutz vor Infektionen, indem sie im Darm die ökologischen Nischen für pathogene Keime besetzen, und sie synthetisieren Vitamin K, sowie gewisse Bestandteile des Vitamin-B-Komplexes. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie auch eine regionale Spezialisierung der Immunzellen im Dickdarm beeinflussen (56).

#### **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Identifikation von Peyer'schen Plaques und mukosalen Lymphfollikeln in humanen Darmbiopsien und -resektaten, sowie ihrer Präparation zur Isolierung vitaler follikulärer Leukozyten.

Durch phänotypische Analysen der aus Follikeln im Vergleich zu follikel-freier Lamina propria isolierten Zellen sollten dann folgende Fragen beantwortet werden:

Welche der in den Follikeln enthaltenen Leukozyten können mit der verwendeten Methode isoliert werden?

Lassen sich aus histologischen Untersuchungen bekannte Unterschiede zwischen Lymphfollikel-Leukozyten und Lamina-propria-Leukozyten in den isolierten Zellpopulationen bestätigen?

Bestehen zwischen den isolierten Lymphfollikel-Leukozyten und Lamina-propria-Leukozyten Unterschiede in der T-Zellpopulation?

Bestehen zwischen den aus Dünn- und Dickdarm isolierten Lymphfollikel-Leukozyten Unterschiede in der T-Zellpopulation?

Durch diese Untersuchungen sollten wichtige Grundlagen für weiterführende Studien zur Funktion follikulärer T-Zellen beim Menschen erarbeitet werden.