

## 5 Zusammenfassung

Immunologische Mechanismen oraler Toleranz sind beim Menschen bislang nur unzureichend bekannt. Funktionelle Untersuchungen mukosaler Lymphfollikel, die als induktiver Schenkel des mukosalen Immunsystems hierbei vermutlich eine entscheidende Rolle spielen, beschränken sich hauptsächlich auf murine Modelle. Die Untersuchung humaner Lymphfollikelzellen wird dadurch erschwert, dass Peyer'sche Plaques und Lymphfollikel beim Erwachsenen endoskopisch nicht zu identifizieren sind und es bisher nicht möglich war, die Lymphozyten der Follikel getrennt vom umgebenen Gewebe aufzuarbeiten und zu analysieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung einer Methode zur gezielten Isolation von Lymphozyten aus humanen Peyer'schen Plaques des Ileums und Lymphfollikeln des Kolons/Rektums.

In nativen Biopsien des terminalen Ileums und Methylenblau-gefärbten Resektaten aus Kolon und Rektum konnten unter dem Stereomikroskop Peyer'sche Plaques und Lymphfollikel eindeutig identifiziert und präpariert werden. Die gezielte Präparation wurde zunächst durch Gefrierschnitte bestätigt. Insgesamt konnten aus 35 (64%) der untersuchten 54 Patientenproben des terminalen Ileums, sowie aus 32 (89%) der 36 untersuchten Kolonresektate Follikel präpariert werden. Nach enzymatischer Lösung des Zellverbandes wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen aus Lymphfollikeln und benachbarter Lamina propria getrennt isoliert. Pro Ileumfollikel konnten im Median 75000 (20000-880000) vitale mononukleäre Zellen isoliert werden. Die Aufarbeitung eines Kolonfollikels ergab im Median 67000 (13000-250000) Zellen.

Es wurden 8-fach-Färbungen für die Multi-Parameter-Durchflusszytometrie etabliert, die detaillierte phänotypische Analysen bereits bei einer Zellzahl von circa 100000 Zellen ermöglichten. Diese Zellzahl konnte aus 33 Ileumproben (61%) und aus 28 Kolonproben (78%) gewonnen werden.

Neun Patientenproben aus dem terminalen Ileum und acht Proben aus Kolon/Rektum wurden phänotypisch charakterisiert. Der Anteil von T-, B- und Plasmazellen in den isolierten Zellpopulationen entsprach der durch immunhistochemische Untersuchungen bekannten Zusammensetzung mononukleärer Zellen in Lamina propria und Lymphfollikeln. Dendritische Zellen und

Makrophagen konnten nicht isoliert werden. Der relative Anteil von T-Lymphozyten unterschied sich nicht zwischen isolierten mononukleären Zellen aus Lymphfollikeln und Lamina propria. Hingegen fand sich in Übereinstimmung mit immunhistochemischen Daten ein höherer Anteil von B-Lymphozyten in den Lymphfollikeln im Vergleich zur Lamina propria [42% (18-64%) vs. 22% (10-47%)]. Der Anteil der Plasmazellen an den Lamina-propria-Leukozyten betrug 5% (2-18%), die Zahl der follikulären Plasmazellen war mit 2% (0-5%) signifikant geringer. Diese Unterschiede bestätigen die getrennte Isolation der beiden Zellpopulationen aus Follikeln und Lamina propria.

Innerhalb der T-Zellpopulation fanden sich in den Follikeln erwartungsgemäß weniger  $\alpha$ E $\beta$ 7-positive T-Zellen und mehr L-Selektin-positive T-Zellen auf als in der Lamina propria, der Anteil der follikulären naiven Zellen betrug 6% (2-16%). Des Weiteren fanden sich unter den Lymphfollikel-Lymphozyten mit 61% (37-83%) mehr CD4-positive T-Zellen und mit 12% (3-38%) weniger CD8-positive T-Zellen als in der Lamina propria, die 49% (38-87%) CD4-Zellen und 18% (6-50%) CD8-Zellen enthielt. Die T-Lymphozyten der Lamina propria waren häufiger CD69-positiv als die T-Zellen der Follikel. Der Vergleich zwischen Lymphfollikel-Leukozyten aus Ileum und Kolon ergab eine weitgehend ähnliche Zusammensetzung der isolierten Zellen, es fanden sich lediglich im Kolon vermehrt CD69-positive T-Lymphozyten [62% (49-90%) vs. 42% (21-84%)] und weniger  $\alpha$ E $\beta$ 7-positive T-Lymphozyten als im Ileum [8% (5-19%) vs. 15% (11-26%)].

Es ist in dieser Arbeit gelungen, eine Methode zu etablieren, mit der eine sichere und gezielte Präparation von Peyer'schen Plaques aus Ileumbiopsien und von Lymphfollikeln aus Kolonresektaten möglich ist. Die isolierte Zellzahl ist gering, aber ausreichend für weiterführende funktionelle und phänotypische Untersuchungen. Die nachgewiesenen phänotypischen Unterschiede zwischen Lymphfollikel-Leukozyten und Lamina-propria-Leukozyten müssen bei der Interpretation funktioneller Untersuchungen berücksichtigt werden. Langfristig gesehen ist diese Methode ein erster Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der an protektiven und tolerogenen Immunantworten beteiligten Mechanismen. Sie kann somit der Entwicklung und Optimierung von Verfahren zur gezielten Immunmodulation dienen.