

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Präparation

Die Peyer'schen Plaques in den Biopsien des terminalen Ileums konnten unter dem Stereomikroskop eindeutig als zottenfreie, rundliche und leicht erhabene Areale innerhalb der typischen samtartigen Zottenstruktur der Dünndarm-Mukosa identifiziert werden (Abbildung 8A-C). Zur Illustration der Größe eines präparierten Plaques von circa 1,5 mm Durchmesser ist dieser in Abbildung 8D auf einem 1-Cent-Stück dargestellt. Die Bestätigung der Präsenz von Peyer'schen Plaques erfolgte zur Etablierung der Methode durch HE-gefärbte Gefrierschnitte (Abbildung 8E).

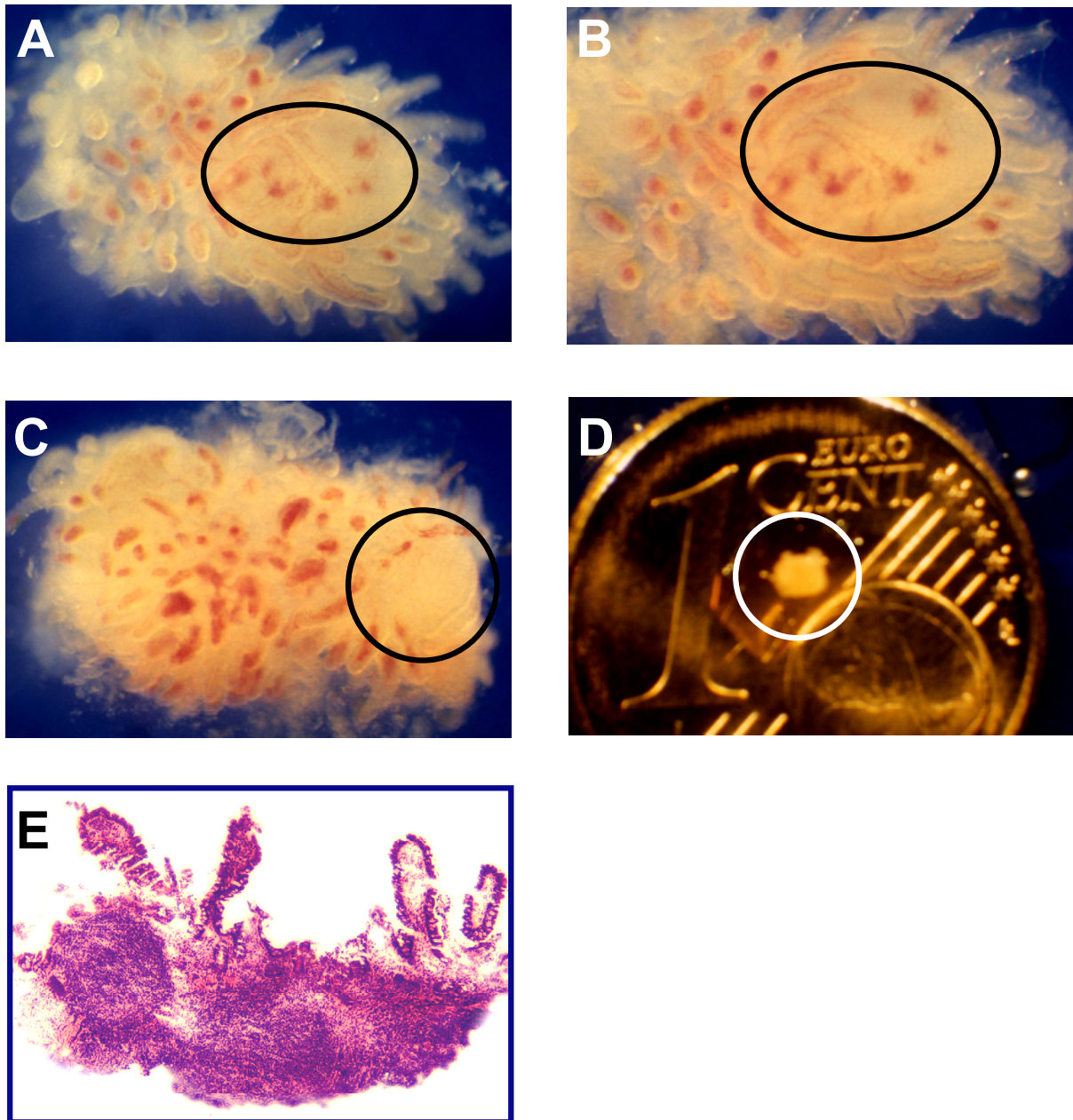


Abbildung 8. Stereomikroskopische Erscheinungsbilder von Peyer'schen Plaques (Kreis) in 20facher (A, C) und 40facher (B) Vergrößerung. A und B zeigen denselben Plaques, D zeigt den Peyer'schen Plaque (Kreis) aus C nach Präparation. Die Bestätigung erfolgte durch HE-Färbung von Gefrierschnitten, E zeigt eine Biopsie eines Peyer'schen Plaques vor Exzision. Vergrößerung x20 (A und C), x30 (D), x40 (B), x25 (E).

Im Gegensatz zu den nativ betrachteten Biopsien mussten die Präparate des Rektums/Kolons zunächst mit Methylenblau gefärbt werden, um die Lymphfollikel darzustellen. Diese sind nach der Färbung als blasse, von einem dunklen Randsaum umgebene, leicht erhabene, runde Strukturen zu erkennen, die das regelmäßige Kryptenmuster der Dickdarm-Mukosa unterbrechen (Abbildung 9A-C). Auch hier wurden zur Etablierung der Methode HE-Färbungen von Gefrierschnitten angefertigt, die die zielsichere Präparation der Lymphfollikel bestätigten (Abbildung 9D).

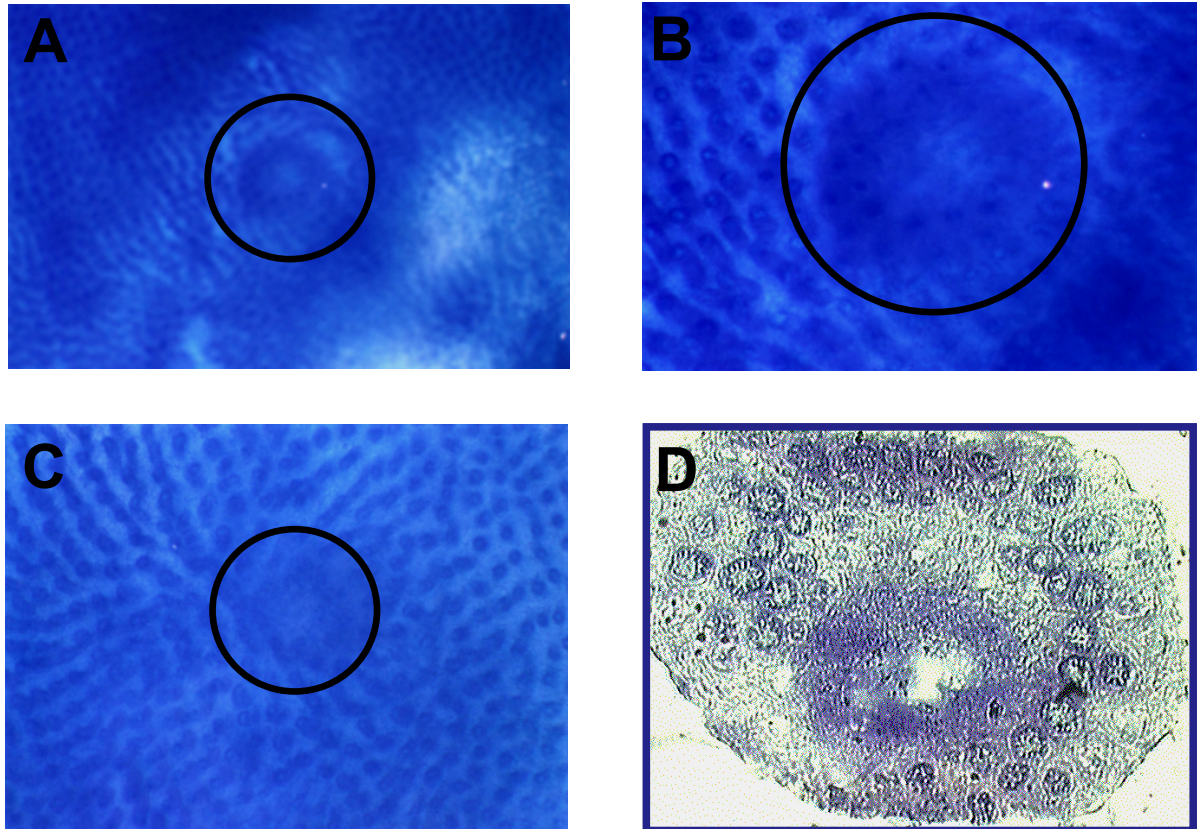


Abbildung 9. Ansicht von Lymphfollikeln (Kreis) des Kolons nach Methylenblau-Färbung (A, B, C) unter einem Stereomikroskop. A und B zeigen denselben Follikel in unterschiedlicher Vergrößerung. Der Follikel in C war optisch schwerer zu identifizieren, stellte sich aber beim Herüberstreichen mit einer Sonde als erhabene Struktur dar. Die Verifizierung erfolgte durch Hämalaun-Färbung, D zeigt einen Lymphfollikel vor Exzision. Vergrößerung x20 (A,C), x40 (B) x100 (D).

3.1.1 Biopsien aus dem terminalen Ileum

Insgesamt wurden Biopsien von 54 Patienten untersucht, wobei im Median 5 (2-12) Biopsien pro Patient entnommen und analysiert wurden. Hierbei fanden sich 2 (0-8) Peyer'scher Plaques pro Patient (Abbildung 10). Bei 19 Patienten enthielten die Biopsien keinen Follikel. Diese Patienten waren im Median 54 Jahre (21-76 Jahre) alt, 6 Patienten waren männlich. Im Vergleich zu den Patienten mit Follikeln gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter oder Geschlecht.

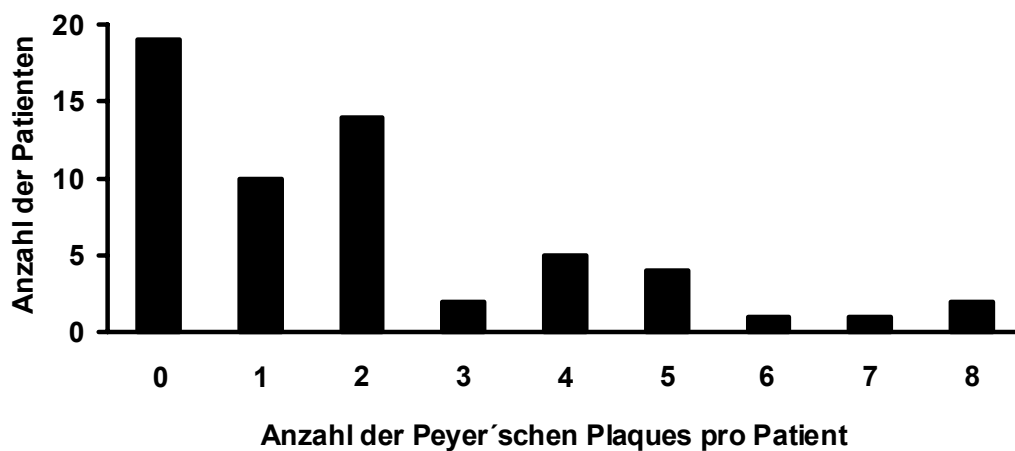


Abbildung 10. Häufigkeitsverteilung der Peyer'schen Plaques in den Biopsien des terminalen Ileums. In 35% der Fälle fand sich kein Peyer'scher Plaque.

Es stellte sich die Frage, ob man mit einer Erhöhung der Zahl der Biopsien pro Patient eine höhere Ausbeute an Peyer'schen Plaques erreichen konnte. Hierbei zeigte sich jedoch keine Korrelation dieser beiden Parameter ($p=0,07$). Dennoch fanden sich bei der Entnahme von 8 oder mehr Biopsien pro Patient signifikant mehr Peyer'sche Plaques ($p<0,01$). Was die Zellausbeute aus den gefundenen Plaques betraf, so konnten hier keine Wechselbeziehungen festgestellt werden (Abbildung 11).

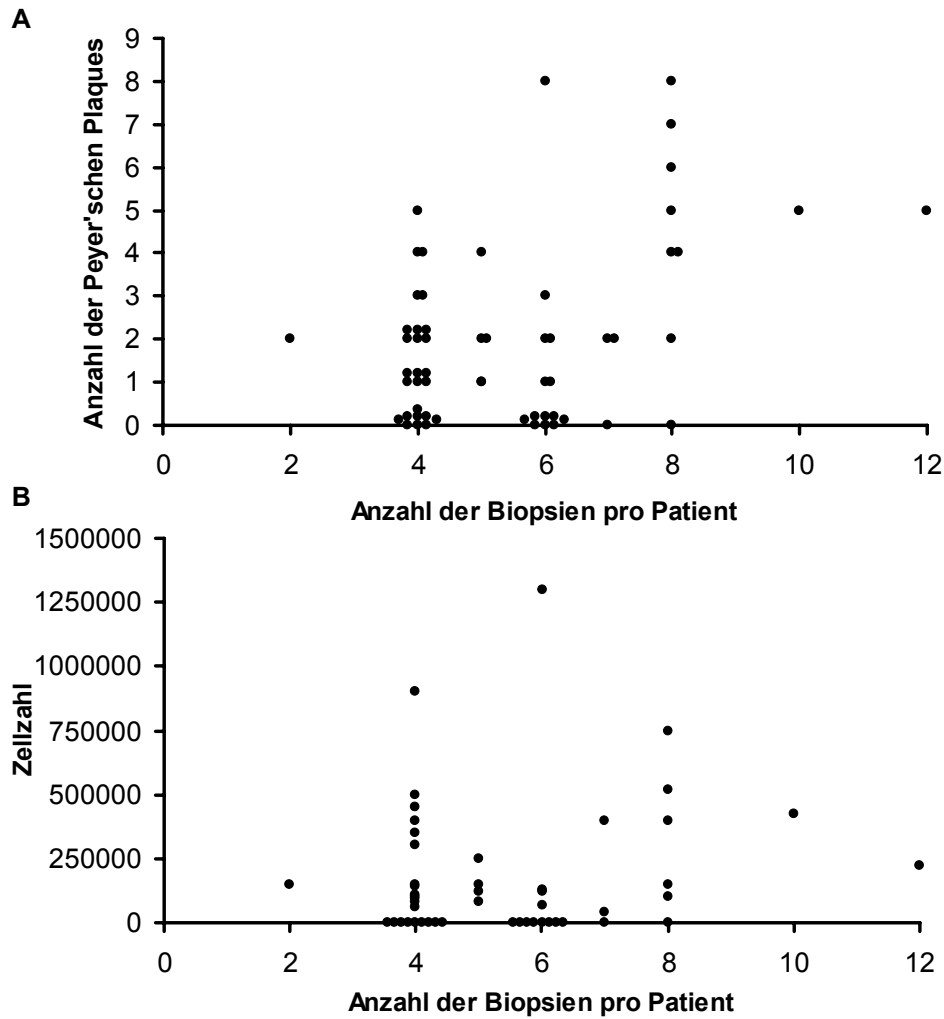


Abbildung 11. Korrelation der Anzahl an Biopsien pro Patient und der Zahl der in den Biopsien gefundenen Peyer'schen Plaques (A), sowie zwischen der Zahl der Biopsien pro Patient und der isolierten Zellzahl (B). Die Zahl der gefundenen Peyer'schen Plaques und die Zahl isolierter Zellen zeigen keine Abhängigkeit von der Anzahl der Biopsien.

Des weiteren wurde geprüft, ob sich die Zahl der Peyer'schen Plaques mit dem Alter verändert, oder ob sie vom Geschlecht abhängt. Es ergaben sich aber keine Zusammenhänge zwischen der Zahl an präparierten Peyer'schen Plaques pro Biopsie und Alter oder Geschlecht des Patienten (Abbildung 12).

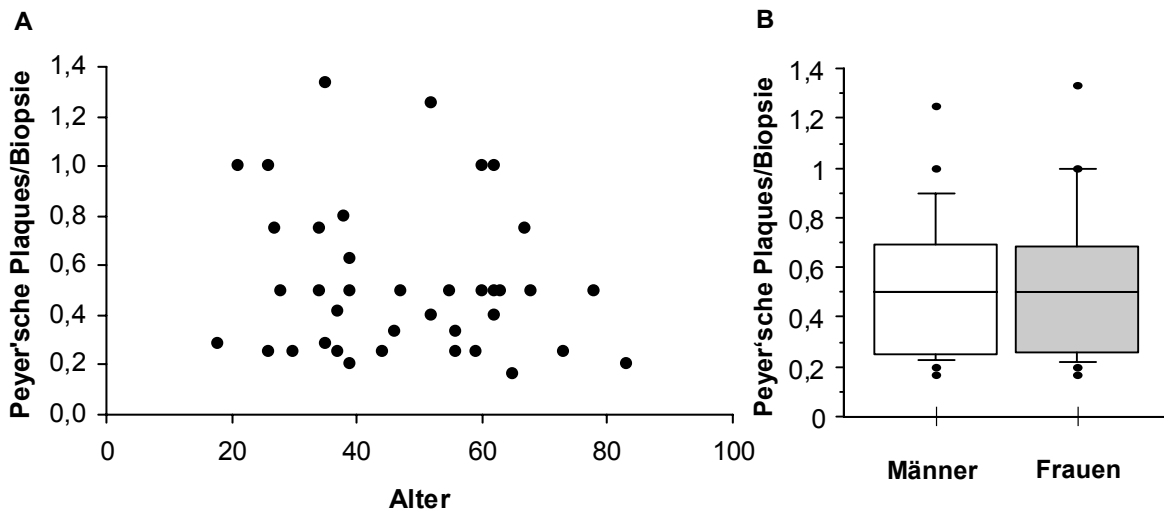


Abbildung 12. Zusammenhang zwischen gefundenen Peyer'schen Plaques pro Biopsie und Alter (A), sowie Geschlecht (B) der Patienten. In die Betrachtungen wurden nur Patienten mit Follikeln einbezogen. Die Zahl der Peyer'schen Plaques pro Biopsie war weder abhängig vom Alter, noch vom Geschlecht der Patienten.

Die Durchführung phänotypischer und vor allem funktioneller Untersuchungen ist abhängig von der zur Verfügung stehenden Zahl isolierter Zellen. In dieser Arbeit konnten pro Plaque 75000 (20000-880000 Zellen) vitale mononukleäre Zellen isoliert werden. Bei 33 Patientenproben betrug die Zahl der insgesamt isolierten follikulären Leukozyten über 100000. Die Zellzahlen waren nicht abhängig vom Alter der Patienten (Abbildung 13).

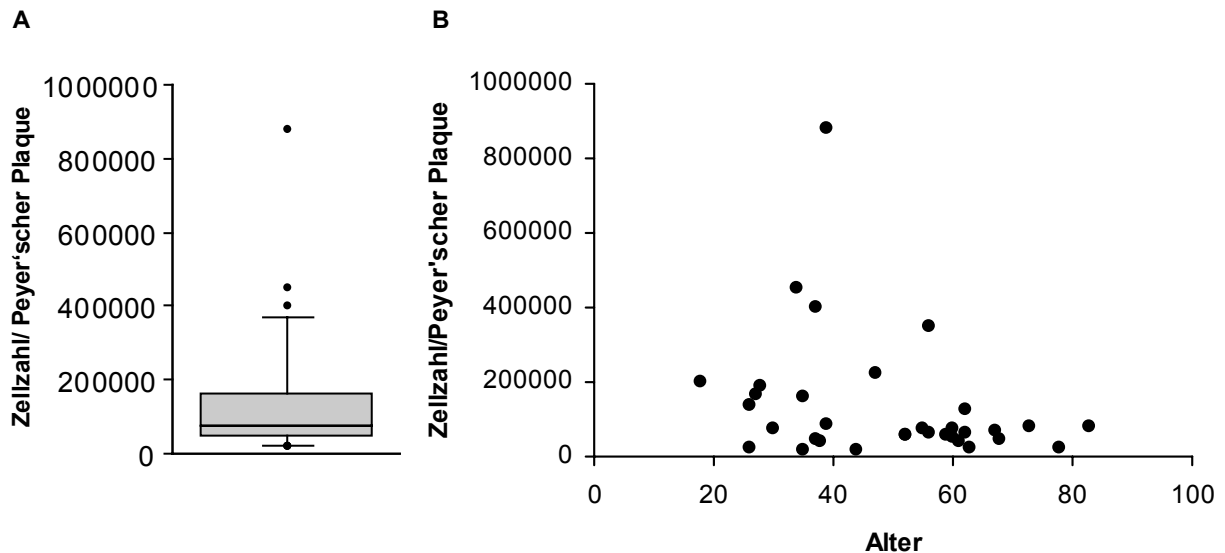


Abbildung 13. Verteilung der pro Peyer'schem Plaque isolierten Zellzahlen (A), sowie deren Abhängigkeit vom Alter der Patienten (B). Bei der Darstellung der Daten als Boxplot (A) erfolgt von unten nach oben die Angabe der 10. Perzentile, der 25. Perzentile, des Medians, der 75. Perzentile und der 90. Perzentile. Werte außerhalb der 10. und 90. Perzentile sind als Punkte gekennzeichnet. In 50% der Fälle konnten zwischen 50000 und 150000 Zellen pro Plaque isoliert werden (A).

Von den insgesamt untersuchten Patientenproben enthielten 65% der blind entnommenen Biopsien Peyer'sche Plaques, es wurden 9 Proben für die phänotypische Analyse verwendet. Präparate, in denen keine Plaques enthalten waren oder die nach Isolation eine zu geringe Zellzahl (<100000 mononukleäre Zellen) für weiterführende Untersuchungen aufwiesen, wurden verworfen. Um negative Einflüsse auf die Zell-Viabilität durch Frieren und Tauen zu vermeiden, wurden die Zellen für die phänotypischen Untersuchungen direkt nach der Isolation aufgearbeitet.

3.1.2 Resektate aus Kolon/Rektum

Es wurden insgesamt Resektate des Kolons bzw. Rektums von 36 Patienten untersucht, die sich aufgrund eines Kolon- bzw. Rektum-Karzinoms einer Operation unterzogen hatten. Es fanden sich im Median 6 Follikel pro Präparat (0-17 Follikel) (Abbildung 14), wobei aus einem Follikel 67000 (13000-250000) vitale mononukleäre Zellen isoliert werden konnten. Aus 28 Patientenproben konnten jeweils über 100000 follikuläre Zellen isoliert werden. Wie schon bei den Peyer'schen Plaques waren auch diese Zellzahlen nicht vom Alter der Patienten abhängig (Abbildung 15).

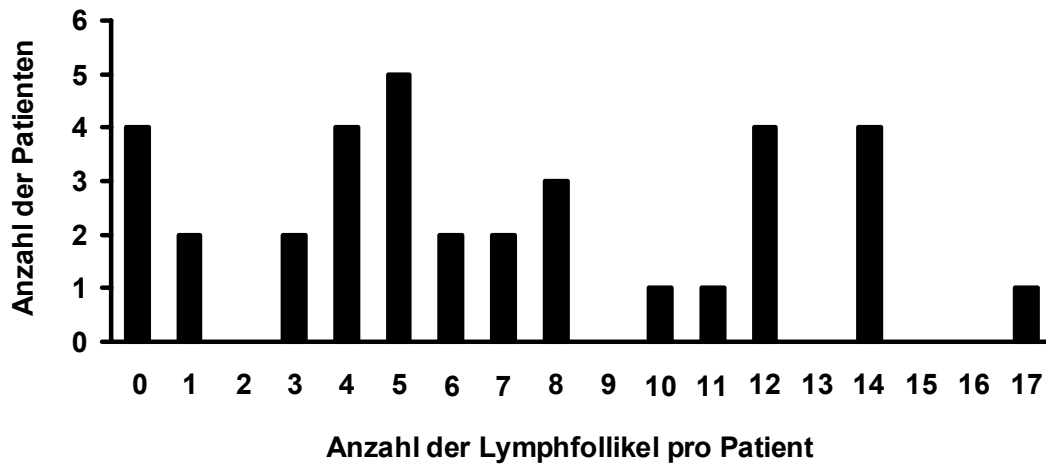


Abbildung 14. Häufigkeitsverteilung der Lymphfollikel in Kolon- und Rektum-Präparaten. In 11% der Fälle fand sich kein Lymphfollikel in den Resektaten.

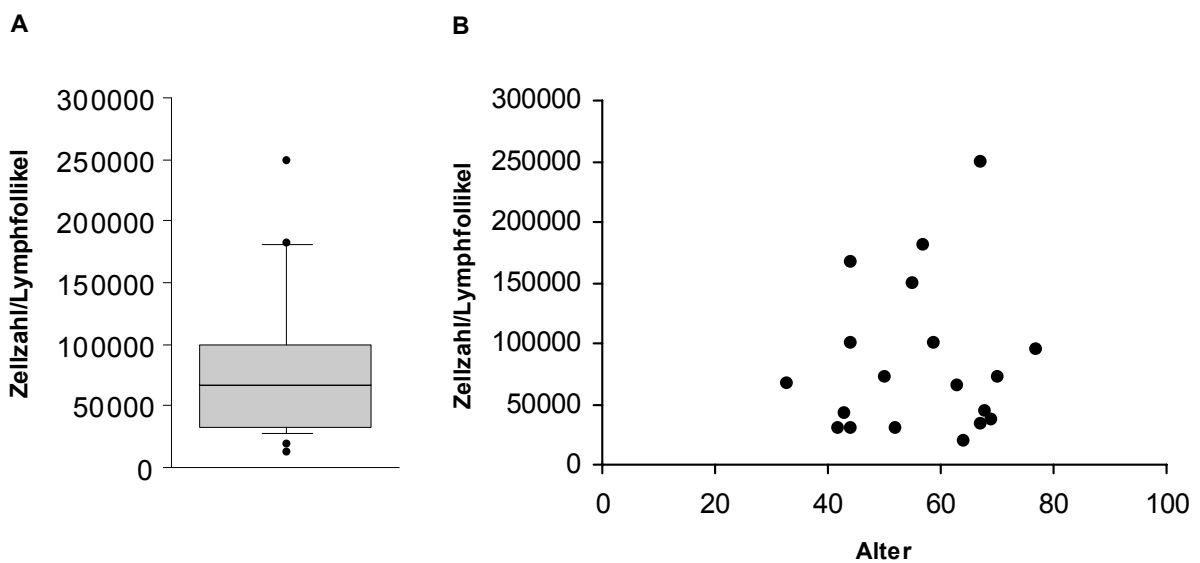


Abbildung 15. Verteilung der pro Lymphfollikel isolierten Zellzahlen (A), sowie deren Abhängigkeit vom Alter der Patienten (B). Es konnten in 50% der Fälle zwischen 30000 und 100000 Zellen aus einem Follikel isoliert werden (A).

Betrachtete man die gefundenen Lymphfollikel pro Präparat in Abhängigkeit von der Resektatgröße, so konnte auch hier weder ein Zusammenhang zwischen der Größe des Resektates und der Anzahl der darin enthaltenen Follikel, noch zwischen der Resektatgröße und der isolierten Zellzahl festgestellt werden (Abbildung 16).

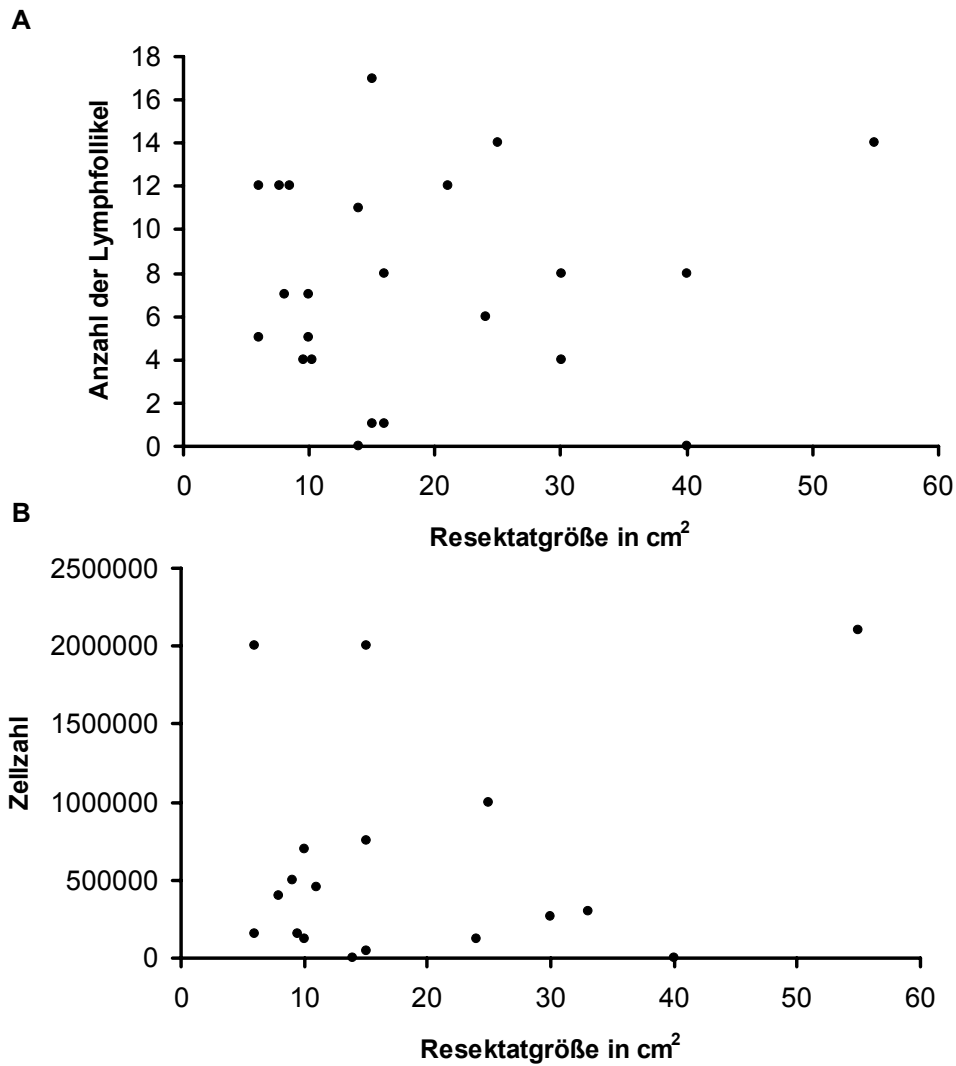


Abbildung 16. Zusammenhang von Resektatgröße und Anzahl der Lymphfollikel in den Resektaten (A), sowie zwischen Resektatgröße und isolierter Zellzahl (B).

Insgesamt konnten aus 89% der Resektate Follikel präpariert werden. Wie schon bei den Biopsien des terminalen Ileums erwähnt, fanden sich auch bezüglich der Kolon-Resektate keine Zusammenhänge zwischen der Zahl an gefundenen Lymphfollikeln und Alter oder Geschlecht der Patienten. Es wurden 8 Proben für die phänotypische Charakterisierung verwendet, Präparate ohne Follikel oder mit einer isolierten Zellzahl unter 100000 Zellen wurden ebenfalls verworfen. Zusätzlich wurden sowohl Kolon- als auch Ileum-Proben zur Herstellung von Gefrierschnitten verbraucht.

3.2 Zusammensetzung der mononukleären Zellpopulation

Um die Untersuchung auf hämatopoetische Zellen zu beschränken, wurden nur CD45-positive Zellen in die Auswertung einbezogen. Hierzu zählen die in Follikeln und Lamina propria enthaltenen T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Plasmazellen. Die Zuordnung erfolgte über die oben erwähnten spezifischen Marker. So wurden T-Lymphozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 detektiert, B-Lymphozyten hingegen mit Antikörpern gegen CD20. Plasmazellen exprimieren CD38, jedoch weder CD20 noch CD3 (2). Dies ist zur Identifizierung der Plasmazellen von entscheidender Bedeutung, da auch T- und B-Zellen CD38-positiv sein können (58, 59). Aus diesem Grund wurden Plasmazellen in dieser Arbeit als CD38+CD20-CD3- definiert. Als Screening-Marker für dendritische Zellen wurde CD1a, ein atypisches MHC I-Molekül, eingesetzt (13) (Tabelle 5).

Aufgrund der schwierigen Detektion intestinaler Makrophagen (11) wurde in der vorliegenden Arbeit HLA-DR zusätzlich zu CD33 als Kontrolle mitgeführt. Nicht mit CD33 detektierbare Makrophagen konnten mit Hilfe dieses Markers als HLA-DR-positive, CD3- und CD20-negative Leukozyten herausgefiltert werden. Die Zahl der so detektierten Makrophagen lag jedoch unter 1%, so dass auf eine Auswertung im Folgenden verzichtet wird.

Tabelle 5. Spezifische Oberflächenmarker der Leukozyten-Subpopulationen.

Subpopulation	Oberflächenmarker
T-Lymphozyten	CD3
B-Lymphozyten	CD20
Makrophagen	CD33
Plasmazellen	CD38+ CD20- CD3-
Dendritische Zellen	CD1a

3.2.1 Unterschiede in der Zusammensetzung der LFL und LPL

Da die Frequenz der dendritischen Zellen und der mit CD33 detektierten Makrophagen ebenfalls in einem Bereich von unter 1% lag, beschränken sich die folgenden Betrachtungen auf T- und B-Lymphozyten, sowie Plasmazellen. In den Lymphfollikeln fanden sich circa doppelt so viele B-Lymphozyten wie in der Lamina propria, wohingegen kein Unterschied in der Zahl der T-Lymphozyten existierte (Abbildung 17, Abbildung 18). Des weiteren gab es in dieser Arbeit weniger Plasmazellen in den Follikeln als unter den Leukozyten der Lamina propria (Tabelle 6, Abbildung 17).

Tabelle 6. Prozentualer Anteil der T-, B-Lymphozyten und Plasmazellen an allen DAPI-negativen, CD45-positiven Leukozyten der Lamina propria (LPL) und der Lymphfollikel (LFL).

	LPL (n=17)	LFL (n=17)	Signifikanz
T-Lymphozyten (CD3)	53% (14-76%)*	54% (20-69%)	n.s.
B-Lymphozyten (CD20)	22% (10-47%)	42% (18-64%)	p<0,01
Plasmazellen (CD38+CD3-CD20-)	5% (2-18%)	2% (0-5%)	p<0,01

*Die Daten von Ileum und Kolon/Rektum wurden gepoolt, n.s.=nicht signifikant.

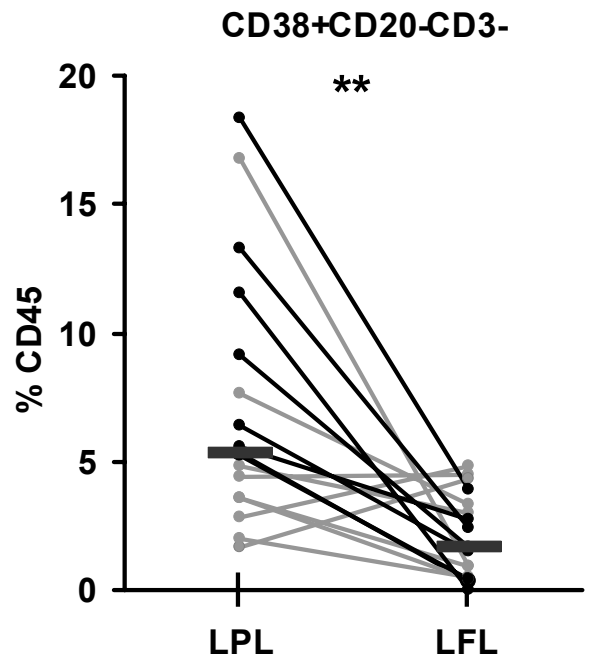
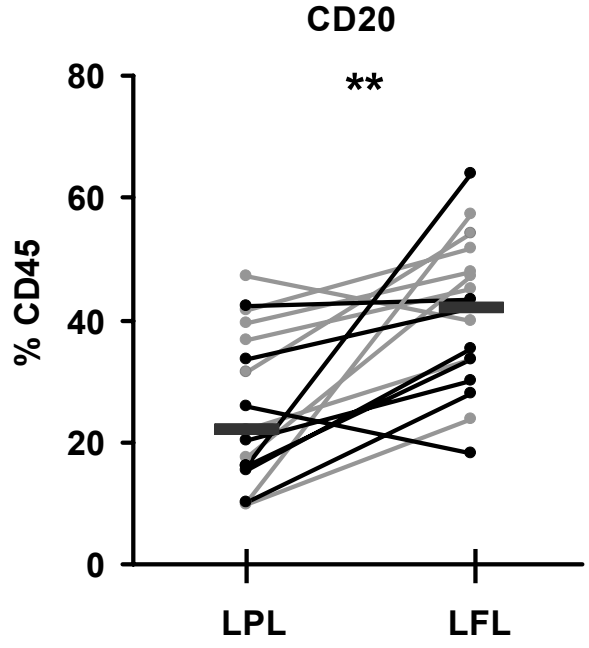
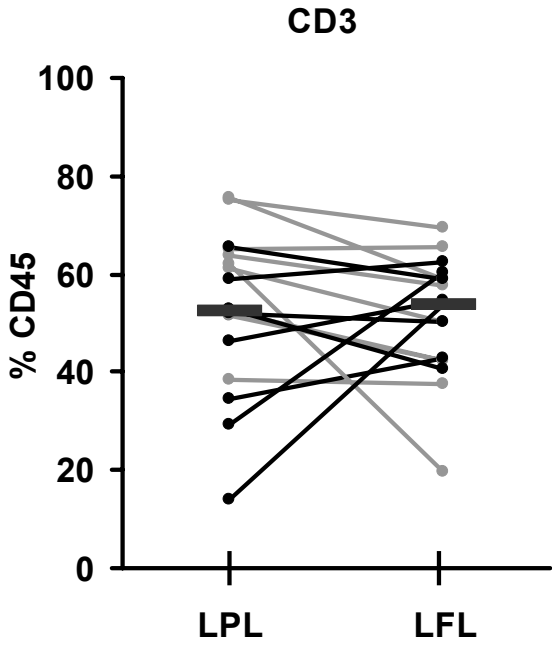


Abbildung 17. Die Leukozyten der Lymphfollikel und der Lamina propria aus Ileum und Kolon/Rektum von insgesamt 17 Patienten wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Beim Vergleich von Lamina-propria-Leukozyten (LPL) und Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) ergaben sich eine gleiche Zahl an T-Lymphozyten (CD3+), sowie mehr B-Lymphozyten (CD20+) und weniger Plasmazellen (CD38+CD20-CD3-) in den Follikeln. Dargestellt sind prozentuale Anteile an allen CD45+-Leukozyten in Einzelwerten und Medianen. Mediane sind als Balken dargestellt, Werte aus Kolon/Rektum-Präparaten sind schwarz, solche aus Ileum-Präparaten grau gekennzeichnet. **p<0.01

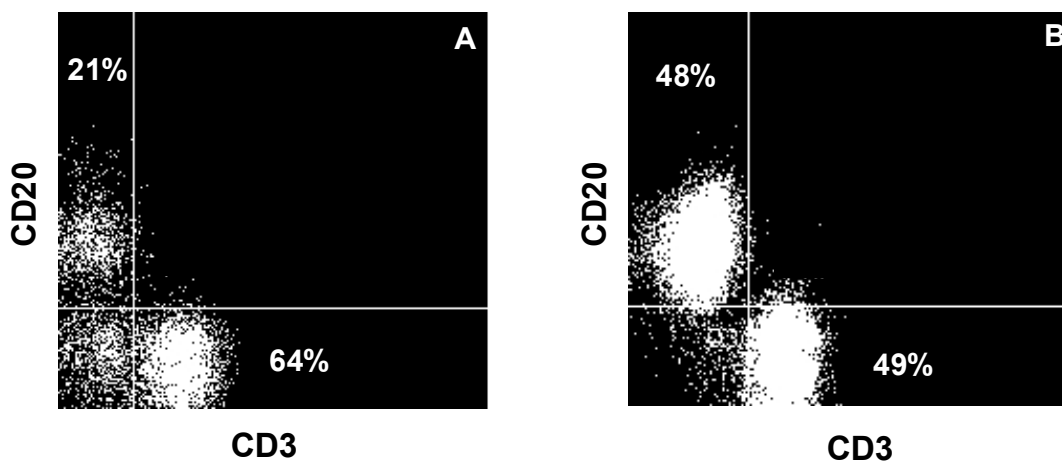


Abbildung 18. Expression der Oberflächenmarker CD3 (T-Lymphozyten) und CD20 (B-Lymphozyten) auf Leukozyten der Lamina propria (A) und aus Peyer'schen Plaques (B) des terminalen Ileums. CD20+CD3- B-Lymphozyten waren deutlich häufiger in Peyer'schen Plaques als in der Lamina propria. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD45+-Leukozyten. Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

In immunhistochemischen Färbungen von Lymphfollikeln (Abbildung 19) verdeutlicht sich die Verteilung der T- und B-Zellen. B-Lymphozyten finden sich im Zentrum der Follikel, wo sie nach Antigenkontakt zu Plasmazellen heranreifen. Entsprechend halten sich T-Lymphozyten hauptsächlich in der Peripherie und in der Umgebung der hochendothelialen Venolen in den Interfollikularregionen auf, in denen sie ihre Funktion als Helfer-Zellen für die B-Zell-Reifung ausüben können (14, 18).

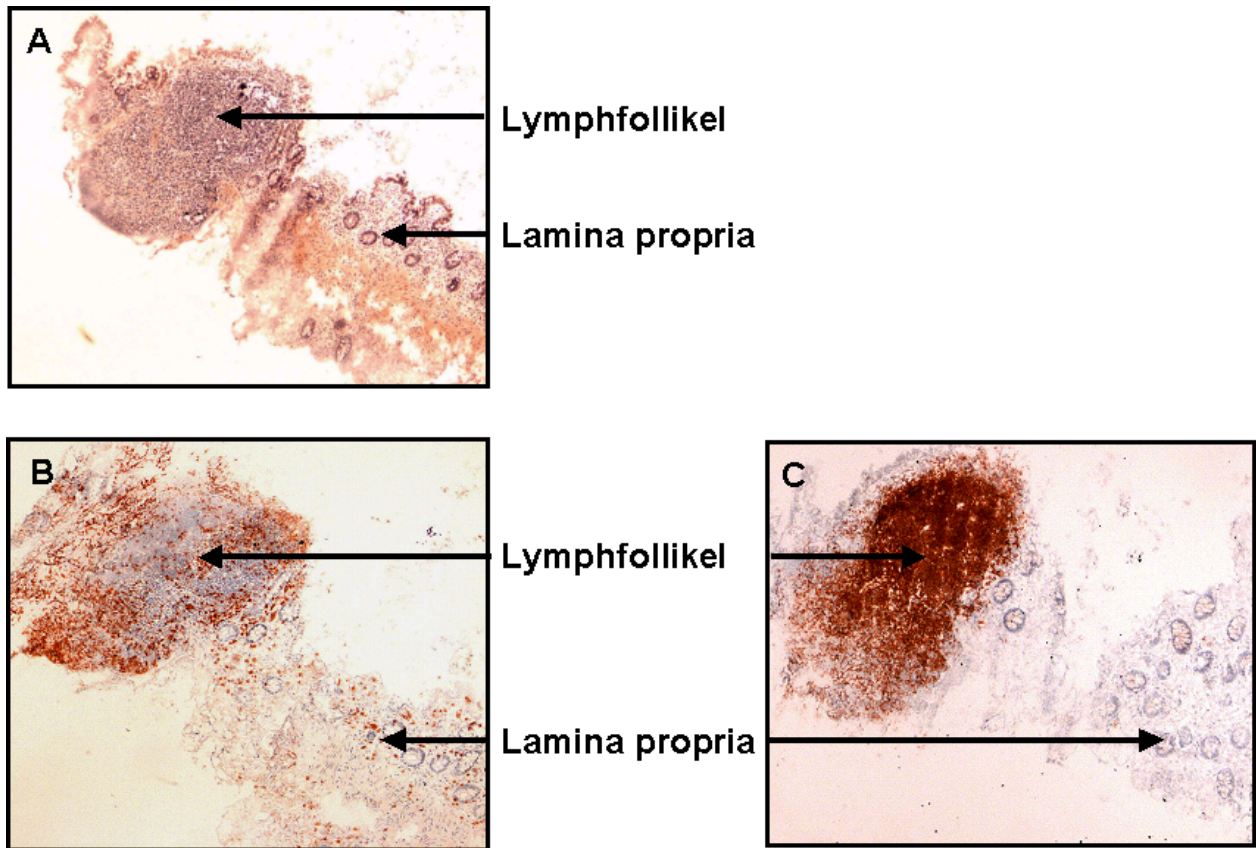


Abbildung 19. HE-Färbung (A) und immunhistochemische Färbungen eines Lymphfollikels des Kolons mit Anti-CD3 (T-Zellen, B) und Anti-L62, einem immunhistochemischen Marker für B-Zellen (C). B-Lymphozyten finden sich im Zentrum des Follikels, T-Lymphozyten in der Peripherie. Es gibt mehr B-Zellen im Follikel als in der Lamina propria, die Zahl der T-Zellen ist in beiden Kompartimenten annähernd gleich. Vergrößerung x30.

3.2.2 Vergleich der mononukleären Zellen aus Ileum und Kolon/Rektum

Beim Vergleich von Ileum und Kolon ergaben sich sowohl für LPL als auch für LFL keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen und dendritischen Zellen. Die Zahl der Makrophagen und dendritischen Zellen belief sich jeweils auf unter 1%. Der prozentuale Anteil der T-, B- und Plasmazellen an den Leukozyten aus Ileum und Kolon kann Tabelle 7 und Abbildung 20 entnommen werden.

Tabelle 7 Prozentualer Anteil der T-, B- und Plasmazellen an den DAPI-negativen, CD45-positiven Leukozyten der Lamina propria und der Lymphfollikel aus Ileum und Kolon/Rektum.

	LPL		LFL	
	Ileum (n=9)	Kolon (n=8)	Ileum (n=9)	Kolon (n=8)
T-Lymphozyten	62% (35-76%)	52% (14-65%)	43% (20-69%)	54% (41-62%)
B-Lymphozyten	37% (10-47%)	17% (10-33%)	45% (24-57%)	34% (18-64%)
Plasmazellen	4% (2-17%)	8% (4-18%)	3% (0-5%)	2% (0-4%)

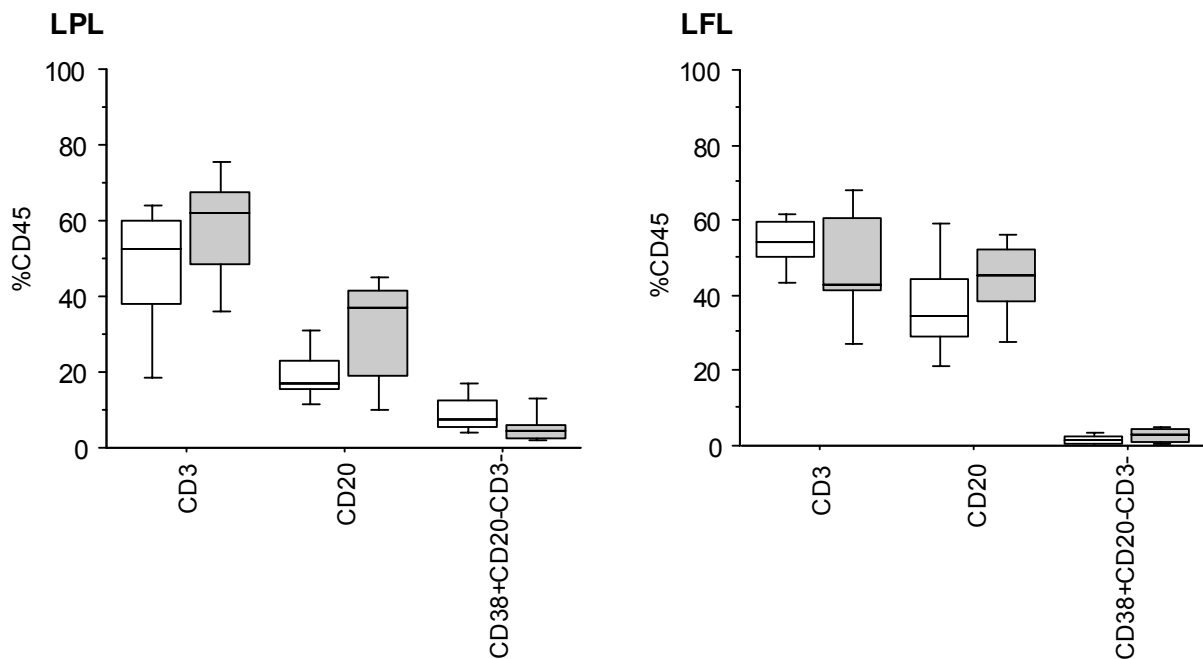


Abbildung 20. Isolierte Leukozyten aus Lamina Propria (LPL) und Lymphfollikeln (LFL) wurden durchflusszytometrisch untersucht und die Daten aus Kolon/Rektum (weiß, [n=8]) und Ileum (grau, [n=9]) verglichen. Dargestellt sind T-Lymphozyten (CD3), B-Lymphozyten (CD20) und Plasmazellen (CD38+CD20-CD3-) als prozentuale Anteile bezogen auf alle CD45+-Leukozyten. Es fanden sich weder für LPL, noch für LFL signifikante Unterschiede zwischen den Darmkompartimenten.

3.3 T-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt untergliedert man Leukozyten in verschiedene Subpopulationen, die sich ihrerseits noch weiter untergliedern und charakterisieren lassen. T-Lymphozyten beispielsweise können ungleiche Aktivierungs- und Differenzierungszustände besitzen. Zu ihren Aufgaben zählt die Produktion diverser Zytokine unterschiedlicher Funktion. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der es möglich ist, die Lymphfollikel-Lymphozyten zu isolieren und somit ihre Zytokin-Produktion analysieren zu können. Bevor man jedoch beginnen konnte, sie funktionell zu charakterisieren, benötigte man genauere Kenntnisse über ihre phänotypischen Merkmale. Hierfür wurden in die Betrachtungen nur CD3-positive Zellen eingeschlossen und als spezifische Oberflächenmarker neben den CD4- und CD8-Rezeptoren, sowie dem $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor, zum einen der Homing-Rezeptor L-Selektin (CD62L) und das Integrin $\alpha E\beta 7$ (CD103), zum anderen Aktivierungsmarker wie CD45RO, CD69 und CD25 untersucht (Tabelle 8). CD25 wird heutzutage nicht nur als Aktivierungsmarker betrachtet, CD25^{high}-positive CD4-Zellen gelten auch als regulatorische T-Zellen (42, 43). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch bei allen durchflusszytometrischen Analysen keine CD25^{high}-positiven T-Lymphozyten, das heißt sehr hell strahlende CD25-positive Zellen, detektiert werden (Abbildung 21).

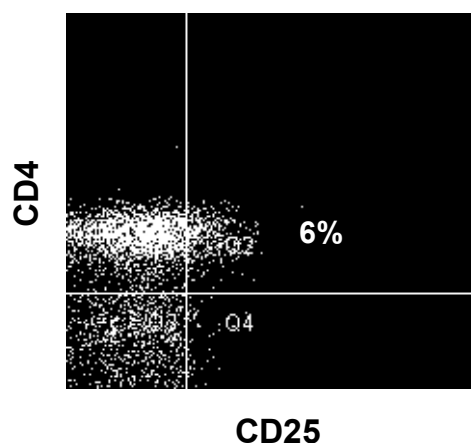


Abbildung 21. Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 auf T-Lymphozyten aus Lymphfollikeln des Kolons. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten, logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 8. Spezifische Oberflächenmarker der T-Lymphozyten.

Oberflächenmarker	Funktion	Exprimierender Zelltyp
CD4	Bindung an MHCII	T-Zellen
CD8	Bindung an MHCI	T-Zellen
$\gamma\delta$ -Rezeptor	Untereinheit des T-Zell-Rezeptors	T-Zellen
CD62L (L-Selektin)	„Homing“ über Bindung an MAdCAM1	Naive T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen
CD103 (α E β 7)	Interaktion mit E-Cadherin	T-Zellen
CD45RO	Aktivierungsmarker, reife T-Zellen	T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten
CD69	Früher Aktivierungsmarker	T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen
CD25	Aktivierungsmarker, regulatorische T-Zellen	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten

3.3.1 Vergleich der T-Lymphozyten aus Lymphfollikeln und Lamina propria

In der vorliegenden Arbeit fand sich in den Lymphfollikeln/ Peyer'schen Plaques eine etwas höhere Zahl an CD4-positiven Zellen und weniger CD8-T-Zellen als in der Lamina propria (Abbildung 22, Abbildung 23).

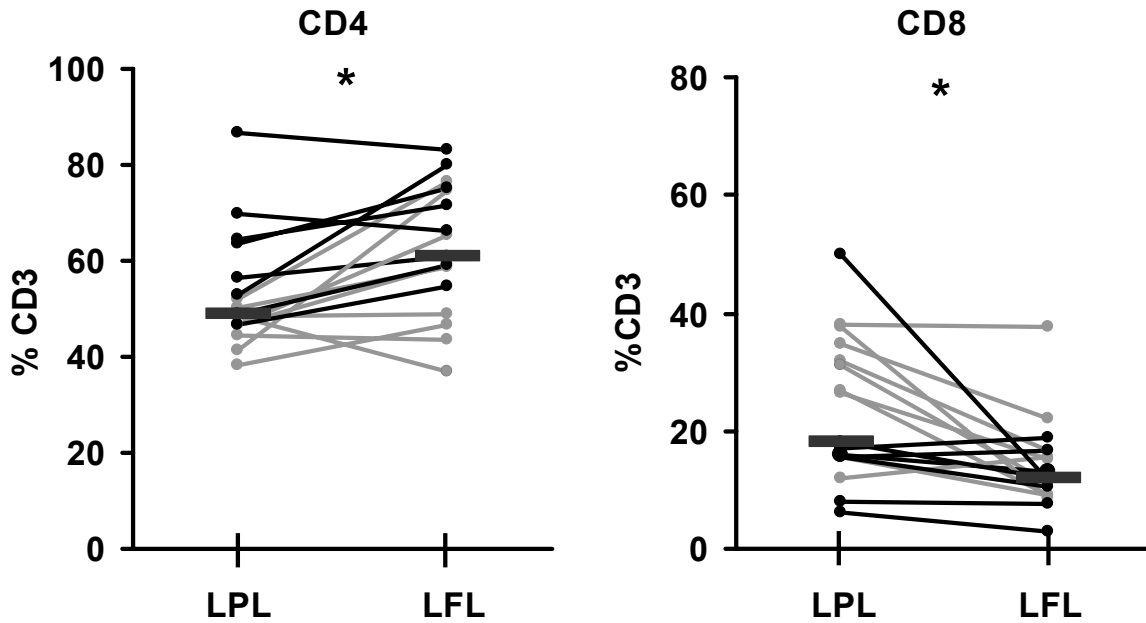


Abbildung 22. Die Leukozyten der Lymphfollikel und der Lamina propria aus Ileum und Kolon/Rektum von insgesamt 17 Patienten wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Beim Vergleich von Lamina-propria-Leukozyten (LPL) und Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) fanden sich mehr CD4-positive T-Zellen und weniger CD8-positive T-Zellen in den Follikeln. Dargestellt sind prozentuale Anteile an allen CD3+-Lymphozyten als Einzelwerte und Mediane. Mediane sind als Balken dargestellt, Werte aus Kolon/Rektum-Präparaten sind schwarz, solche aus Ileum-Präparaten grau gekennzeichnet. * $p < 0,05$

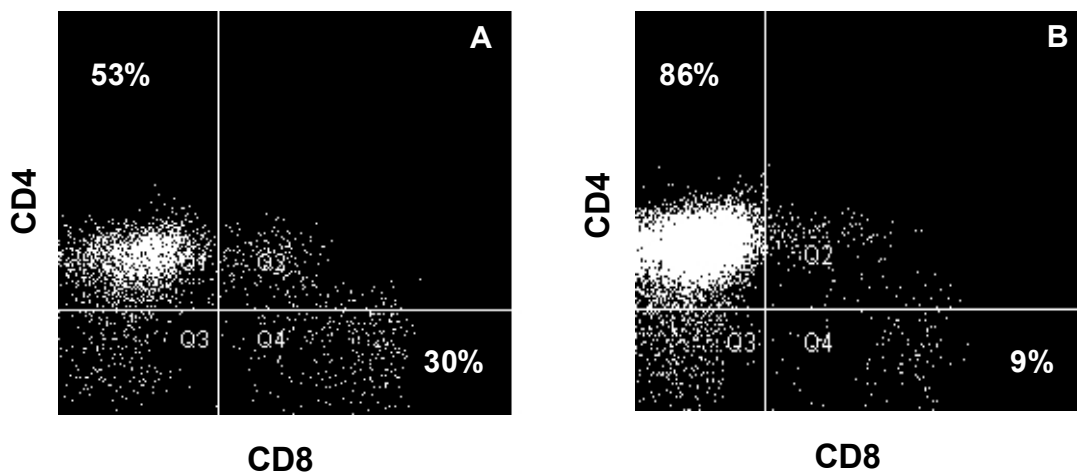


Abbildung 23. Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 auf T-Lymphozyten der Lamina propria (A) und aus Lymphfollikeln (B) des Kolons. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten, logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

Die immunhistochemischen Abbildungen verdeutlichen sowohl die quantitative als auch die lokale Verteilung der CD4-Zellen und der CD8-Zellen in einem Follikel (Abbildung 24).

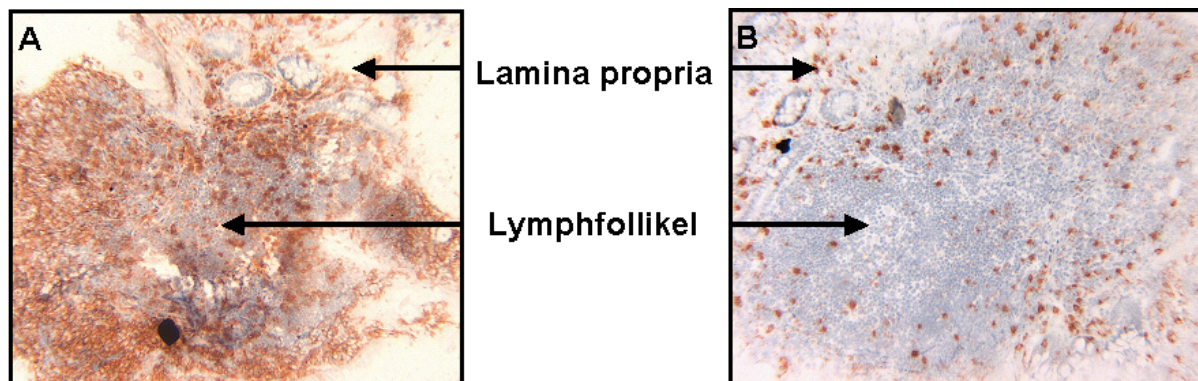


Abbildung 24. Immunhistochemische Färbung eines Lymphfollikels des Kolons mit Anti-CD4 (A) und Anti-CD8 (B). Es finden sich deutlich mehr CD4-T-Zellen in dem Follikel als CD8-T-Zellen. Vergrößerung x100.

Verglichen mit Lamina-propria-Lymphozyten waren signifikant mehr follikuläre Lymphozyten L-Selektin-positiv, und damit naiv (Abbildung 25). Dies galt sowohl für den Anteil an CD3-positiven Lymphozyten, als auch für die Zahl der L-Selektin-positiven CD4-Zellen (7% [1-18%] vs. 5% [0-8%]; $p < 0,05$). Der prozentuale Anteil der $\alpha E\beta 7$ -positiven Zellen an den T-Lymphozyten in den Follikeln beträgt weniger als die Hälfte ihres Anteils an den CD3-Zellen in der Lamina propria (Abbildung 25), wobei sich dieser Unterschied bei der Betrachtung des Anteils der $\alpha E\beta 7$ -positiven Zellen bezogen auf alle CD4-T-Lymphozyten wiederfindet (18% [11-50%] vs. 8% [5-26%]; $p < 0,01$) (Abbildung 26).

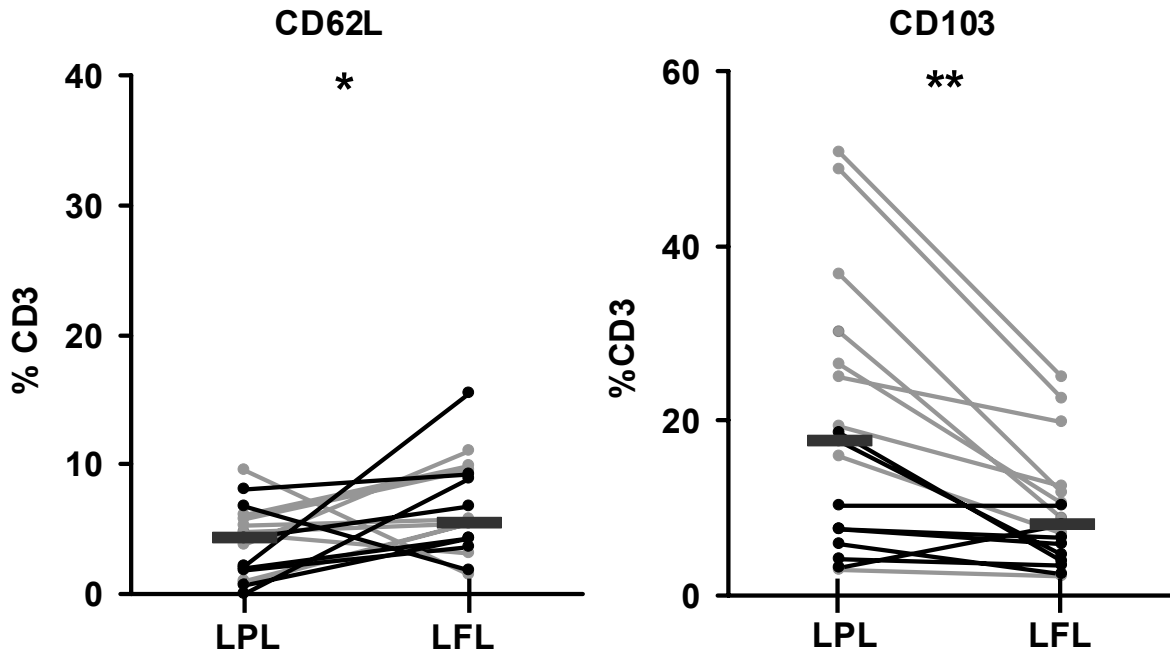


Abbildung 25. Die Leukozyten der Lymphfollikel und der Lamina propria aus Ileum und Kolon/Rektum von insgesamt 17 Patienten wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Es fanden sich in beiden Kompartimenten geringe Anteile naiver T-Zellen (CD62L+), sowie beim Vergleich von Lamina-propria-Leukozyten (LPL) und Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) mehr naive Zellen und weniger CD103+-T-Zellen in den Follikeln. Dargestellt sind prozentuale Anteile an allen CD3+-Lymphozyten als Einzelwerte und Mediane. Mediane sind als Balken dargestellt, Werte aus Kolon/Rektum-Präparaten sind schwarz, solche aus Ileum-Präparaten grau gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

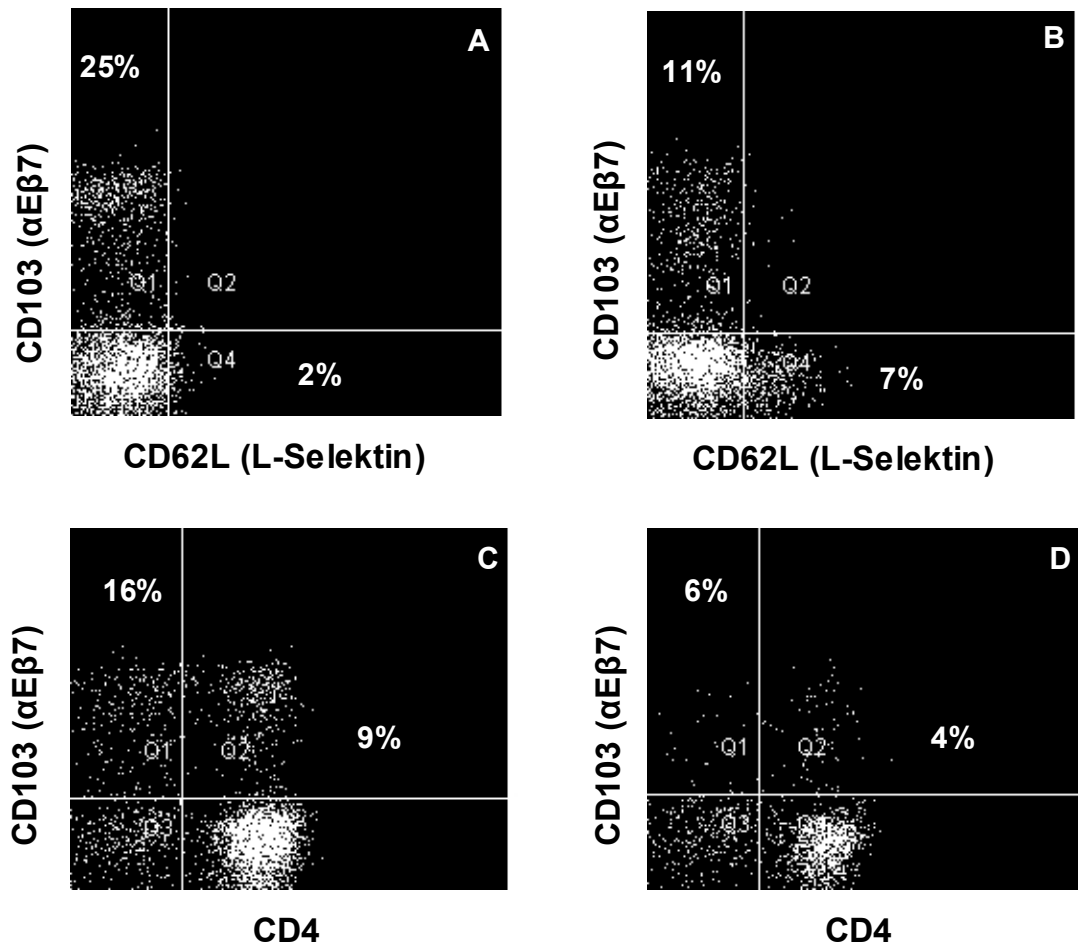


Abbildung 26. Expression der Oberflächenmarker CD103 (αEβ7), CD62L (L-Selektin) (A,B) und CD4 (C,D) auf T-Lymphozyten der Lamina propria (A, C) und aus Lymphfollikeln (B, D) des Kolons. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3⁺-Lymphozyten, logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

Die T-Zellen der Lamina propria sind aktiver, das heißt vermehrt CD69-positiv, als die Zellen in den Follikeln (Abbildung 27), wobei diese stärkere Aktivierung sowohl die CD8-T-Zellen (94% [41-100%] vs. 78% [34-99%]; $p < 0,05$) als auch die CD4-T-Zellen (89% [18-100%] vs. 64% [20-93%]; $p < 0,05$) der Lamina propria betrifft (Abbildung 28). In der Zahl der CD45RO-positiven T-Zellen gab es weder für CD4-Zellen noch für CD8-Zellen signifikante Unterschiede zwischen Lymphfollikeln und Lamina propria (Abbildung 27, Abbildung 29). Auch die Anzahl der T-Lymphozyten mit $\gamma\delta$ -Rezeptor und der prozentuale Anteil an CD25-positiven Zellen waren für Lamina propria und Lymphfollikel/Peyer'sche Plaques gleich (Tabelle 9).

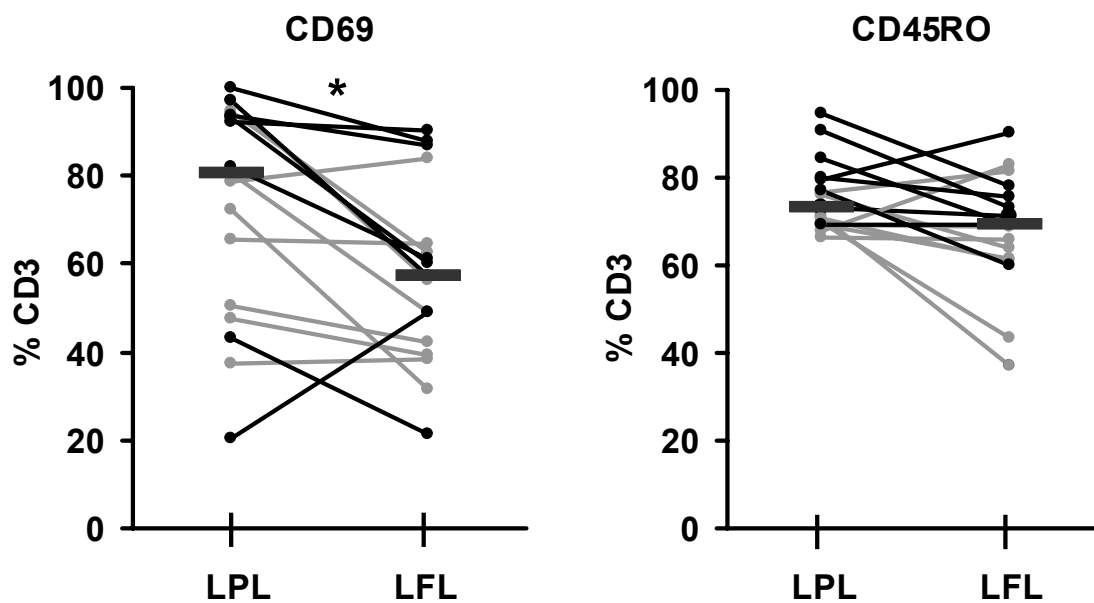


Abbildung 27. Die Leukozyten der Lymphfollikel und der Lamina propria aus Ileum und Kolon/Rektum von insgesamt 17 Patienten wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Es fanden sich hohe Anteile aktivierter T-Zellen (CD69+, CD45RO+) in beiden Kompartimenten, sowie beim Vergleich von Lamina-propria-Leukozyten (LPL) und Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) mehr CD69+-T-Zellen in der Lamina propria. Dargestellt sind prozentuale Anteile an allen CD3+-Lymphozyten als Einzelwerte und Mediane. Mediane sind als Balken dargestellt, Werte aus Kolon/Rektum-Präparaten sind schwarz, solche aus Ileum-Präparaten grau gekennzeichnet. * $p < 0,05$

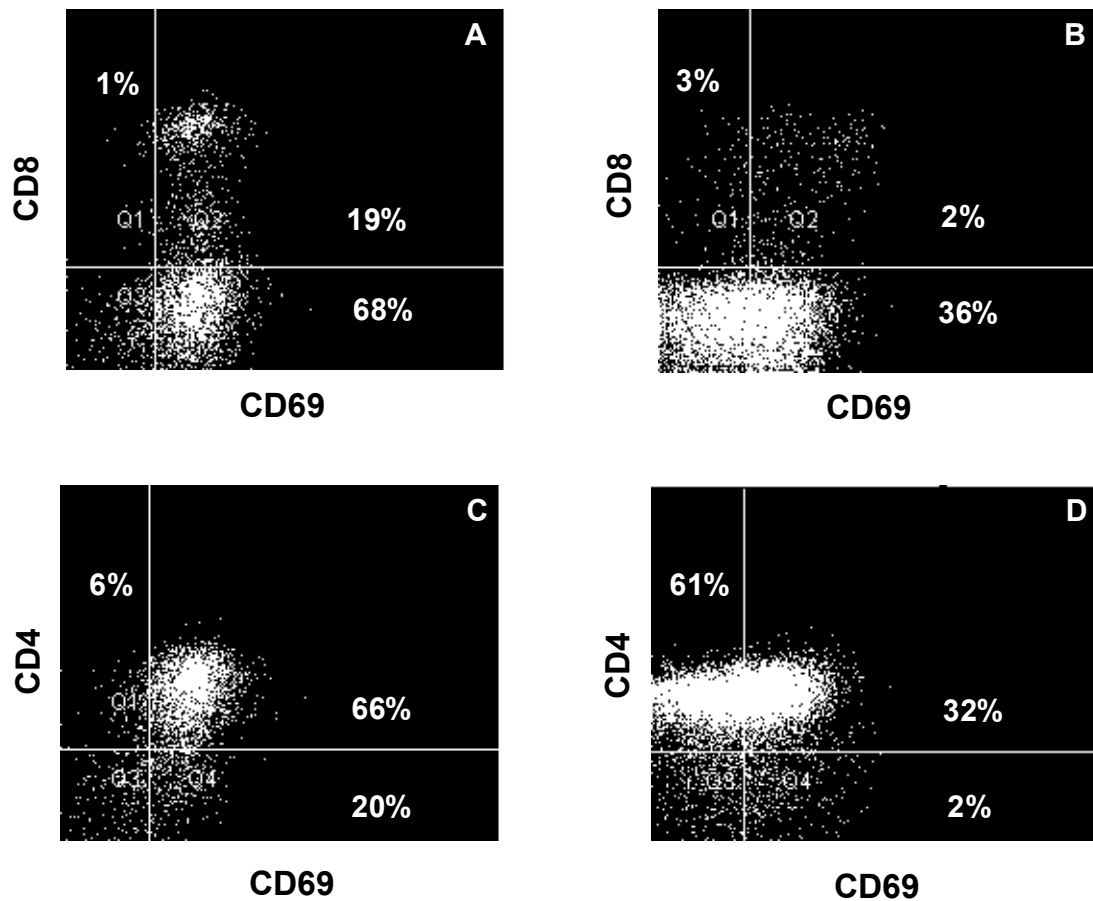


Abbildung 28. Expression der Oberflächenmarker CD69, CD8 (A,B) und CD4 (C,D) auf T-Lymphozyten der Lamina propria (A,C) und aus Lymphfollikeln (B,D) des Kolons. Es gab sowohl mehr CD8+CD69+-T-Zellen, als auch CD4+CD69+-T-Zellen in der Lamina propria. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten, logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

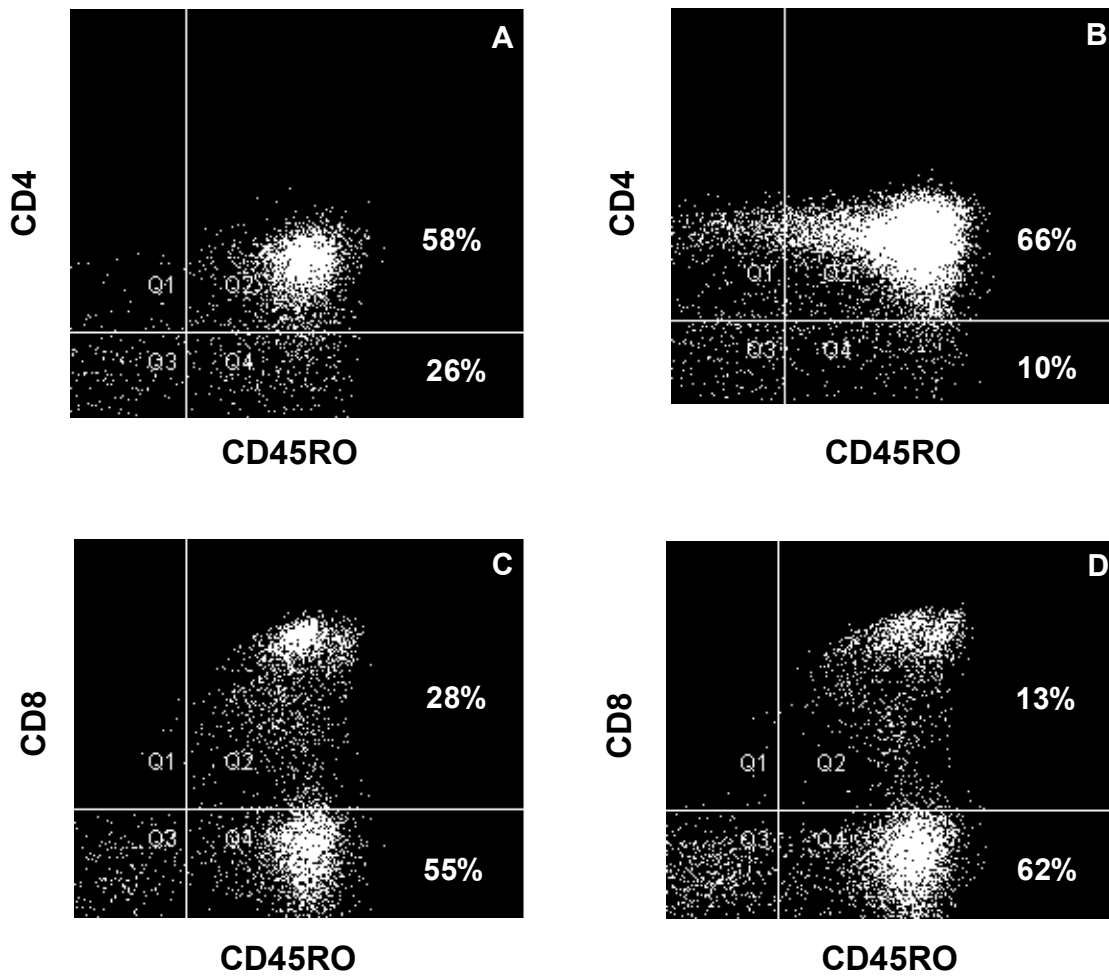


Abbildung 29. Expression der Oberflächenmarker CD45RO, CD4 (A,B) und CD8 (C,D) auf T-Lymphozyten der Lamina propria (A,C) und aus Lymphfollikeln (B,D) des Kolons. Es gab weder im Anteil der CD4+CD45RO+/-, noch im Anteil der CD8+CD45RO+-T-Zellen signifikante Unterschiede zwischen Lymphfollikeln und Lamina propria. Prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten, logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 9. Prozentualer Anteil der Lymphozyten mit spezifischen Oberflächenmarkern an allen CD3-positiven Lymphozyten der Lamina propria (LPL) und der Lymphfollikel (LFL).

	LPL (n=17)	LFL (n=17)	Signifikanz
CD4	49% (38-87%)*	61% (37-83%)	p<0,01
CD8	18% (6-50%)	12% (3-38%)	p<0,01
$\gamma\delta$ -Rezeptor	3% (0-14%)	1% (0-6%)	n.s.
CD62L (L-Selektin)	4% (0-10%)	6% (2-16%)	p<0,05
CD103 ($\alpha E\beta 7$)	28% (3-51%)	12% (2-25%)	p<0,01
CD69	81% (20-100%)	57% (21-90%)	p<0,01
CD45RO	73% (66-95%)	69% (37-90%)	n.s.
CD25	8% (3-35%)	8% (2-20%)	n.s.

*Die Daten von Ileum und Kolon wurden gepoolt, n.s.= nicht signifikant.

3.3.2 Vergleich der T-Lymphozyten aus Ileum und Kolon/Rektum

3.3.2.1 Lymphfollikel-Lymphozyten

Verglich man die T-Lymphozyten der Peyer'schen Plaques/Lymphfollikel von Ileum und Kolon/Rektum, so fanden sich insgesamt kaum Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Zellen. So gab es eine gleich hohe Zahl an CD4-positiven T-Zellen und CD8-positiven T-Zellen, sowie keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Homing-Rezeptors L-Selektin und des $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptors, deren Anteile in beiden Kompartimenten unter 10% betragen. Unter den T-Lymphozyten des Ileums fanden sich jedoch ungefähr doppelt so viele $\alpha E\beta 7$ -positive Zellen als unter denen des Kolons (Abbildung 30). Die beschriebene Verteilung galt auch bezogen auf alle CD4-positiven T-Zellen, unter denen es im Ileum mit 12% (7-25%) signifikant mehr $\alpha E\beta 7$ -positive Zellen als im Kolon mit 4% (2-10%; p<0,01) gab.

Des weiteren gab es in beiden Kompartimenten eine gleich hohe Zahl an CD45RO-positiven T-Zellen und CD25-positiven T-Zellen. In den Peyer'schen Plaques des Ileums fanden sich im Vergleich zum Kolon etwas weniger aktivierte, das heißt CD69-positive Lymphozyten (Abbildung 30). Der Unterschied im Aktivierungszustand betraf sowohl den Anteil an CD3-positiven T-Zellen, als auch den Anteil an CD4-T-Zellen (43% [20-83%] vs. 72% [48-93%]; $p < 0,05$). Die Zahl der aktivierten CD8-T-Zellen war in Ileum und Kolon gleich hoch (71% [34-99%] vs. 87% [71-98%]) (Tabelle 10).

Tabelle 10. Prozentualer Anteil der Lymphozyten mit spezifischen Oberflächenmarkern an allen CD3-positiven Lymphozyten der Lymphfollikel aus Ileum und Kolon/Rektum.

	Ileum (n=9)	Kolon (n=8)	Signifikanz
CD4	59% (37-77%)	69% (55-83%)	n.s.*
CD8	13% (9-38%)	12% (3-19%)	n.s.
$\gamma\delta$ -Rezeptor	1% (0-3%)	3% (0-6%)	n.s.
CD62L (L-Selektin)	6% (3-11%)	6% (3-16%)	n.s.
CD103 ($\alpha E\beta 7$)	15% (11-26%)	8% (5-19%)	$p < 0,01$
CD69	42% (21-84%)	62% (49-90%)	$p < 0,05$
CD45RO	66% (37-83%)	71% (60-90%)	n.s.
CD25	8% (5-20%)	10% (2-14%)	n.s.

*n.s.=nicht signifikant

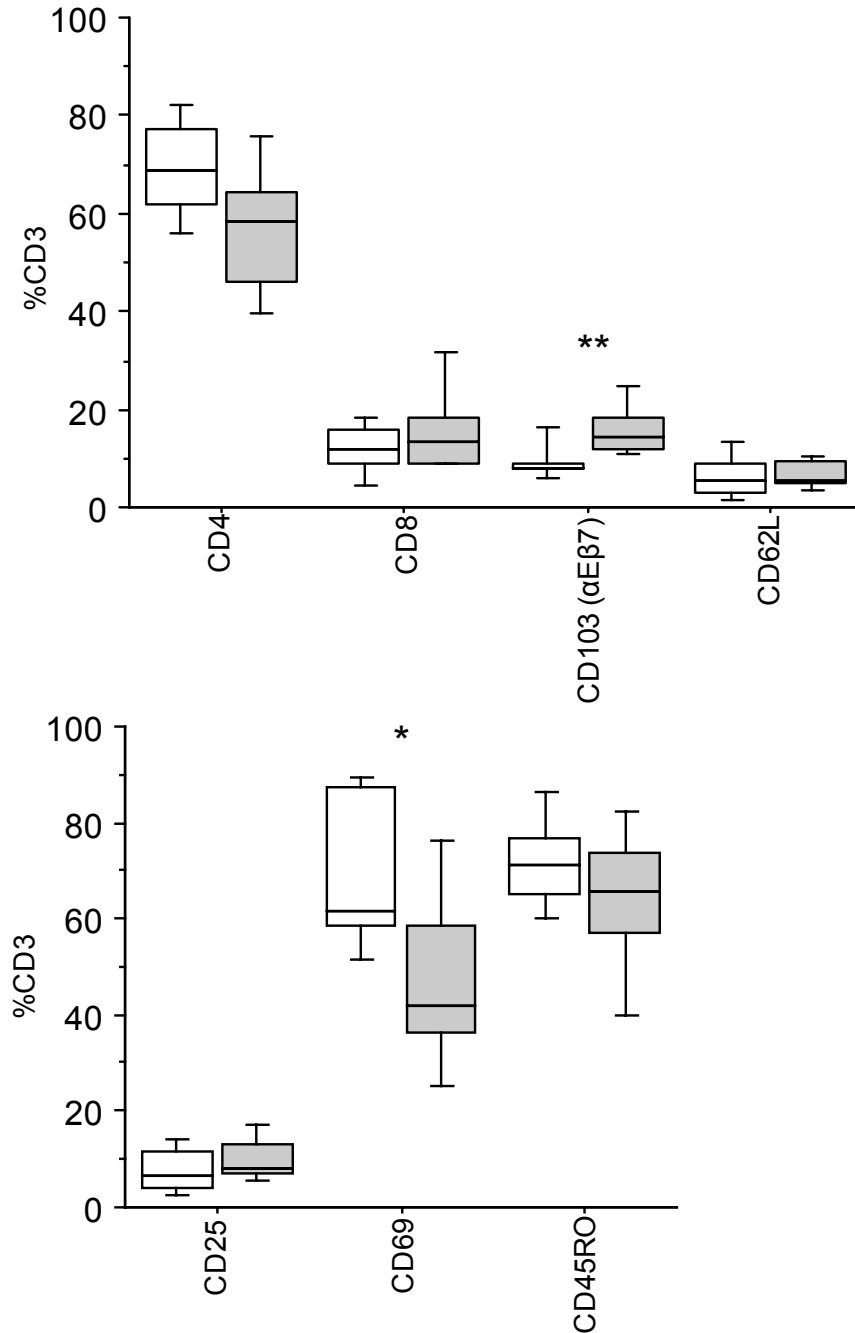


Abbildung 30. Isolierte Leukozyten aus Lymphfollikeln (LFL) wurden durchflusszytometrisch untersucht und die Daten aus Kolon/Rektum (weiß, [n=8]) und Ileum (grau, [n=9]) verglichen. Dargestellt sind ausgewählte T-Zell-Subpopulationen (CD4, CD8, CD103, CD62L) und Aktivierungsmarker (CD25, CD69, CD45RO) der LFL als prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten. **p<0,01, *p<0,05

3.3.2.2 *Lamina-propria-Lymphozyten*

Bei der Betrachtung der T-Lymphozyten der Lamina propria fiel auf, dass die T-Zellen sich in ihrer Grundzusammensetzung leicht unterschieden. So gab es im Ileum weniger CD4-T-Zellen und dafür mehr CD8-T-Zellen als im Kolon. Weiterhin fand man einen fast doppelt so hohen Anteil an $\alpha E\beta 7$ -positiven Zellen im Ileum im Vergleich zum Kolon, sowohl bezogen auf CD3-Zellen, als auch auf CD4-positive T-Lymphozyten (27% [8-51%] vs. 7% [3-19%]; $p < 0,01$). Die Zahl der $\gamma\delta$ - und der CD62L-positiven Lymphozyten lag auch in der Lamina propria aus Ileum und Kolon jeweils unter 10%, ohne Unterschiede zwischen beiden Kompartimenten (Abbildung 31). In der Lamina propria des Ileums waren zwar über die Hälfte aller T-Zellen CD45RO-positiv, trotzdem waren dies aber immer noch weniger als im Kolon. Auch bezüglich der CD69-positiven Lymphozyten fanden sich Unterschiede dahingehend, dass die Lamina propria des Kolons wesentlich mehr aktivierte CD3-positive Zellen enthielt als die des Ileums. Bei den CD4-positiven Zellen ergab sich mit 96% (18-100%) aktivierten CD4-Zellen im Kolon verglichen mit 57% (27-98%) im Ileum ein ähnliches Bild ($p < 0,05$). Wie schon in den Follikeln, gab es auch in der Lamina propria keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der aktivierten CD8-positiven Zellen und der CD25-positiven T-Zellen (Abbildung 31, Tabelle 11).

Tabelle 11. Prozentualer Anteil der Lymphozyten mit spezifischen Oberflächenmarkern an allen CD3-positiven Lymphozyten der Lamina propria aus Ileum (n=9) und Kolon/Rektum (n=8).

	Ileum (n=9)	Kolon (n=8)	Signifikanz
CD4	48% (38-57%)	58% (47-87%)	p<0,05
CD8	31% (16-38%)	17% (6-50%)	p<0,05
γδ-Rezeptor	3% (1-14%)	2% (0-7%)	n.s.*
CD62L (L-Selektin)	5% (1-6%)	3% (0-10%)	n.s.
CD103 (αEβ7)	35% (20-50%)	18% (11-39%)	p<0,05
CD69	65% (37-97%)	94% (20-100%)	p<0,05
CD45RO	70% (66-77%)	80% (69-95%)	p<0,05
CD25	7% (3-35%)	8% (3-16%)	n.s.

*n.s.=nicht signifikant.

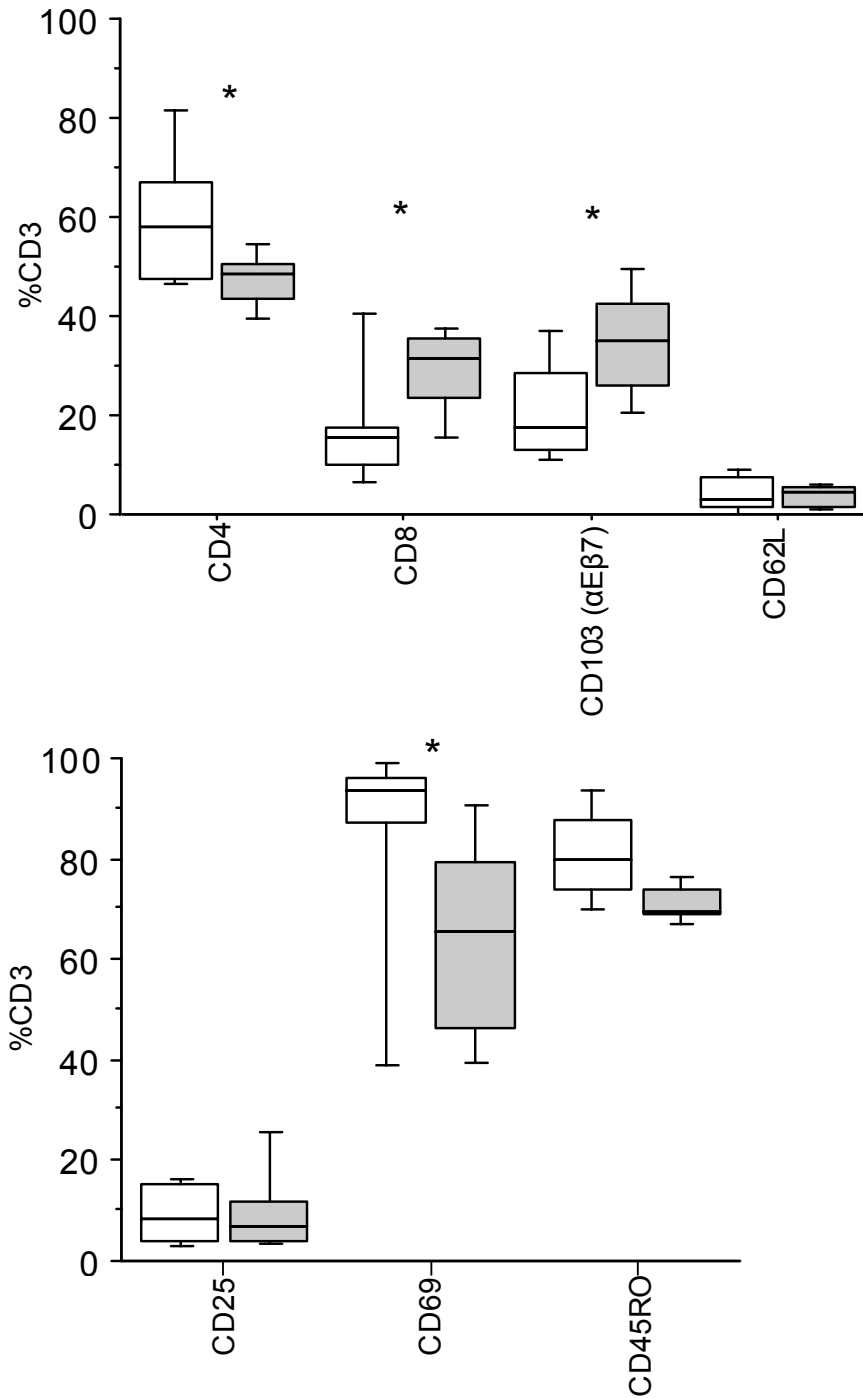


Abbildung 31. Isolierte Leukozyten aus der Lamina propria (LPL) wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Daten aus Kolon/Rektum (weiß, [n=8]) und Ileum (grau, [n=9]) verglichen. Dargestellt sind ausgewählte T-Lymphozyten-Subpopulationen (CD4, CD8, CD103, CD62L) und Aktivierungsmarker (CD25, CD69, CD45RO) der LPL als prozentuale Anteile bezogen auf alle CD3+-Lymphozyten. *p<0,05