

## 4 Diskussion

Die Induktion mukosaler Immunreaktionen findet nach gegenwärtiger Auffassung präferentiell im organisierten lymphatischen Gewebe der Darmschleimhaut, das heißt den Peyer'schen Plaques und mukosalen Lymphfollikeln statt. Der Großteil der Kenntnisse über die Entwicklung und Funktion der Peyer'schen Plaques stammt jedoch aus Experimenten an Maus-Modellen. Die wenigen Studien, welche die Struktur und Funktion menschlicher Peyer'scher Plaques untersucht haben, fanden beachtliche Unterschiede (48). Zum einen findet sich die größte Dichte an Peyer'schen Plaques beim Menschen im Ileum, bei der Maus verteilen sie sich über den gesamten Dünndarm (16, 47), zum anderen entwickeln sich die Peyer'schen Plaques beim Menschen pränatal, während bei der Maus die Entwicklung postnatal unterstützt durch die Anwesenheit von luminalen Mikroorganismen beendet wird (48, 49). Bei Kindern wird die Immunantwort isolierter Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques auf Nahrungsmittelproteine wie  $\beta$ -Laktoglobulin von Th1-Zytokinen dominiert, wohingegen sich bei der Maus Th2- oder Th3-Antworten zeigten (52). Das bedeutet, dass sich die Daten der Maus-Modelle nur mit Vorbehalten auf den Menschen übertragen lassen. Da Peyer'sche Plaques oder Lymphfollikel bei Erwachsenen jedoch endoskopisch nicht zu sehen sind, war eine Isolation und Charakterisierung menschlicher intestinaler Lymphozyten bislang nur in Einzelfallstudien möglich (54, 55). In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zur Identifizierung und Gewinnung von Peyer'schen Plaques bzw. Lymphfollikeln aus dem menschlichen Darm und zur Isolation vitaler Immunzellen etabliert werden, die eine spätere phänotypische und funktionelle Analyse der Lymphozyten möglich macht.

### 4.1 Identifizierung der Peyer'schen Plaques/Lymphfollikel und Zellisolation

Bei Kindern ist es während einer endoskopischen Untersuchung des Darmes möglich, die sichtbaren Peyer'schen Plaques in den letzten Zentimetern des terminalen Ileums gezielt zu biopsieren (51). Diese Möglichkeit bietet sich bei Erwachsenen nicht, so dass selbst die wenigen Studien zur Funktion humaner Peyer'scher Plaques (51, 52, 60) Studien an kindlichem Material sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die blind entnommenen Biopsien aus dem terminalen Ileum Erwachsener unter einem Stereomikroskop untersucht und rundliche

zottenfreie Areale als Peyer'sche Plaques identifiziert. Auch in mit Methylenblau eingefärbten OP-Präparaten des Kolons und Rektums konnten solitäre mukosale Lymphfollikel entdeckt werden. Sie stellten sich als runde, von einem dunklen Randsaum umgebene Strukturen dar, die das normale Kryptenmuster unterbrachen. Diese Areale konnten unter mikroskopischer Sicht sauber vom umgebenden Gewebe getrennt werden, so dass eine Isolation von reinen Follikelzellen möglich war. Die mediane Zellzahl pro Peyer'schem Plaque (75000 Zellen) unterschied sich kaum von der der Kolon-Follikel (67000 pro Follikel). Dies zeigt, dass aufgrund der limitierten Größe der Biopsiezange nur ein Teil eines Peyer'schen Plaques entnommen werden kann. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass Peyer'sche Plaques meist 1-2cm breit und 1-4 cm lang sind, wobei sie auch viel größere Ausmaße annehmen können, und Biopsien im Schnitt eine Länge von wenigen Millimetern haben. Durch die limitierte Größe der Biopsien und Resektate, sowie die nachfolgende eng begrenzte Exzision der Follikel bedingt sich die für konventionelle FACS-Analysen sehr niedrige Gesamtzellzahl. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, die eine ausführliche phänotypische Analyse der Lymphozyten trotz der geringen Zellzahlen gestattete. Dazu wurden durchflusszytometrische 8-fach Färbungen durchgeführt.

Die relativ hohe Zahl an Biopsien, in denen sich keine Plaques fanden, ließ sich nicht auf einen speziellen Grund zurückführen. Es konnten keine Zuordnungen zu einem bestimmten Alter oder Geschlecht festgestellt werden. Auffällig war einzig eine zeitliche Häufung der Fälle. Eine eventuell veränderte Abnahmetechnik, wie zum Beispiel die Abnahme der Biopsien nur aus mesenterialen Bereichen, kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Des weiteren mussten sehr viel weniger Resektate aufgrund fehlender Follikel verworfen werden. Dies lag zum einen daran, dass sich die Follikel im Kolon/Rektum gleichmäßiger verteilen und keine größeren Follikel-freien Areale wie zwischen Peyer'schen Plaques entstehen (17). Dadurch trifft man in jedem Abschnitt des Kolons mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit auf Follikel. Außerdem waren die Gewebestücke aus dem Dickdarm im Vergleich zu Biopsien größer. Der Größenunterschied könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass sich im Kolon/Rektum wesentlich häufiger mehr als zwei Follikel fanden, worauf auch die geringere Zahl an Zellausbeuten unter 100000 Zellen zurückzuführen ist.

Es konnten in dieser Arbeit keine Faktoren gefunden werden, die die Ausbeute an Peyer'schen Plaques oder Lymphfollikeln beeinflussen: Die Anzahl der Biopsien oder die Größe des Resektatstückes korrelierten weder mit der Zahl an Follikeln, noch mit der Zahl isolierter Zellen. Lediglich ab einer Biopsiezahl von acht Stück konnte eine signifikante Steigerung der pro Patient gefundenen Peyer'schen Plaques festgestellt werden. Des Weiteren gab es keine Zusammenhänge zwischen der pro cm<sup>2</sup> Resektat präparierten Zahl an Lymphfollikeln und dem Alter oder Geschlecht der Patienten. Gleiches galt für die Zahl an Follikeln, die pro Biopsie isoliert werden konnten.

Im Gegensatz zu der Annahme, dass es mit steigendem Alter zu einer Abnahme der Zellen in den Follikeln kommt (61), konnte in der vorliegenden Arbeit weder für Follikel aus Peyer'schen Plaques noch für Kolonfollikel ein statistischer Zusammenhang zwischen Alter und Anzahl der pro Follikel isolierten Zellen festgestellt werden. Dennoch bewegten sich die Zellzahlen bei Patienten über 65 Jahren stets in einem Bereich von unter 100000 Zellen pro Follikel.

Es scheint daher für eine gute Ausbeute an Follikeln sinnvoll zu sein, mindestens acht Biopsien zu entnehmen und zu untersuchen. Die Größe des Resektatstückes, sowie das Alter und Geschlecht der Patienten spielten bezüglich der Follikelausbeute in dieser Arbeit keine Rolle. Es ist im Gegenteil möglich, auch aus kleinen Resektatstücken eine ausreichende Anzahl an Lymphfollikelzellen zu isolieren.

## **4.2 Zellpopulation**

### **4.2.1 Isolierte mononukleäre Zellen**

Die intestinale Mukosa enthält ein hochspezialisiertes Immunsystem (GALT), welches aus induktiven und efferenten Kompartimenten besteht. Die induktive Seite ist das organisierte lymphatische Gewebe, das heißt die Peyer'schen Plaques im Ileum, die Follikel im Dickdarm und die mesenterialen Lymphknoten. Bei den mesenterialen Lymphknoten handelt es sich um Kreuzungswege zwischen den peripheren und mukosalen Rezirkulationswegen der Lymphozyten (14). Sie liegen hauptsächlich im Mesenterium des Darmes und sind den Follikeln im Lymphsystem nachgeschaltet. Ihre Funktion und Entwicklung ist bereits relativ gut erforscht (14) und nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Lamina propria bildet zusammen mit intraepithelialen Lymphozyten die efferente Seite des Immunsystems. Hier findet

man eine große heterogene Gruppe von Leukozyten, bestehend aus Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen (15). Das organisierte lymphatische Gewebe besteht aus Ansammlungen von T- und B-Lymphozyten, sowie ebenfalls dendritischen Zellen und Makrophagen (18). In dieser Arbeit wurden aufgrund der verwendeten Isolationsmethode nur mononukleäre Zellen isoliert. Hierbei handelte es sich um T- Zellen, B-Zellen und Plasmazellen, so dass die isolierte Zellpopulation weitestgehend der Zusammensetzung der mononukleären Zellen in Lamina propria und Lymphfollikeln entsprach. Eine adäquate Zahl von dendritischen Zellen und Makrophagen aus Darmgewebe zu isolieren ist sehr schwierig. Daher werden in den meisten Studien immunhistologische und immunhistochemische Techniken zur Charakterisierung dieser Zellen verwendet (18, 62). Bei den dendritischen Zellen handelt es sich um eine relativ heterogene Gruppe, deren Frequenz im Gewebe gering ist, und die stark an Oberflächen adhäriert (63). Die intestinalen Makrophagen differieren bezüglich ihrer Oberflächenmarker von den Blutmonozyten oder Makrophagen anderer Gewebe. So exprimieren sie keinen der typischen Makrophagen/Monozyten-Marker wie CD14 oder CD11b (10). Daher wurde hier zum einen auf CD33 als spezifischen Marker für intestinale Makrophagen zurückgegriffen (11), zum anderen HLA-DR als Kontrolle für Antigen-präsentierende Zellen mitgefärbt. Beide Marker lieferten das gleiche Ergebnis von unter 1% enthaltenen Makrophagen. Ein großer Teil der CD33-positiven Makrophagen exprimiert jedoch kein oder sehr wenig HLA-DR (11), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich in der isolierten Zellpopulation CD33- und HLA-DR-negative Makrophagen mit unbekannter Oberflächenstruktur befanden.

#### **4.2.2 Unterschiede zwischen LFL und LPL**

Die Verteilung von B- und T-Zellen im lymphatischen Gewebe erfolgt in allen Organen auf ähnliche Weise. Die B-Lymphozyten sind in den Follikeln organisiert, während sich die T-Zellen eher unregelmäßig in den paracorticalen Bereichen aufhalten. Diese Art der Organisation unterstützt die Wechselwirkungen zwischen B-Zellen, T-Zellen und Antigenen. Peyer'sche Plaques sind hoch-organisierte Aggregate aus mehreren B-Zell-Follikeln mit interfollikulären T-Zell-Zonen (16, 21). Entsprechend der oben erwähnten Struktur des lymphatischen Gewebes fanden sich in dieser Arbeit erwartungsgemäß mehr B-Lymphozyten in den Peyer'schen Plaques

und Lymphfollikeln als in der Lamina propria. Dass die Lymphfollikel nur zu 42% aus B-Lymphozyten bestehen, erscheint zunächst etwas überraschend, zumal ihr Anteil bei Mäusen mit 60-75% (64, 65) deutlich höher liegt. Es gibt jedoch ähnliche Daten für Peyer'sche Plaques von Kindern (51) und Erwachsenen (54). Ein Grund hierfür mag eine differierende Antigen-Stimulation über das Darmlumen zwischen Maus und Mensch sein (51). Einige B-Zell-Follikel enthalten Keimzentren, in denen die B-Zellen stark proliferieren und sich zu Zentrozyten und Zentroblasten entwickeln, nachdem sie ihrem spezifischen Antigen und T-Helfer-Zellen begegnet sind (66). Nach der Aktivierung sind weitere Signale zur Entwicklung zu Plasmazellen notwendig. Diese Signale erhalten die Plasmazell-Vorstufen auf ihrer Wanderung über die mesenterialen Lymphknoten und den peripheren Blutstrom in die Lamina propria. In der Lamina propria erfolgt dann die endgültige Differenzierung zu hauptsächlich IgA-produzierenden Plasmazellen (3, 22, 67). Daher ist von einer weit höheren Anzahl an Plasmazellen in der Lamina propria im Vergleich zu Lymphfollikeln auszugehen. Bei Kindern finden sich weniger als 1% Plasmazellen in den Peyer'schen Plaques im Gegensatz zu bis zu 30% IgA-produzierenden mononukleären Zellen in der Lamina propria (51). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse decken sich in bezug auf die Zahl der Plasmazellen in den Follikeln mit den oben genannten Arbeiten. Die geringe Anzahl von 5% Plasmazellen in der Lamina propria lässt sich durch die Definition von Plasmazellen als CD38+CD20-CD3- erklären. Die Expression von CD38 ist zwar durch Untersuchungen von unterschiedlichen Geweben für alle Plasmazellen sicher (2), die Zellen verlieren jedoch erst im Laufe der Differenzierung das Oberflächenmolekül CD20 (68, 69). Dadurch ist nicht auszuschließen, dass einige Plasmazellen noch geringe Mengen an CD20 exprimierten, wie es beispielsweise auch in Tonsillen der Fall ist (70), und somit als leicht-positiv nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

Insgesamt belegen die gefundenen Unterschiede bezüglich der B-Lymphozyten und Plasmazellen eine gezielte und saubere Präparation der Follikel und Peyer'schen Plaques.

### **4.3 Phänotyp der T-Lymphozyten**

#### **4.3.1 T-Zell-Rezeptor und Ko-Rezeptoren**

T-Lymphozyten sind im Gegensatz zu B-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. Sie erfüllen ihre Aufgaben ebenso in den Follikeln, wie auch in der Lamina propria. Daher verteilen sich die T-Zellen gleichmäßig zwischen Lamina propria und Lymphfollikeln, wie es sowohl in dieser Arbeit, als auch bei der Untersuchung kindlicher Peyer'scher Plaques beschrieben wurde (51). Die Population der detektierten T-Lymphozyten bestand aus CD4- und CD8-Zellen, wobei der Hauptanteil aller T-Zellen in Follikeln und Lamina propria CD4-positiv war. Diese Zusammensetzung entspricht dem bekannten CD4/CD8-Verhältnis in der Lamina propria und im Blut (71). Die differenzierten Effektorzellen nehmen je nach exprimiertem Ko-Rezeptor und lokalem Kompartiment verschiedene Funktionen wahr. So findet der Kontakt mit Antigenen, beispielsweise aus Nahrungsbestandteilen, hauptsächlich in den Lymphfollikeln statt (44). Die vermehrte Ansammlung CD4-positiver T-Zellen in den Follikeln gegenüber der Lamina propria könnte daher Hinweis für spezifische Aufgaben der T-Zellen in diesem Kompartiment, zum Beispiel im Rahmen der oralen Toleranz sein. Für genauere Aussagen bedarf es jedoch funktioneller Untersuchungen, da die unterschiedlichen Effektorsubpopulationen der CD4-Zellen nur durch ihr sezerniertes Zytokinmuster unterschieden werden können. Während zum Beispiel  $T_H1$ -Zellen über Sekretion von Interferon  $\gamma$  und Interleukin 12 zelluläre Abwehrmechanismen durch Aktivierung von Makrophagen stimulieren, induzieren  $T_H2$ -Zellen über Sekretion von Interleukin-4, -5 und -13 primär humorale Immunantworten (33, 36). Der CD8-Ko-Rezeptor befindet sich vor allem auf zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie kontrollieren Infektionen mit Viren oder anderen Mikroorganismen, die einen intrazellulären Vermehrungszyklus besitzen, indem sie infizierte Zellen durch lytische Enzyme abtöten (37). Für diese Effektorfunktion ist es entscheidend, dass die aktivierten Zellen in die Lamina propria migrieren, was durch die höhere Zahl an CD8-T-Zellen in der Lamina propria im Vergleich zu den Follikeln in dieser Arbeit bestätigt wurde.

#### **4.3.2 Reife- und Aktivierungsmarker**

Zum Auslösen einer Immunantwort im Darm müssen zunächst luminale Antigene über spezialisierte Epithelzellen, die sogenannten M-Zellen, in die Peyer'schen

Plaques und Lymphfollikel transportiert werden. Im Gegensatz zu normalen Epithelzellen haben diese einen gering ausgebildeten Bürstensaum, reduzierte enzymatische Kapazität und eine ausgeprägte Fähigkeit, endozytotische Vesikel zu bilden (19). Die Antigene werden von dendritischen Zellen oder Makrophagen als Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und den Lymphozyten in den Follikeln präsentiert (72). Lymphozyten, die noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten, werden als naiv bezeichnet. Naive T-Zellen sind durch spezielle Oberflächenmarker gekennzeichnet, so exprimieren sie L-Selektin, ein C-Typ calcium-abhängiges Lektin der Selektin-Familie, und CD45RA (29, 73, 74). Diese naiven Zellen gelangen aus dem peripheren Blut in die Peyer'schen Plaques oder mukosalen Lymphfollikel, indem L-Selektin an MAdCAM-1 auf den hochendothelialen Venolen der Follikel bindet und so den Übertritt initiiert (26). In dieser Arbeit fanden sich dementsprechend auch mehr naive T-Lymphozyten in den Follikeln als in der Lamina propria. Die im Gegensatz zu peripheren Lymphknoten kleine Zahl an naiven Zellen von 6% in den Follikeln deutet auf einen großen Anteil reifer T-Zellen hin. Diese Werte stimmen überein mit immunhistochemischen Untersuchungen der intestinalen Lymphfollikel, bei denen sich ebenfalls nur ein geringer Anteil von 9% naiven T-Lymphozyten fand (75), sowie mit Untersuchungen bei Mäusen, in denen sich 13% L-Selektin-positiv T-Zellen in den Peyer'schen Plaques fanden (76). Das ursprünglich als Homing-Rezeptor der peripheren Lymphknoten identifizierte L-Selektin spielt für die Migration in andere lymphatische Gewebe, wie die mesenterialen Lymphknoten und Peyer'schen Plaques, eine geringere Rolle, was eine weitere Erklärung für den niedrigen Anteil L-Selektin-positiver Zellen sein kann (77, 78).

Im Laufe der Differenzierung der naiven Zellen zu Effektorzellen verändert sich die Isoform CD45RA durch alternatives Spleißen der Exons, welche für die extrazelluläre Domäne von CD45 codieren, in CD45RO. Die Hochregulation von CD45RO auf Antigen-stimulierten Zellen hat zu der Annahme geführt, dass die CD45RO-positiven Zellen eine Population von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen darstellen. Dies ist jedoch weiterhin eine kontroverse Diskussion, so dass CD45RO im Moment nur als Marker für aktivierte, reife T-Lymphozyten gelten kann (57). In dieser Arbeit fand sich mit 69% CD45RO-positiven Zellen in den Follikeln und 73% in der Lamina propria eine ungefähr gleich hohe Zahl derartig reifer, aktivierter T-Zellen. Da die Zahl der

CD45RO-positiven T-Zellen in den Follikeln sehr hoch erschien (54), wurden zur Kontrolle immunhistochemische Färbungen mehrerer Gewebeproben mit CD45RO angefertigt. Dabei fand sich in Übereinstimmung mit den durchflusszytometrischen Daten eine vergleichbar große Zahl reifer, aktivierter Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch sind die Ergebnisse konsistent zu den gefundenen 57% CD69-positiven T-Zellen in den Lymphfollikeln. CD69, ein phosphoryliertes Disulfid-gekoppeltes Homodimer, ist ein Aktivierungsmarker, der innerhalb von zwei Stunden nach Stimulation induziert wird (79-82), wohingegen die Umwandlung von CD45RA zu CD45RO über mehrere Tage erfolgt (57). Eine Hochregulation von CD69 aufgrund unvorhergesehener Aktivierungen der Zellen während der Isolation ist daher ausgeschlossen. In der Lamina propria fanden sich im Vergleich zu den Follikeln vermehrt CD69-positive, also aktivierte T-Lymphozyten, wobei dieser Unterschied beide T-Zellpopulationen gleichermaßen betraf. Dies kann durch die Zirkulation der Lymphozyten, die nach Antigenkontakt aus den induktiven in die efferenten Kompartimente auswandern, erklärt werden. Hiernach gibt es in der Lamina propria, wie auch in dieser Arbeit belegt, hauptsächlich reife, aktivierte Zellen (31, 71).

Um den Aktivierungszustand von T-Zellen noch weiter zu differenzieren, wurde der Oberflächenmarker CD25, die  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (83), untersucht. Seine Expression geht mit einer gesteigerten Produktion von Interleukin-2 und einer gesteigerten Proliferation als Reaktion auf Interleukin-2 einher (31). Neuere Studien zeigen, dass die CD25<sup>high</sup>-positiven CD4-Zellen zusätzlich eine regulatorische Funktion besitzen und zur Suppression autologer T-Zell-Proliferation, sowie zur Suppression der Produktion von Interferon- $\gamma$  führen (42, 43). In dieser Arbeit konnten jedoch in der durchflusszytometrischen Analyse keine CD25<sup>high</sup>-positiven Zellen entdeckt werden. Dies ist eventuell auf die hier verwendeten geringen Zellzahlen zurückzuführen, die bei einem Anteil von circa 1% CD25<sup>high</sup>-positiven Zellen an allen CD4-Zellen in der Lamina propria (42), eine Detektion fast unmöglich machen. CD25 gilt daher in dieser Arbeit als ein weiterer Aktivierungsmarker. Es konnten sowohl unter den LPL als auch unter den LFL 8% CD25-positive T-Zellen detektiert werden. Diese Zahl korreliert für die LPL mit Literaturwerten, die von 6% und 18% CD25-positiver Lymphozyten in der Lamina propria berichten (31, 42). Für die LFL gibt es bislang keine Daten, die zum Vergleich herangezogen werden könnten. T-Zellen, die sowohl CD69 als auch CD25

exprimieren, weisen einen erhöhten Aktivierungsgrad auf und finden sich häufig bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (84). Diese Abstufung im Aktivierungsgrad erklärt auch die, im Vergleich zum hohen Anteil CD69-positiver Zellen, geringe Zahl CD25-positiver T-Zellen.

### 4.3.3 Integrine

Integrine sorgen bei der normalen Entwicklung ebenso wie bei Immun- und Entzündungsreaktionen für Adhäsion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Sie spielen wichtige Rollen bei der Migration der Lymphozyten in verschiedene Kompartimente des Darmes (85, 86). So treten naive Zellen in die Follikel ein, und reife, aktivierte Lymphozyten wandern in die Lamina propria. Ein entscheidender Faktor für dieses sogenannte intestinale „Homing“ ist das Integrin  $\alpha_4\beta_7$ , welches wie L-Selektin an MAdCAM-1 bindet (87). Die  $\alpha_4\beta_7$ -Expression der humanen Lymphfollikel-Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da zu diesem Zeitpunkt ein Fluochrom-konjugierter Antikörper für durchflusszytometrische Analysen kommerziell nicht erhältlich war. Aus immunhistochemischen Untersuchungen weiß man jedoch, dass die Expression von  $\alpha_4\beta_7$  sowohl in den Peyer'schen Plaques, als auch in der Lamina propria sehr ausgeprägt ist, was auf eine ähnlich hohe Bedeutung beim „Homing“ der Zellen in beide Kompartimente hindeutet (24, 54).

Nach Erreichen der Lamina propria kommt es zur Migration einer Untergruppe der Lymphozyten in das Epithel, wo sie die eigenständige Gruppe der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) bilden. Diese Migration ist begleitet von einer Hochregulation des Integrins  $\alpha E\beta 7$  (CD103), dessen einzig bislang bekannter Ligand E-Cadherin von Epithelzellen exprimiert wird (88, 89). Daher wurde  $\alpha E\beta 7$  auch initial als Marker für intraepitheliale T-Lymphozyten der Darmwand oder anderen Kompartimenten wie Haut oder Lunge beschrieben (90). Hier trägt es zur Adhäsion der Lymphozyten am Epithel bei (91, 92). In  $\alpha E\beta 7$ -Knockout-Mäusen zeigte sich jedoch nicht nur eine reduzierte Zahl an Lymphozyten im Epithel, sondern auch in der Lamina propria, wohingegen die Peyer'schen Plaques normal ausgebildet waren (27). Hierzu passt auch der in dieser Arbeit gefundene signifikant höhere Anteil an  $\alpha E\beta 7$ -positiven T-Zellen in der Lamina propria im Vergleich zu den Lymphfollikeln. Es könnte ein Hinweis auf eventuell vorhandene andere Liganden von  $\alpha E\beta 7$  in der Lamina propria

sein. Die Funktion dieses Integrins ist bislang noch weitestgehend ungeklärt. Während  $\alpha E\beta 7$ -positive CD8-T-Zellen eine besonders starke zytolytische Aktivität besitzen (93), ist seine präzise Rolle auf CD4-Zellen noch nicht bekannt. Es gibt Hinweise auf eine regulatorische Funktion der  $\alpha E\beta 7$ -positiven CD4-Zellen bei Mäusen außerhalb des CD25-Kompartimentes (90). Beim Menschen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (94).

#### **4.3.4 Schlussfolgerungen für die funktionellen Analysen**

Da die T-Zell-Subpopulationen, insbesondere CD4- und CD8-Zellen, unterschiedliche Funktionen ausüben, ist es für die Vergleichbarkeit von funktionellen Untersuchungen wichtig, dass sich die zu analysierenden Zellpopulationen in ihrer Zusammensetzung nicht gravierend voneinander unterscheiden. Sollte dies doch der Fall sein, so ist die Extraktion einer bestimmten Subgruppe, zum Beispiel der CD4-positiven Zellen, zu erwägen. Bislang wurden in dieser Arbeit alle vorhandenen Unterschiede zwischen den Leukozyten der Follikel und der Lamina propria erläutert. Trotz dieser Unterschiede bewegten sich die prozentualen Anteile der untersuchten Subpopulationen aber in ähnlichen Bereichen. So gab es sowohl in der Lamina propria, als auch in den Lymphfollikeln wesentlich mehr CD4-positive Zellen als CD8-Zellen. Auch das CD4/CD8-Verhältnis unterschied sich nicht massiv, und der Aktivierungszustand und Reifegrad der T-Zellen war in beiden Kompartimenten relativ hoch. Man kann daher von einer Ähnlichkeit der funktionellen Fähigkeiten ausgehen und somit die gesamte isolierte Zellpopulation den funktionellen Analysen zuführen.

#### **4.4 Vergleich der Leukozyten aus Ileum und Kolon/Rektum**

Die mikrobielle Besiedlung von Dünndarm und Dickdarm unterscheidet sich gravierend. Während das Kolon eine ausgeprägte Besiedlung mit Mikroorganismen aufweist, ist der Dünndarm weitgehend steril. Dies hat Auswirkungen auf die physiologische und pathophysiologische Regulation des lokalen Immunsystems. So betrifft beispielsweise die chronisch-entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa nur den Dickdarm, wohingegen Morbus Crohn sowohl Dünn- als auch Dickdarm befallen kann. Dies weist auf unterschiedliche immunologische Eigenschaften der Darmabschnitte hin, die sich sowohl im Phänotyp, als auch in der Funktion der Immunzellen zeigen könnten (95-97). Beim Vergleich der Leukozyten aus Ileum und

Kolon fand sich jedoch zunächst eine gleichartige Zusammensetzung der mononukleären Zellpopulation, das heißt der T-, B- und Plasmazellen, in allen untersuchten Kompartimenten. Hierzu gibt es für die LPL keine Vergleichsdaten beim Menschen, die Datenlage bei Mäusen ist nicht einheitlich. In einigen Untersuchungen fanden sich vergleichbare Zahlen von T-Lymphozyten in der Lamina propria von Dün- und Dickdarm (96). Andere hingegen berichten über weniger B- und mehr T-Zellen im Dünndarm von Mäusen im Vergleich zum Dickdarm. Diese Diskrepanzen lassen sich eventuell mit der Untersuchung verschiedener Mausstämme oder unterschiedlichen Zuchtbedingungen erklären (56). Auch hinsichtlich der Lymphfollikel ist die Datenlage sowohl für Mäuse, als auch für Menschen nicht ausreichend.

Differenzen zwischen beiden Darmabschnitten zeigten sich innerhalb der T-Zell-Subpopulationen. Einige Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung der T-Zellen können in Zusammenhang mit der Entwicklung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) gebracht werden. Bei den IEL handelt es sich um eine eigenständige Gruppe von Lymphozyten im Darm. Diese Zellen regulieren unterschiedliche Arten von Zytotoxizität (98) und sezernieren multiple Zytokine in vitro (99). Sie haben aufgrund ihrer anatomischen Lage den direktesten Kontakt mit luminalen Antigenen. Ein Großteil der humanen IEL ist CD8-positiv, nahezu alle exprimieren  $\alpha E\beta 7$  (89). Es wird vermutet, dass sich ein Teil der IEL, hauptsächlich die  $\gamma\delta$ -positive Zellen, thymusunabhängig innerhalb des Epithels entwickelt, während die  $\alpha\beta$ -Zellen aus der Lamina propria in das Epithel eintreten (100). Aus diesem Grund erfolgt wie bereits erwähnt eine Hochregulation des Integrins  $\alpha E\beta 7$  auf Lymphozyten der Lamina propria, das durch Interaktion mit E-Cadherin auf Epithelzellen den Eintritt und das Verweilen der Lymphozyten im Epithel fördert. Im Ileum der Maus gibt es 20 mal mehr intraepitheliale Lymphozyten als im Kolon (95, 97). Als Konsequenz daraus könnte man ableiten, dass es somit im Ileum auch mehr Vorläuferzellen auf dem Weg in das Epithel geben muss. In der vorliegenden Arbeit fanden sich mehr CD8-positive Zellen, sowie mehr  $\alpha E\beta 7$ -positive Zellen in der Lamina propria des Ileums im Vergleich zum Kolon/Rektum. Es gibt also eine höhere Zahl von Lymphozyten im Ileum, die in ihrem Phänotyp den IEL ähneln und somit eventuell Vorläuferzellen darstellen. Die Anzahl der Lymphozyten mit  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor war entsprechend der oben erwähnten Entwicklungstheorie nicht erhöht und mit 3% analog den in der

Literatur angegebenen Werte (31). Ein ähnlicher Unterschied bestand zwischen den Peyer'schen Plaques des Ileums und den Lymphfollikeln des Kolons. In ersteren fanden sich mehr  $\alpha$ E $\beta$ 7-positve Zellen. Man geht davon aus, dass die IEL zunächst wie LPL in den Follikeln auf ihr Antigen geprägt werden, dann auswandern und über die Lamina propria in das Epithel gelangen (101). Es ist demzufolge nicht auszuschließen, dass ein Teil dieser Zellen bereits in den Peyer'schen Plaques  $\alpha$ E $\beta$ 7 ausbildet.

Andere Unterschiede betrafen den Aktivierungszustand der T-Lymphozyten. Eine Erklärung für die verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 der Lymphozyten in den Follikeln und in der Lamina propria des Kolons, sowie parallel dazu für die höhere Anzahl an CD45RO-positiven T-Zellen in der Lamina propria des Kolons ergibt sich aus der bakteriellen Besiedlung des Dickdarmes mit annähernd  $10^{14}$  kommensalen Mikroorganismen. Es ist anzunehmen, dass durch diese bakterielle Flora im Dickdarm ein regerer und häufigerer Kontakt mit Antigenen stattfindet, als im sterilen Dünndarm. Eine zusätzliche Bestätigung der Aktivierung der Zellen durch luminale Antigene liefert die Tatsache, dass die beschriebenen Unterschiede für LFL und LPL lediglich die CD4-positiven CD69-positiven T-Zellen betrafen, wohingegen die Zahl der aktivierten CD8-positiven T-Zellen in allen Kompartimenten gleich hoch war.

Insgesamt kann man aber sagen, dass sich die Lymphozyten der Follikel aus Kolon und Ileum sowohl in der Zusammensetzung der Zellpopulation, als auch in der Zusammensetzung der T-Zellen sehr ähnlich sind. Dies ist der erste Vergleich dieser Art. Für eine genauere Aussage über die Bedeutung der phänotypischen Unterschiede bedarf es daher noch weiterer funktioneller Untersuchungen.